



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE

ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**İNSÜLİN, METOPROLOL VE DEFEROKSAMİNİN
SIÇANLARDA YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET FATİH OKYAY

Tez Danışmanı:

DOÇ. DR. HAKAN ARSLAN

İSTANBUL - 2018

TEŞEKKÜR

İhtisas hayatım boyunca bilgi ve becerilerinin yanı sıra tecrübelerinden büyük kazançlar sağladığım ve yetişmemde sonsuz emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Oğuz ÇETİNKALE, Prof. Dr. Yağmur AYDIN, Prof. Dr. Arif TÜRKMEN, Doç. Dr. Hakan ARSLAN, Uzm. Dr. Semih BAĞHAKİ ve Uzm. Dr. Anıl DEMİRÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

İhtisas hayatımın ilk gününden itibaren benden destek, birikim ve hoşgörülerini esirgemeyen tez danışmanı hocam Doç. Dr. Hakan ARSLAN'a, tez çalışması için yaptığı katkılardan dolayı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Övgü AYDIN'a, tüm ihtisas hayatım boyunca kader birliği yaptığım çalışma arkadaşlarım Dr. Royal KHANKİSHİYEV'e, Dr. Tuğba Feryal YILDIZ'a, Dr. Hasan KÖMÜRCÜ'ye, Dr. Şamil SÜLEYMANOV'a, Dr. Mehmet Beşir ÖNER'e, Dr. Başak DAĞHAN'a, Dr. Koray TEMİZ'e, Dr. Uğur ÇELİK'e, Dr. Fatih ÇINAR'a, Dr. Mehmet GÜR'e, Plastik Cerrahi Kliniği hemşire ve personeline, Yanık Ünitesi hemşire ve personeline ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim. Eğitim sürem boyunca bilgi ve görgülerinden faydalandığım Uzm. Dr. Murat DİYARBAKIRLIOĞLU'na, Uzm. Dr. Gülsüm ÇEBİ'ye, Uzm. Dr. Mirza Fırat ÇEVİRME'ye, Uzm. Dr. Uğur ŞAHİN'e, Uzm. Dr. Müge Anıl YALÇIN'a, Uzm. Dr. Alp ERCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bu yana desteklerini benden esirgemeyen, annem Ecz. Meral OKYAY ve babam Zeynel OKYAY'a ve tezimin hazırlanışı esnasında büyük özveri gösteren bu süreçte bana destek olan eşim Dr. Ebru OKYAY'a, kardeşlerim Nur Medine OKYAY ve Dr. Yavuz Selim OKYAY'a teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ tarafından desteklenmiştir.

Proje no: 24277

Dr. Mehmet Fatih OKYAY

İstanbul 2018

DİZİN

TEŞEKKÜR.....	1
DİZİN.....	2
RESİM, TABLO VE GRAFİK DİZİNİ	4
ÖZET	7
ABSTRACT.....	8
1. GİRİŞ.....	9
1.1. Yağ Dokunun Metabolik Rolü ve Önemi	11
1.1.1. Yağ Dokuda İnsülinin Yeri	13
1.1.2. Yağ Dokuda $\beta 1$ Reseptörlerin Önemi	14
1.1.3. Yağ Dokuda Deferoksaminin Etkileri.....	16
1.2. Yağ Doku Morfolojisi.....	19
1.3. Otolog Yağ Doku Greftleme Cerrahisi	23
1.3.1. Tarihsel Gelişim	23
1.3.2. Günümüz.....	26
1.3.3. Yağ Grefti Sağ Kalım Teorileri.....	26
1.3.4. Cerrahi Yöntem.....	32
1.4. Yumuşak Doku Defektleri ve Onarımları	35
1.4.1. Dolgu Materyalleri	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
2.1. Otolog Yağ Doku Grefti Alınması.....	41
2.2. Yağ Greftlerinin Pay Edilmesi ve Ağırlık Olarak Ölçülmesi	43
2.3. Deney Gruplarının Hazırlanması ve Uygulanan İşlemler	44
2.4. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Yağ Greftlerinin Yeniden Toplanması	46
2.5. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme.....	47
2.5.1. Değerlendirme Yöntemi.....	48
2.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	49
3. BULGULAR.....	50
3.1. Ağırlık Analizleri	50
3.1.1. Deney Öncesi ve Sonrası Ağırlık Değişimlerinin Analizi	50
3.1.2. Ağırlık Değişimlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	50

3.2. Histopatolojik İnceleme	51
3.2.1. Yağ Nekrozu Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	51
3.3. İmmunohistokimyasal İnceleme	52
3.3.1. Perilipin Yüzdeleri	52
3.3.2. CD31 Oranları	54
3.3.3. CD34 Oranları	57
4.TARTIŞMA	59
5. SONUÇ	75
6. KAYNAKLAR	77



RESİM, TABLO VE GRAFİK DİZİNİ

Resim 1: Yağ dokunun bazı metabolik görevleri (46).....	12
Resim 2: Insulin ve IGF-1 reseptörleri (IR ve IGF-1R) yakın benzerlik gösterir. Uyarılmaları Ras-MAPK ve PI3K-Akt yollarının aktivasyonuna neden olur (47). ...	14
Resim 3: β_1 , β_2 adrenerjik reseptörler cAMP üzerinden HSL forforilasyonu ile lipolizi uyarırlar (45). G_s , GTP-bağımlı stimulan protein, AC: adenilat siklaz, cAMP: siklik AMP, HSL: hormona duyarlı lipaz, FA: yağ asidi (fatty acid).....	16
Resim 4: Normoksi ve hipokside HIF-1 regülasyonu (60).....	17
Resim 5: HIF-1 ile uyarılan mekanizmalar ilişkili genler (61).....	18
Resim 6: Yağ doku histolojik kompozisyonu (H&E boyama, x100, 7 numaralı denek, DFO grubu).....	19
Resim 7: Mezenkimal kaynaklı kök hücrelerin farklılaşma yeteneği (82).....	20
Resim 8: Yağ dokunun endokrinolojik rolü ve kan akımının düzenlenmesi (85).....	22
Resim 9: Beyaz, bej ve kahverengi adipositlerin kökeni (86).....	23
Resim 10: Yağ Dokusu Greftlemesinin Tarihsel Gelişimi (87).....	24
Resim 11: Greft Sağ Kalım Teorisi (24).....	28
Resim 12: Greft Dönüşüm Teorisi (24).....	29
Resim 13: Üç bölge teoremi (101).....	30
Resim 14: Yağ grefti sağ kalım sürecini ifade eden teoriye (99) uyan üç bölge; koyu mavi alan: sağ kalım bölgesi/surviving zone, kırmızı alan: adipogenez bölgesi/regenerating zone, açık mavi ve yeşil alanlar: nekrotik bölge/necrotic zone [açık mavi alan: nekrotik adipositlerden oluşan lipid damlacığı, yeşil alan: lipogranülom sahası, mavi ok: grefti çevre dokudan ayıran kapsülü] (H&E boyama, x100, 7 numaralı denek, DFO grubu).....	30
Resim 15: In vivo yağ grefti transplantasyon sekansı; doku onarım fazı ilk 3 ayı kapsarken, stabilizasyon fazı 3. ayın sonunda başlar (24).....	31
Resim 16: Kist duvarı formasyonu geliştirmeye başlamış geniş vakuoller içeren yağ nekrozu alanı (H&E boyama, x100, 7 numaralı denek, B/B grubu).....	31
Resim 17: Deney gruplarının belirlenmesi [21: denek numarası (1-22)] (Tablo 18).....	40
Tablo 18: Deney gruplarının belirlenmesi.....	40
Resim 19: Cerrahi öncesi hazırlık.....	42

Resim 20: Sıçan kasık yağ yastığı	42
Resim 21: Çıkarılmış yağ yastığı.....	43
Resim 22: Çalışmamızda kullanılmış olan hassas terazi	43
Resim 23: İnsülin ve beta bloker solüsyonlarında inkübe edilmiş yağ greftleri.....	44
Resim 24: Alıcı saha; solda greftleme öncesi, sağda greftleme sonrası	45
Resim 25: Emilemeyen dikişler ile primer onarılmış verici saha insizyonu	45
Resim 26: Olgunlaşma sürecini tamamlamış yağ greftleri. Greft sahalarına dik uzanan yeni kan damarı gelişen alanlara dikkat ediniz.	46
Tablo 27: Deneş öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin analizi	50
Tablo 28: Deneş öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	51
Tablo 29: H&E boyalı kesitlerde yağ nekrozu yüzdelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	51
Resim 30: Perilipinle kuvvetli boyanma gösteren örnek alan (Perilipin İHK boyama, x100, 7 numaralı denek DFO grubu)	52
Tablo 31: Perilipin boyalı alan yüzdelerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	53
Grafik 32: Perilipin boyalı alan yüzdeleri.....	53
Resim 33: CD31 boyalı alanlar; a: hiç=0 (%0-10), b: zayıf=1 (%10-40), c: orta=2 (%40-70), d: güçlü=3 (%70-100) (CD31 İHK boyama, a ve c: x400, b ve d: x200, 11 numaralı denek, kontrol grubu).....	54
Tablo 34: CD31 boyanma oranlarının ÖYD ve INS grupları arası karşılaştırılması.....	55
Tablo 35: CD31 boyanma oranlarının SERUM ve INS grupları arası karşılaştırılması	55
Tablo 36: CD31 boyanma oranlarının DFO ve B/B grupları arası karşılaştırılması	56
Tablo 37: CD31 boyanma oranlarının INS ve B/B grupları arası karşılaştırılması.....	56
Grafik 38: CD31 boyanma oranlarının kesitsel verilerinin gruplardaki ortalama değerleri ve diğer grupların ikili karşılaştırmasında kullanılan McNemar testleriyle elde edilmiş p değerleri	56
Resim 39: CD34 boyalı alanlar; a: hiç=0 (%0-10), b: zayıf=1 (%10-40), c: orta=2 (%40-70), d: güçlü=3 (%70-100) (CD34 İHK boyama, a, b ve c: x200, d: x400, 4 numaralı denek, INS grubu).....	57
Grafik 40: CD34 boyanma oranlarının kesitsel verilerinin gruplardaki ortalama değerleri	58

Resim 41: Geniş vakuoller etrafında görülen fibrotik infiltratlarla karakterize lipogranülom alanı (H&E boyama, x200, 4 numaralı denek, kontrol grubu).....	61
Resim 42: Kist duvar formasyonu geliştirmiş yer yer fibrotik infiltratlar içeren yağ kistleri komşuluğundaki, membranları perilipin boyalı adipositlerle karakterize adipogenez alanları (Perilipin İHK boyama, x100, 7 numaralı denek, DFO grubu).....	64
Resim 43: A; hacim değerlendirmede kullanılan temel yöntemler, B; histolojik değerlendirilmede kullanılan boyama teknikleri. IHC: immunohistokimyasal. (41)	66
Resim 44: Düzenli yağ doku histolojik çatisı göstermesine karşın perilipinle zayıf boyanmış alan (Perilipin İHK boyama, x200, 2 numaralı denek, DFO grubu).....	66
Resim 45: Yağ nekrozu alanlarındaki lipid damlacıkları (yağ kistleri) etrafında gelişen kist duvar formasyonu; geniş vakuollerin etrafındaki kalınlaşmakta olan çeperlere dikkat ediniz. (H&E boyama, x100, 2 numaralı denek, kontrol grubu)	69
Resim 46: Greft olgunlaşma süreci (130)	70
Resim 47: 1968-2015 yılları arasında yağ greftleri üzerine yapılan çalışmaların haftalara göre yüzdesel olarak deney sonlandırma noktaları (41)	70
Resim 48: CD34 aktivasyonu yüksek alan (CD31 İHK boyama, x400, 4 numaralı denek, INS grubu)	72

ÖZET

İNSÜLİN, METOPROLOL VE DEFEROKSAMİNİN SIÇANLARDA YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Yağ greftleme, plastik cerrahide yaygın kullanılan prosedürlerden biridir. Yağ grefti sağ kalımını artıran; insülin, büyüme faktörleri, östradiol, beta blokerler ve deferoksamin gibi birçok materyal bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı insülin, metoprolol ve deferoksaminin yağ greft sağkalımı üzerindeki etkilerini kıyaslamaktır.

Yöntemler: 17 adet erkek Sprague Dawley sıçanın kasık yağ yastıkları rezektü edildikten sonra greft olarak birbirine yaklaşık eşit dört parçaya bölünmüştür. Hazırlanan greftler, hassas tartıyla ağırlık olarak eşit ölçülerek kaydedilmiştir. Greftler tüm sıçanların sırt bölgelerinde kendileri için belirlenen dört ayrı kadradaki cilt altı alıcı bölgelere yerleştirilmiştir. İnsülin ve metoprolol grubu yağ greftleri yerleştirilinceye kadar regular insülin ve metoprolol solüsyonlarında inkübe edilmiştir. Deferoksamin ve kontrol grubu yağ greftleri inkübasyon işlemine tabi tutulmadan yerleştirilmiştir. Cerrahi işlem sonrası kontrol grubu yağ greftlerine her 3 günde bir 10 doz NaCl solüsyonu enjekte edilmiştir. Deferoksamin grubu yağ greftlerine her 3 günde bir 10 doz deferoksamin solüsyonu enjekte edilmiştir. 3 aylık greft olgunlaşma döneminden sonra, greftler yalnızca çevrelerindeki fibröz kapsüllerini içerecek şekilde eksize edilmiştir. Greftler hassas tartıyla ağırlık olarak ölçüldükten sonra, histolojik incelemeye ve immunohistokimyasal olarak perilipin, CD31 ve CD34 ile değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Bulgular: Çalışma öncesi ve sonrası greft ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p > 0.05$). Perilipin boyama oranına göre, metoprolol grubu yağ greftleri kontrol ve insülin grubu yağ greftlerinden %30 daha fazla istatistiksel olarak anlamlı sağ kalım göstermiştir (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$). CD31 aktivasyon oranları, deferoksamin ve insülin grubu yağ greftlerinde metoprolol grubuna göre anlamlı derecede fazla izlenmiştir ($p > 0.05$). CD34 boyama oranlarına göre, gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$).

Sonuçlar: Çalışmamızda, yağ greft sağ kalımının, metoprolol inkübasyonu ile arttığı gösterilmiştir. Düşük kök hücre sağ kalım oranları, adipogenez döneminin 3 ayda sona erdiğini göstermiştir.

ABSTRACT

EFFECTS OF INSULIN, METOPROLOL AND DEFEROXAMINE ON FAT GRAFT SURVIVAL

Background: Fat grafting is a widely used procedure in plastic surgery for both reconstructive and aesthetic purposes. Many substances have been reported to increase the survival of fat grafts, including insulin, growth factors, oestradiol, beta-blockers and deferoxamine. The aim of this study was to compare the effects of insulin, metoprolol and deferoxamine on fat graft survival.

Methods: Inguinal fat pads of 17 male Sprague Dawley rats were resected and split into four parts as grafts. The grafts were placed in subcutaneous pockets in four quadrants on the back area of the rats. Insulin and metoprolol group fat grafts were incubated in regular insulin and metoprolol solutions, until they were placed. Deferoxamine and control group fat grafts were placed without incubation. After surgery, the control group fat grafts were injected with 10 doses of NaCl solution once every 3 days, and the deferoxamine group fat grafts were injected with 10 doses of deferoxamine solution once every 3 days. After a graft maturation period of 3 months, the grafts were harvested for weighing, and evaluated histologically, and immunohistochemically with perilipin, CD31, and CD34.

Results: There were no significant differences between the grafts in pre- and post-study grafts weights ($p > 0.05$). According to the rate of perilipin staining the metoprolol group fat grafts had 30% higher survival than the control and insulin group fat grafts ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). CD31 activation rates were significantly higher in the deferoxamine and insulin group fat grafts than in the metoprolol group ($p > 0.05$). CD34 staining rates did not differ between any groups ($p > 0.05$).

Conclusions: Fat graft survival was increased by incubation with metoprolol. Low survival rates of stem cells demonstrated that the period of adipogenesis ended at 3 months.

1. GİRİŞ

Yağ grefti uygulamalarının tarihi ilk olarak 19. yüzyıl sonlarına dek uzanır. 1893 yılında Gustav Adolf Neuber (1850-1932) orbita çevresinde tüberküloza bağlı geçirilmiş osteomyelite ikincil doku defekti ve nedbeleşmeyi tedavi etmek amacıyla koldan orbita bölgesine yağ doku naklini uygulamıştır. Yine aynı dönemde Neuber sifilize ikincil ‘eyer burun’ deformitesini aynı yöntemle tedavi etmeye çalışmıştır (1–7).

Edinsel ve doğumsal kusur ve hastalıklar ve yaşlanma sonucu oluşan yumuşak doku hacmindeki eksilme ve kayıplar hastaların yaşam kalitesini görünüş ve işlevsel olarak değişen ölçülerde bozmaktadır. Günümüzde bu kayıpların onarımı plastik cerrahide uygulanabilirliği yüksek tekniklerin cerrahi uygulamalara dahil edilmesiyle birlikte hem deneysel araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda üzerinde en çok kaynak ve mesai harcanan sahalardan biridir. Geçmişte otolog yani öz dokuya alternatif birçok materyal bildirilmiştir (8). Ancak sentetik materyallerin kullanımı fibröz kapsül kontraksiyonu, alerjik reaksiyonlar, distorsiyon, yer değiştirme ve uzun dönemde rezorpsiyon gibi pek çok hasta konforu ve cerrahın motivasyonu açısından olumsuz durumlarla sonuçlanabilmektedir (4,5,9–11). Onarım cerrahisinin ‘benzeri benzeriyle onar’ temel prensibi dolayısıyla otolog dokunun kullanımı ve tekniğin iyileştirilmesi plastik cerrahi önderliğinde tüm tıbbi branş ve uygulamalarda zamanla artan bir ivme göstermektedir (6,12–17).

Yağ doku ideal yumuşak doku dolgu özelliklerini taşımaktadır; doku uyumu tam, komplikasyon oranı düşük, ucuz, kolay ve tekrarlanabilir bir uygulamadır (4,5,18–23). Bu özellikleri sayesinde yağ doku grefti uygulamaları, estetik cerrahi ve onarım cerrahisinde sık yapılan ameliyatlarda yerlerini almıştır (1,9,12–15,17,20,24–29). Yaşlanan cildin formunu geriye döndürmek, ciltteki nedbe dokusunu yumuşatmak ve bunun getirdiği cilt kalitesinde artış, bir kontur defektini gidermek, yüz, meme, kalça gibi bölgelerde estetik amaçlı projeksiyon artışı, radyoterapi görmüş ciltlerde görülen sertleşmeyi gidermek, bir bölgedeki doku azlığını gidermek yağ doku greftinin kullanım alanlarından sadece birkaçıdır (1,5–7,9,12,13,15,18,22,30–32). Yağ doku greftinin rezorpsiyonuna bağlı greft hacim kayıpları bu işlemin en çok eleştiri gören noktasıdır (1,13,20,25,28,32–36). Yağ doku greft uygulamalarında sağ kalım açısından güvenilir, tekrar edilebilir sonuçların elde edilebilmesi için gerekli koşullar üzerine çalışmalar

yapılmış ve bu plastik cerrahide önemli sorular arasında yerini almıştır (21–23,25,32,37–39). Bu nedenle, yağ greft hücrelerinin canlılık oranlarını artırmak için uygulanan cerrahi teknikler üzerinde yapılabilecek geliştirmeler büyük önem arz etmektedir. Alıcı yatak seçimi, alıcı sahadaki beslenme, kanlanma ve yeni damar oluşumu sürecinin hızlandırılması ve güçlendirilmesi yağ doku greftleme işlemlerinin başarı ve tahmin edilebilirliğinin artırılması adına araştırmacıların dikkatlerini kaydırıldığı güncel çalışma alanlarıdır. Son dönemde bu konu üzerinde yapılan deneysel çalışmaların büyük kısmı alıcı saha ve greft kanlanmasının artırılması üzerine kaymış; bu amaçla adipositlerin ve öncüllerinin büyüme ve çoğalmasını uyarıcı etkisi gösterilmiş birçok etken madde ve yöntem denenmiş ve birçok olumlu sonuç bildirilmiştir (5–7,13,19,23,28,32,34,35,40,41).

1.1. Yağ Dokusunun Metabolik Rolü ve Önemi

İnsanlarda yağ dokusunun %50'si cilt altında, %15'i omentum ve mezenterde, %15-20'si üreme organları çevresinde, %12'si böbreklerde ve %5-8'i kaslar arasında yer almaktadır (22).

Yağ dokusunun temel görevlerinden birisi enerji depolamaktır. Adiposit metabolizması hormonlar ve sitokinler aracılığı ile endokrin, parakrin ve otokrin olarak düzenlenir. Adipositlerde bulunan reseptörler; hücre membranında bulunan hormon sitokin reseptörleri (leptin, insülin, TSH, anjiyotensin-2 vs), adrenerjik reseptörler ($\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 1$, $\alpha 2$), lipoprotein reseptörler (VLDL, LDL, HDL) ve hücre içinde bulunan nükleer reseptörler olmak üzere iki gruptur. Hücre fonksiyonları bu reseptörlerin uyarılması ile oluşan sinyallerle düzenlenir. Adipositlerin bu uyarılara leptin başta olmak üzere birtakım hormonlar, büyüme faktörleri ve bazı sitokinler aracılığıyla endokrin, parakrin ve otokrin yanıtlar verdiği bilinmektedir. Bu yüzden yağ dokusu günümüzde, enerji dengesini ve kendi metabolizmasını düzenleyen önemli molekülleri sentezleyip kan akımına verme kapasitesine sahip, endokrin bir organ olarak ele alınmaktadır. (42)

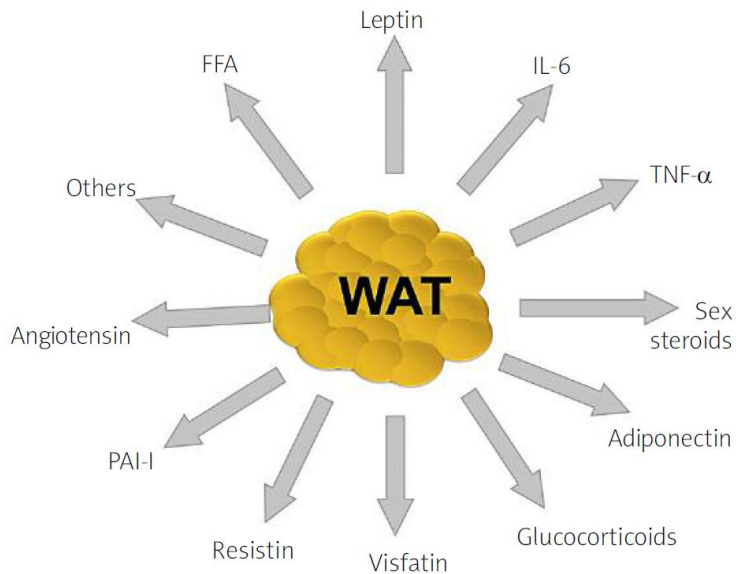
Adipositler endokrin bezlerden salgılanan hormonlara yanıt oluşturmanın yanında, diğer hücreler tarafından tanınan ve kullanılan, peptid ve peptid olmayan; adenosin (antilipolitik ve vazodilatatör etkili), anjiyotensin II (vazokonstriktör) ve prostoglandinler gibi faktörler sentezleme ve salgılama yeteneğindedir. Ayrıca yağ doku seks steroid hormonlarının sentez ve aktifleşmesinde önemli görevler üstlenmektedir. (43)

Adipositler lipoprotein lipaz sentez ve sekresyonunda önemli rol oynamaktadır. Lipoprotein lipaz (LPL), apolipoprotein-E ve kolesterol ester transfer protein enzimleri sayesinde şilomikron ve VLDL'den yağ asitlerini kopararak hücre içine girmesini kolaylaştırır. Bu gibi yetenekleri sayesinde trigliserid depolama veya depolanmış olan yağın, yağ asidi şeklinde kana verilmesi yani lipoliz/lipogenez dengesi adipositlerin temel fonksiyonlarından biridir. Yağ dokusu insanlarda serbest yağ asitlerinin ana kaynağıdır. Negatif enerji dengesi durumunda adipositler trigliserid depolarını kaybeder. Yağ hücreleri enerji depolama ve üretme görevlerini yerine getirirken pek çok sistem tarafından kontrol edilmektedir. (44)

Yağ dokunun temel metabolik görevleri (Resim 1);

- 1) Lipid metabolizması
 - a. Fazla enerjinin trigliseridlere çevrilerek depolanması
 - b. İhtiyaç durumunda depo trigliseridlerin yağ asitlerine dönüştürerek kana verilmesi
- 2) Endokrin aktivite
 - a. Hormon metabolizması (leptin, adiponektin, resistin vs)
 - b. Büyüme faktörlerinin salınımı (IGF-1, TGF- β vs)
 - c. Sitokin üretimi (TNF- α , IL-6 vs)
- 3) Nöral yolla metabolik kontrolün sağlanması
 - a. Sempatik sinir sistemi (β_1 , β_2 , β_3 , α_1 , α_2)
- 4) İştah düzenlenmesi (leptin metabolizması)
- 5) Yapısal destek sağlamak
- 6) İmmünolojik yanıt oluşturulması (TNF- α , IL-6, TGF- β vs)
- 7) Lokal kan akımının düzenlenmesi (adenozin, anjiyotensinojen, prostoglandinler vs)
- 8) Yağda çözünen vitaminlerin depolanması (başlıca A, D, E, K vitaminleri)
- 9) Termoregülasyon
- 10) Seks hormon sentez ve aktifleştirilmesi

olarak sayılabilir. (45)

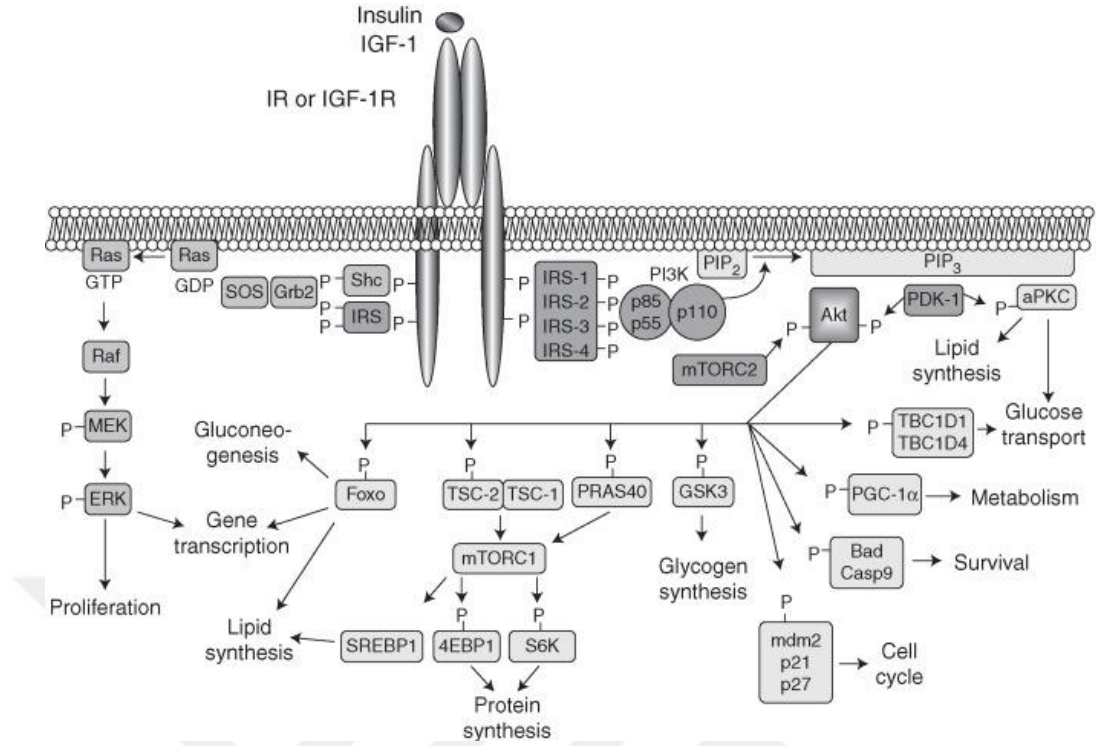


Resim 1: Yağ dokunun bazı metabolik görevleri (46)

1.1.1. Yağ Dokuda İnsülinin Yeri

İnsülin, sindirim ve metabolizmada büyük roller üstlenen pankreasın langerhans adacıklarının ortalarında yerleşik β hücreler tarafından salgılanan metabolik dengenin ana belirleyicilerinden biri olan endokrin etki gösteren bir hormondur. Üretiminde veya etki göstermesinde ortaya çıkan yetersizlikler halk arasında diyabet olarak bilinen diyabetes mellitus hastalığına yol açar. Temelde β hücelere karşı geliştirilen antikorlarla ortaya çıkan üretim yetersizliği tip I diyabet, periferik insülin direnciyle ortaya çıkan etki yetersizliği tip II diyabet olarak ikiye ayrılır. İnsülin ve IGF-1 reseptörleri yakın benzerlik gösterirler ve tirozin kinaz reseptörleri ile yakın ilişkiindedirler. Aktivasyonları hücre içinde bir dizi fosforilasyon reaksiyonunu tetikler ve bu durum Ras-MAPK ve PI3K-Akt yolaklarının aktivasyonuna neden olur. PI3K-Akt glukoz transportu, lipid sentezi, glukoneogenez ve glikojen sentezini artırmak gibi insülinin metabolik etkilerinin çoğunu kontrol eder. Ayrıca hücre döngüsü ve canlılığının sürdürülmesinde rol alır. Ras-MAPK ise hücre proliferasyonu ve gen transkripsiyonunda görev alır. (47,48)

İnsülin karbonhidrat, yağ ve protein üretimini tetiklediği için başlıca anabolik hormonlardandır. İnsülin, asetil-CoA karboksilaz indüksiyonu sayesinde yağ asitlerinin sentezini uyarmakta ve yağ doku hipertrofiniye yol açarak lipojenik aktivite göstermektedir (49,50). 2000 yılında Yüksel ve arkadaşları insülinin yağ grefti sağ kalımını artırmadaki etkisinin IGF-1 ile (40); 2010 yılında Hong ve arkadaşları ise yayınladıkları makalede insülinin yine yağ grefti sağ kalımı üzerine olan etkisinin bFGF gibi büyüme faktörleriyle benzer olduğu bildirmiştir (51). Sonuçta insülin ve IGF-1'in net etkileri lipogenez lehinedir (Resim 2).



Resim 2: Insulin ve IGF-1 reseptörleri (IR ve IGF-1R) yakın benzerlik gösterir. Uyarılmaları Ras-MAPK ve PI3K-Akt yolaklarının aktivasyonuna neden olur (47).

1.1.2. Yağ Dokuda β 1 Reseptörlerin Önemi

Yağ doku metabolizması otonom sinir sistemi sayesinde nöroregülasyonla da düzenlenmektedir. Sempatik (adrenerjik) ve parasempatik (kolinerjik) sistemin her ikisi de yağ doku lipolizini etkilemektedir (42,44). Bu mekanizmada sempatik sinir sistemi baskın olup eğilim lipoliz lehinedir. Yapılan çalışmalar bu innervasyonda sempatik sinir sisteminin baskın olduğunu göstermektedir. Bernard Slavin yayınladığı elektron mikroskopik bir çalışmada adipositlerin %3'ünün direkt innervasyona sahip olduğunu bildirmektedir (52). Sempatik sinir sisteminin lipoliz/lipogenez dengesi üzerindeki rolünün yanında yağ dokudaki hücre sayısı üzerine de etkili olduğu bilinmektedir. Sıçanlarda retroperitoneal yağ dokunun denervasyonunun doku ağırlığını ve hücre sayısını artırdığı bildirilmiştir (44). Lipid metabolizmasında rol oynayan lokal etkili hormon ve substrat konsantrasyonları da kan akımı düzenlenmesinde etkilidir (53).

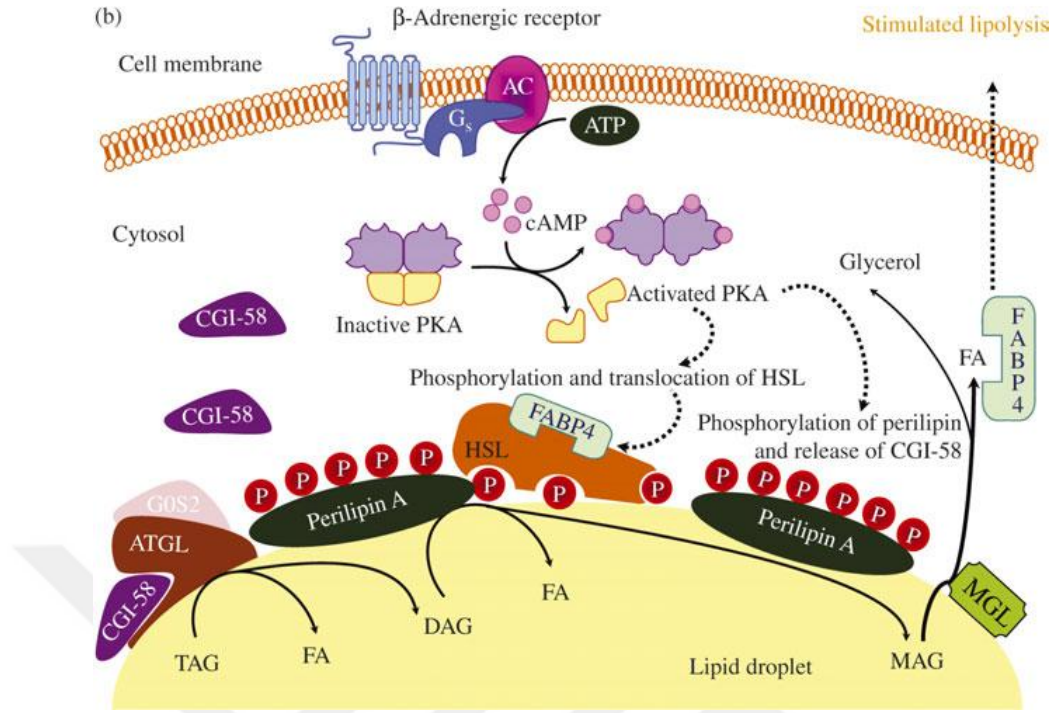
α_2 adrenerjik reseptörler antagonist etkilerinden dolayı lipogenez yönüne eğilim oluştururlar. β_1 , β_2 , β_3 adrenerjik reseptörler ise agonist etki gösterirler ve dolayısıyla lipoliz eğilimindedirler (31). Adenilat siklaz aktivasyonu ikincil haberci olarak kullanılan siklik AMP miktarını artırarak HSL'ın (hormona duyarlı lipaz) ve perilipinin forforilasyonu üzerinden lipolizi (Resim 3) başlatmaktadır (45,54). β_1 , β_2 adrenerjik reseptörler ise β_1 reseptörler daha baskın olmak üzere otonom sinir sisteminin yağ doku metabolizmasındaki nöroregülasyon görevinin temelini oluşturur (55). Net etki lipoliz yönündedir. Bu yüzden metoprolol gibi selektif β_1 reseptör blokeri ajanların yağ doku metabolizması üzerine etkisi lipogenez lehine olacaktır. 2001 yılında Ayhan ve arkadaşları buradan yola çıkarak selektif beta β_1 bloker olan metoprololün hücre membranlarında siklik AMP aracılıklı adenilat siklaz inhibisyonu üzerinden lipolizi azaltıcı (56) etkisinden yararlanıp yağ grefti sağ kalım miktarlarını insülin ile kıyaslamışlar ve metoprololün yağ grefti sağ kalımını insülininden daha fazla artırdığını bildirmişlerdir. (35).

Vücudumuzda bulunan yağ dokunun toplam hacim ve dağılım alanı olarak yüksek miktarlarda greft alınmasına uygun olması otolog yağ greftleme işlemleri için büyük avantaj teşkil etmektedir. Lokal kan akımının değişkenlik göstermesi ve nöroendokrin faktörlere verilen yanıt farklılıklarından dolayı yağ doku kompozisyonundaki adiposit oranı vücut bölgelerine değişkenlik göstermektedir. (44)

Illouz iki çeşit yağ dokusu tariflemiştir (57,58);

- a) Standart yağ doku (metabolik duruma göre hacmi değişkenlik gösterir)
- b) Depo yağ doku (malnutrisyon dışında belirgin hacim değişimi görülmez)

Bu çeşitlilik, trigliserid metabolizmasının lipoliz kısmında görevli adiposit membranında bulunan α_2 ve β_1 reseptörlerin dağılımının düzenli olmamasıyla açıklanır. Bazı hastaların pelvik, torakanterik ve uyluk bölgelerindeki yağ kitlesinin kilo vermeye rağmen azalmaması burada bulunan α_2 reseptörlerin lipolizi baskılamasıyla ilişkilendirilmiştir. Yağ grefti donor alanı olarak bu bölgelerin kullanılması bu nedenle hastaya ikincil bir yarar sağlayabilir. (59)

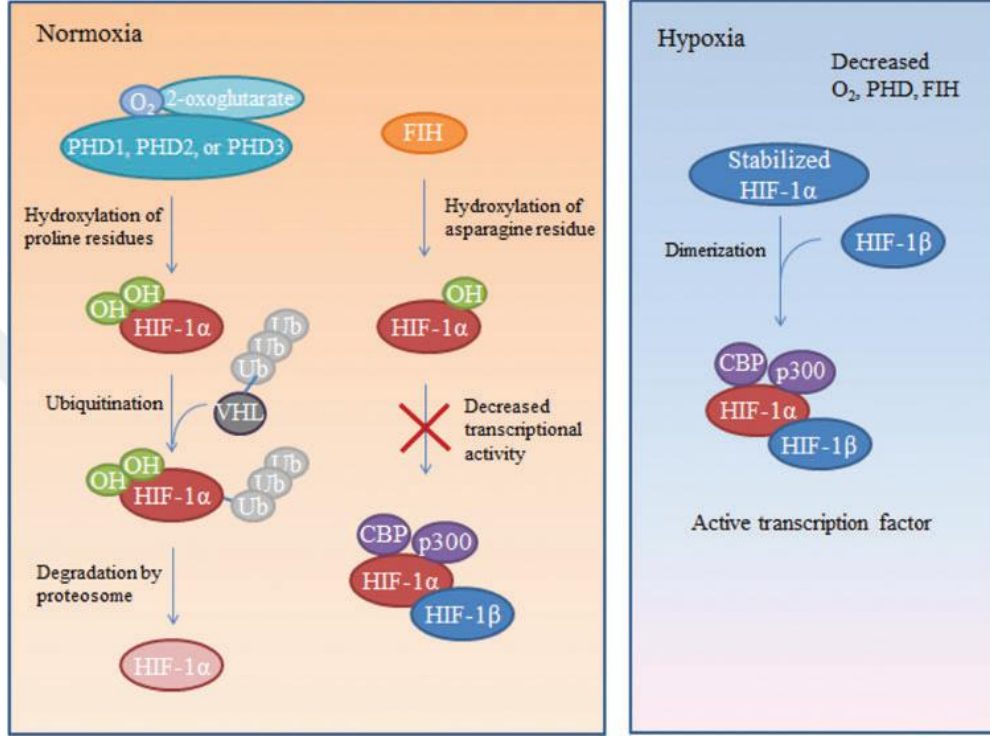


Resim 3: β_1 , β_2 adrenerjik reseptörler cAMP üzerinden HSL forforilasyonu ile lipolizi uyarırlar (45). G_s GTP-bağımlı stimulan protein, AC: adenilat siklaz, cAMP: siklik AMP, HSL: hormona duyarlı lipaz, FA: yağ asidi (fatty acid)

1.1.3. Yağ Dokuda Deferoksaminin Etkileri

HIF-1 (hipoksiyle indüklenebilir faktör), alfa (HIF-1 α) ve beta (ARNT or HIF-1 β) şeklinde iki alt birime sahip tüm çekirdekli hücrelerde bulunan bir proteindir. Alt birimleri hipoksik durumlarda hücrenin hayatta kalmasını sağlayacak yüzlerce genin transkripsiyonunu indüklemek üzere birbirlerine bağlı halde bulunurlar. HIF-1 doku hipoksisinde işleyen süreçlerde baskın rol üstlenir ve mekanizmanın merkezine oturur. HIF-1 β yapısal bütünlüğü sağlamak amacıyla yapıya katılırken HIF-1 α doku oksijenasyonuna göre değişkenlik gösterir ve hipoksi durumunda artmaya meyillidir (G51). Normoksi durumunda HIF-1 α translasyon sonrasında hızlı ve sürekli bir şekilde yıkıma uğrar. Normoksi sağlandığında prolin hidroksilaz (PHD1, PHD2, PHD3), HIF-1 α 'nın prolin rezidülerini hidroksilleyerek yıkımını başlatır. Bu HIF-1 α 'nın temel eliminasyon mekanizmasıdır. Hipoksi esnasında PHD'nin bağlanması için gereken oksijenin yokluğunda HIF-1 α stabilize olur β subunit ile birleşerek dimerize olur ve aktif

hale gelir. Bu yüzden HIF-1 etkinliği α alt biriminin ani protranslasyonel yıkımı veya stabilizasyonuna bağlıdır (Resim 4). Doku hipoksisi HIF-1 α üretimini sürekli olarak artırır. (60)

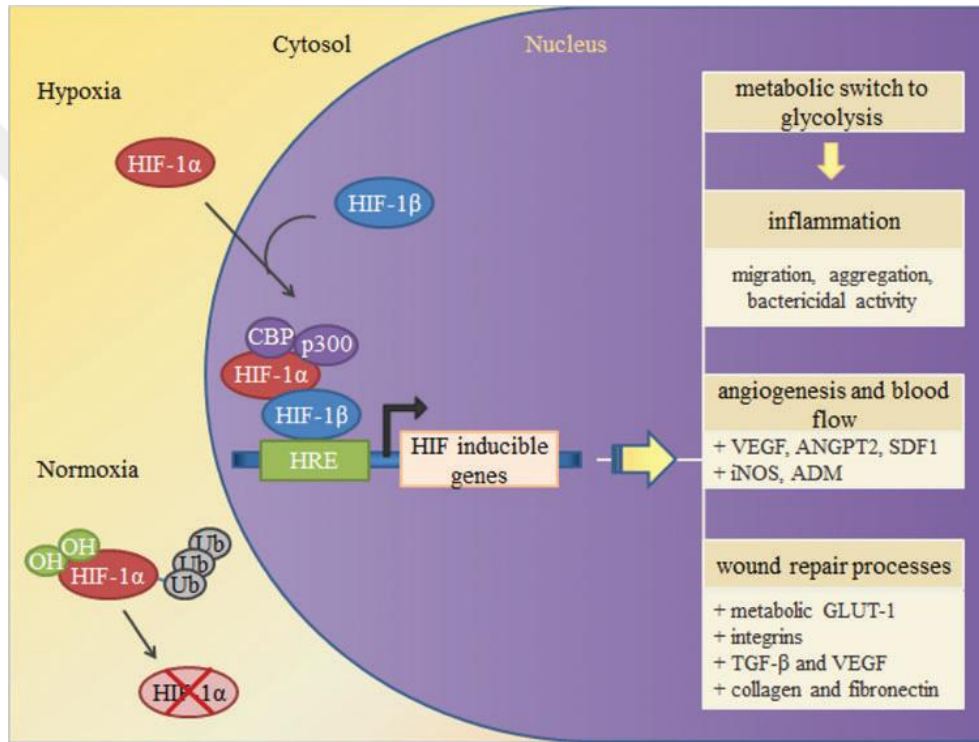


Resim 4: Normoksi ve hipoksidede HIF-1 regülasyonu (60)

Neovaskularizasyonun en önemli uyararı doku hipoksisidir ve bu mekanizmaların merkezinde HIF bulunmaktadır. Aktive edilen transkripsiyon faktörü hücre çekirdeğine taşınarak HIF ile indüklenebilir genleri aktive eder. Bu olay hücre içerisinde onlarca mekanizmanın ve bu mekanizmalarda görev alan yüzlerce genin aktivasyonu anlamına gelir (Resim 5). Net etki olarak lokal kan akımı, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez artar. VEGF başta olmak üzere birçok lokal doku faktörü, büyüme faktörleri ve sitokinler bu etkilere aracılık eder (61).

HIF-1 α yıkımında görevli PHD enzim grubunun kofaktörü demir iyonudur (62–64). Deferoksamin demir zehirlenmelerinde kullanılan demir iyonu şelatörüdür (62,64–66). İskemik dokularda uygulanan deferoksaminin HIF ve VEGF konsantrasyonlarında artışa neden olarak doku sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir (34,63). Wang ve

arkadaşları farelerde iskemik diyabetik random flep modelinde lokal deferoksamin enjeksiyonunun yüksek HIF ve VEGF seviyeleri ile neovaskularizasyonu artırdığını göstermişlerdir (67). Deferoksamin anjiyogeneze dolaylı yoldan katkısı nedeniyle daha önce yağ grefti sağ kalımı üzerine etkisi araştırılmış olumlu sonuçlar bildirilmiştir (34,65). Temiz ve arkadaşları 2016 yılında yayınladıkları bir makalede deferoksaminin HIF-1 α üzerinden dolaylı etkiyle yağ grefti hipertrofisine yol açacağı tezini savunmuşlardır (34).

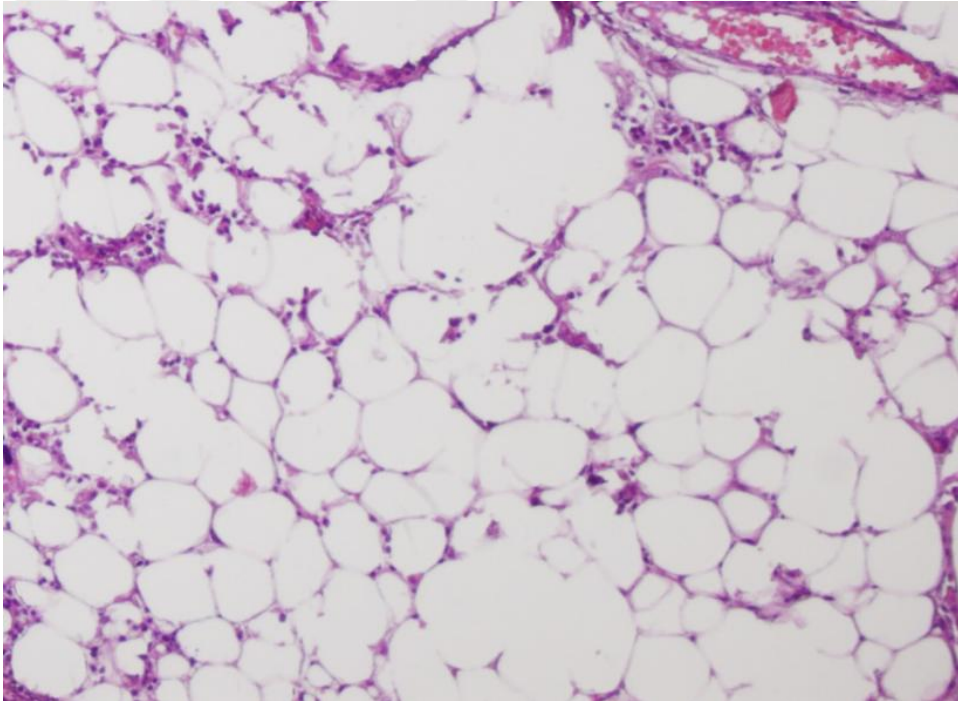


Resim 5: HIF-1 ile uyarılan mekanizmalar ilişkili genler (61)

1.2. Yağ Doku Morfolojisi

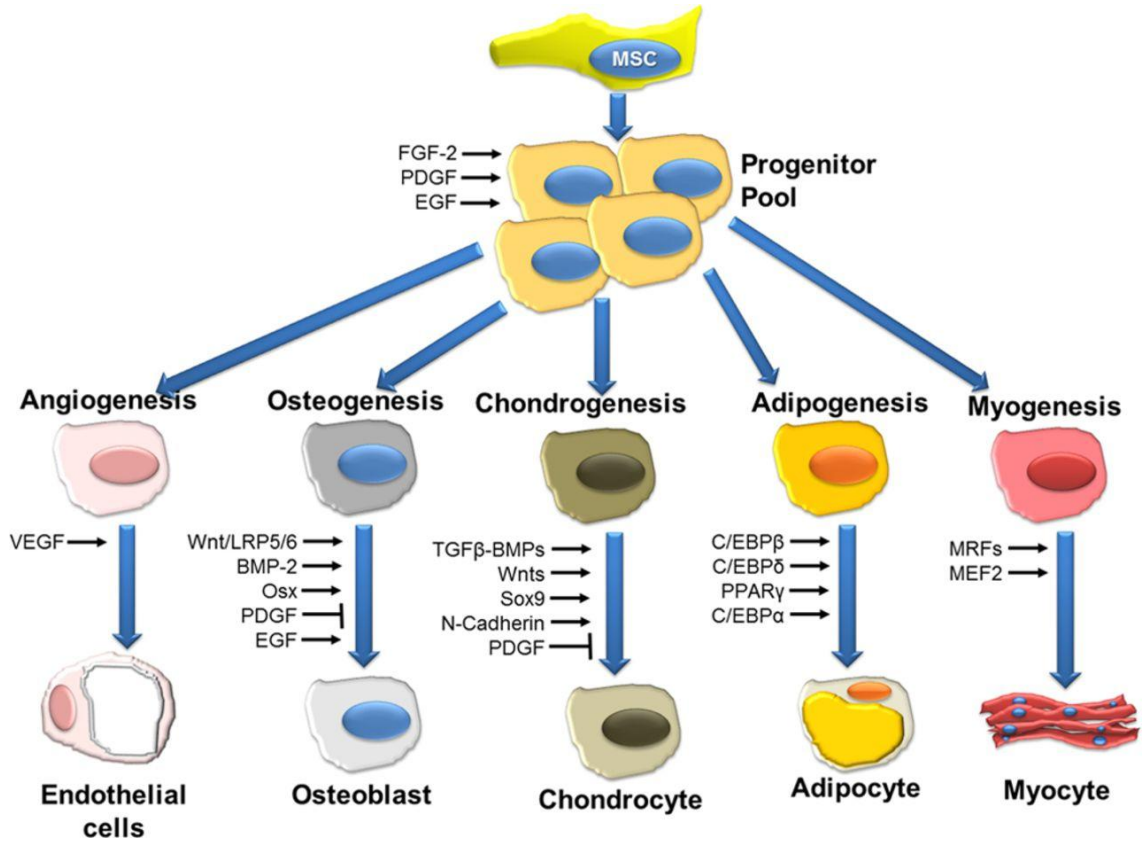
Yağ dokusu temelde adipositlerden oluşan mezenkimal kaynaklı bir dokudur. Adipositler; fibröz ağ ile çevrili ince membranlı, lipid dolu yağ hücreleridir (Resim 6). Hücrelerin boyutu 50 ile 150 mikrometre arasında değişmektedir. Yağ hücrelerinde trigliseridler lipid damlacıkları halinde depolanır ve bu damlacıklar hücrenin yaklaşık %90'ını oluşturur. Geri kalan bölümü ise hücre çekirdeği ve organelleri oluşturmaktadır (43). Lipoliz/lipogenez dengesinin yönelimine göre adipositler boyut olarak yaklaşık 20 kat, hacim olarak yaklaşık 1000 kata kadar büyüebilmektedir. Yağ dokusundaki toplam hücre sayısının %33-66'sını adipositler oluşturmaktadır (68).

Yağ doku içeriğinde adipositlerin yanısıra onları destekleyen stromal vasküler komponent denilen bir hücre grubu da barındırmaktadır. Stromal vasküler komponent; nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar, perisitler, endotel hücreleri ve kök hücrelerden oluşur (44,69). Ekstraselüler matriks adipositleri birbirine bağlar, konnektif dokunun ilave destek ağıyla yağ lobullerini oluşturur. Destekleyici liflerin yokluğunda hücreler kollaps eğilimindedir (70).



Resim 6: Yağ doku histolojik kompozisyonu (H&E boyama, x100, 7 numaralı denek, DFO grubu)

Adipoz kaynaklı kök hücreler multipotent kök hücrelerden köken almaktadır. Bu hücreler adiposit, kondrosit, osteoblast, myosit gibi mezodermal hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir (71–77). Yağ doku öncül hücreleri adipojenik seriye ait erken evre unipotent hücrelerdir. Adipogenez bu hücrelerin preadipositlere dönüşümü ile başlar (78–80). Sonrasında immatür adipoz hücrelere dönüşen preadipositler adipositlere dönüşerek olgunlaşmalarını tamamlarlar (Resim 7). Son yıllarda adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin mezoderm kökenli hücreler dışında da farklılaşma yeteneklerinin olduğu; bu hücrelerin nöral diferensiasyon dahi gösterebildiği bildirilmiştir. (81).

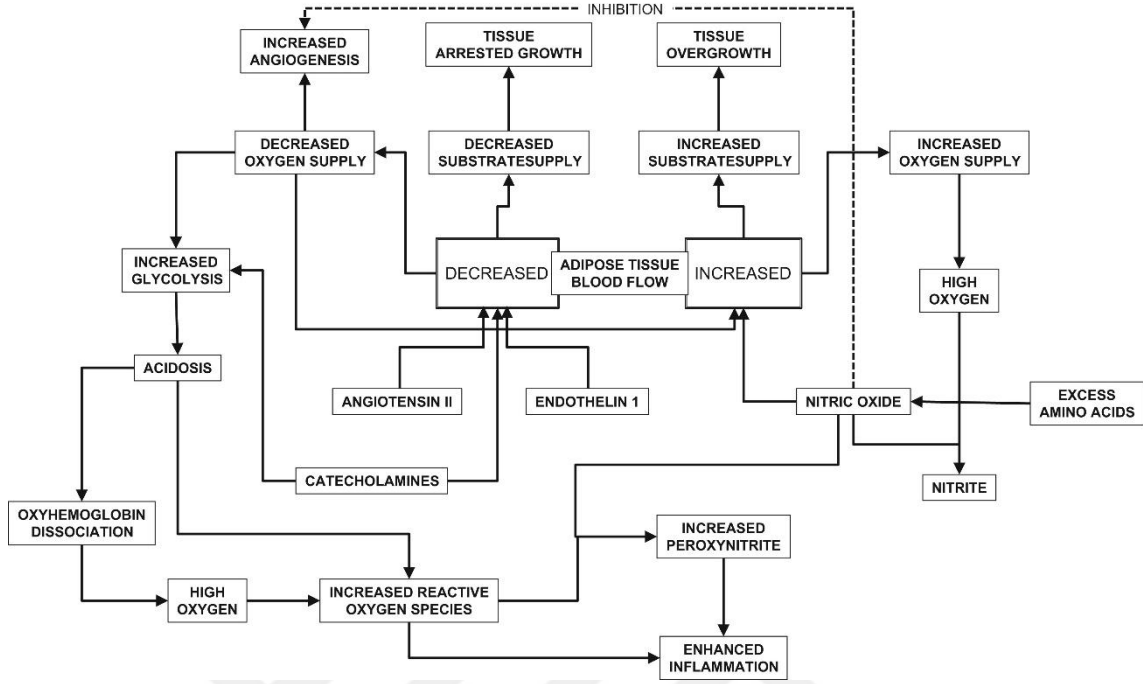


Resim 7: Mezenkimal kaynaklı kök hücrelerin farklılaşma yeteneği (82)

Yağ hücreleri pasif hücreler olmayıp, günlük enerji alımına bağlı olarak sürekli hacim değişikliği göstermekte, çeşitli sitokinler ve hormonların sentezinde rol alarak otokrin, parakrin ve endokrin etkileşimler sergilemektedir. Yağ dokusu kandaki yağ metabolizmasıyla gerçekleştirdiği lipoprotein alım, salınım ve depolama fonksiyonlarını

ancak yeterli kan desteği sağlanabilmesi koşuluyla yerine getirebilmektedir. Bu nedenle yağ doku kendisine destek olan iyi gelişmiş bir kapiller ağa sahiptir. Her bir yağ hücresi kapiller ağ ile temas edecek şekilde bu zengin vasküler ağa dahil olurlar (83). Dakikadaki kan akımı 100 gr yağ doku başına 3 mL'dir. Oysa bu miktar iyi kanlandığı bilinen kas dokusunda istirahat sırasında 1,5 mL'dir. Yağ dokunun kanlanması kişinin ağlık durumu, ağlık süresi, stres düzeyi, egzersiz ve metabolik durumu gibi değişkenlere bağlı olarak lokal, sistemik, çevresel birçok faktörden etkilenir. Kan akımının artış miktarı dört ile on kata kadar değişkenlik gösterebilir. Bütün bu mekanizmalar büyük bir uyum içerisinde eş zamanlı çalışarak bu sistemi düzenlemektedir (Resim 8). Bu uyum aynı zamanda vücuttaki enerji dengesinin düzenlenmesinde de önemli bir yere sahiptir. Bu değişimi kontrol eden başlıca faktörlerden biri yağ doku tarafından salınan hormonlardır (44). Yağ dokudan salınan hormonlara leptin örnek verilebilir. Leptin adipositlerden salınan vücut ağırlık dengesini gıda alımı ve enerji ihtiyacına göre düzenleyen; ağlık durumunda azalır, tokluk döneminde artan bir hormondur. Beyinde tokluk sinyali oluşmasını sağlar. Farelerde leptin reseptör eksikliği veya leptin eksikliğinin obeziteye yol açtığı gösterilmiştir (84).

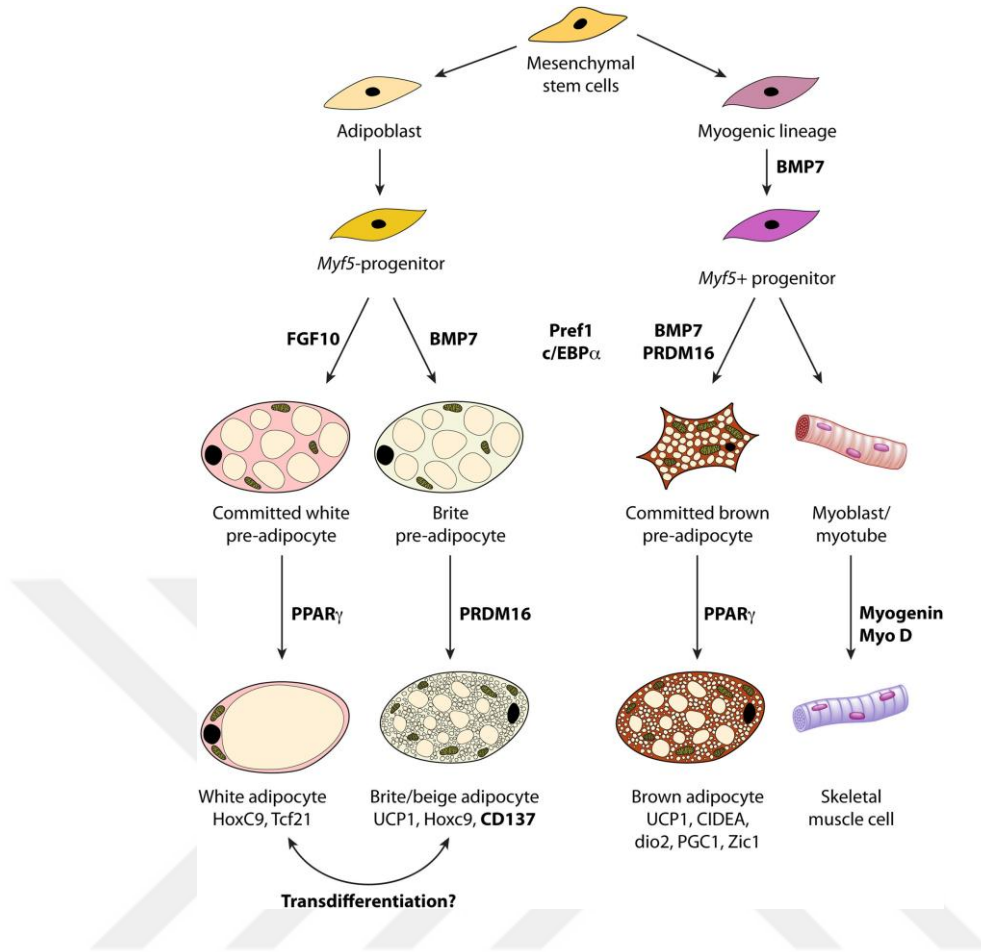
Yağ doku iyi gelişmiş vasküler ağı ve yüksek anjiyogenez yeteneği sayesinde olağanüstü rejenerasyon ve hipertrofi yeteneğine sahiptir. Bu durum yüksek miktarlarda mezenkimal kaynaklı kök hücre içermesiyle mümkün olmaktadır (42). Kök hücreler iskemik durumlarda anjiyogenik faktörler salgılayarak vasküler endotelial hücrelere dönüşürler. Yaşlılarda kök hücre sayısı azalır ve buna sekonder olarak yıkım yapımın önüne geçer ve yağ dokusu miktarı azalır. Yağ dokusu vücutta doku parsiyel oksijen basıncı en yüksek olan dokudur. Bunun sebebi olarak kapiller ağın zengin olması ve oksijen tüketiminin az olması gösterilmiştir. Adipositler yağ dokusunda iskemiye en duyarlı hücrelerken, kök hücreler ciddi iskemide bile üç gün süreyle canlı kalabilirler. Doku hasarında oluşan inflamatuvar süreçte ortaya çıkan mediyatörler nedeni ile yıkım devam eder. Ancak hasarlı hücrelerden salınan mediyatörler kök hücreleri aktiveştirerek, hem proliferasyonu tetikler hem de kök hücrelerinin salgıladığı büyüme faktörleri ile fibrogenez bastırılmaya çalışılır. Gram doku başına kan akımı kadar yağ dokuda gelişen anjiyogenez de leptin başta olmak üzere, yağ doku tarafından sentez edilen birçok doku faktörü tarafından sağlanmaktadır (44).



Resim 8: Yağ dokunun endokrinolojik rolü ve kan akımının düzenlenmesi (85)

Vücudumuzda beyaz yağ doku, bej yağ doku ve kahverengi yağ doku olmak üzere üç tip yağ doku bulunmaktadır. Kahverengi yağ dokusu hücreleri içerdiği çok sayıda mitokondrileri, erişkinde çok az sayıda bulunması ve termoregülasyonda görev alması ile görev ve köken bakımından beyaz yağ dokusu hücrelerinden farklıdır (Resim 9).

Beyaz yağ dokusu, visseral yağ dokusu ve deri altı yağ dokusu olmak üzere ikiye ayrılır. Visseral yağ dokusu bütün yağ dokunun yaklaşık %10'udur ve yaşlanma ile bu oran %20'ye kadar yükselebilir. Deri altı yağ ve visseral yağ arasında hücre büyüklüğü, membran reseptörleri, kana yağ asidi salgılama ve yağ depolama fonksiyonları bakımından farklılıklar vardır. Örneğin visseral yağ dokusundan IL-6 salgılanması deri altı yağ dokusuna göre 2-3 kat daha fazladır. Visseral yağ dokusunun venöz drenajı portal sistemidir. Salgılanan yağ asitleri doğrudan karaciğerde glukoneogenezle diğer enerji kaynaklarına dönüştürülebildiği gibi lipoproteinlere dönüştürülerek tekrar dolaşıma katılabilir. (31,86)



Resim 9: Beyaz, bej ve kahverengi adipositlerin kökeni (86)

1.3. Otolog Yağ Doku Greftleme Cerrahisi

1.3.1. Tarihsel Gelişim

Yağ greftlerinin rekonstrüktif ve estetik cerrahideki kullanımı yüz yılı aşkın bir geçmişe sahiptir (Resim 10). 1893 yılından günümüze kadar uzanan bu süreç Mojallal tarafından tarihsel olarak üç ana döneme ayrılmıştır (87).

I. Dönem: Açık Cerrahi Dönemi (1893-1977)

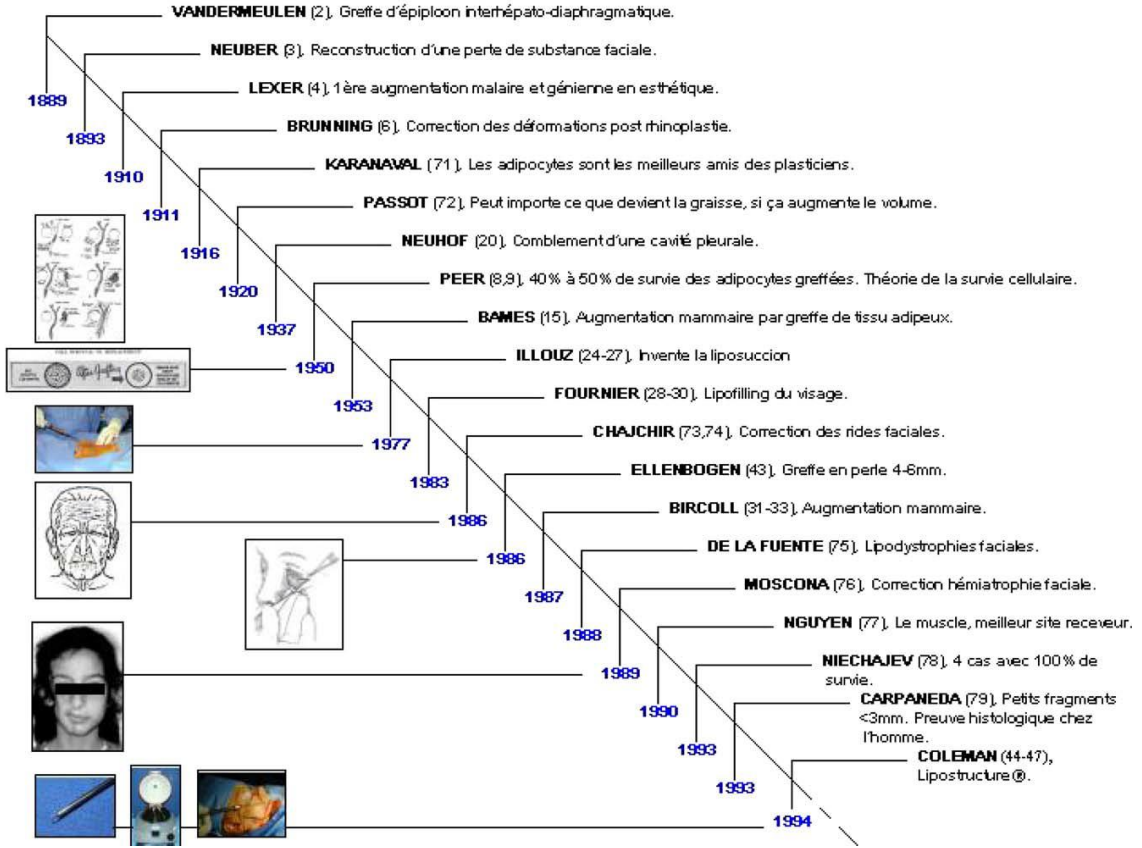
- ✓ Lipoaspirasyonun keşfinden önceki yağ dokunun herhangi bir değişiklik olmadan tek parça transplantasyonunu temsil eder.

II. Dönem: Rafine Edilmemiş Dönem (1977-1994)

- ✓ Lipoaspirasyonun keşfinden sonraki travmatik, rafine edilmemiş dönemi temsil eder.

III. Dönem: Rafine Dönem (1997-Günümüz)

- ✓ Sydney Coleman'ın atravmatik tekniğinin popülerleşmesinden sonraki rafine dönemi temsil eder.



Resim 10: Yağ Dokusu Greftlemesinin Tarihsel Gelişimi (87)

Bilinen ilk otolog yağ grefti uygulaması 1893 yılında modern asepsi prensiplerinin babası olarak kabul edilen 'Operasyon Odası' kavramının mucidi Alman Plastik Cerrah Gustav Adolf Neuber (1850-1932) tarafından orbita çevresinde tüberküloza bağlı geçirilmiş osteomyelite ikincil doku defekti ve nedbeleşmeyi tedavi etmek amacıyla koldan orbita bölgesine yağ doku naklidir. Yine aynı dönemde Neuber

sifilize ikincil ‘eyer burun’ deformitesini aynı yöntemle tedavi etmeye çalışmıştır. Büyük hacimli uygulamalarda tama yakın kayıp yaşadığını bildirmiştir (1–7,88).

İki sene sonra 1895 yılında Viktor Czerny (1842-1916) tarafından yapılan tek taraflı kısmi mastektomiye bağlı gelişen meme asimetrisini düzeltmek amacıyla hastadan çıkarılan lipomun yine aynı hastaya nakli gerçekleştirilmiştir (13,87,89). 1908 yılında bu yöntem Strasbourg’dan Martin Bartels ve Londra’dan ‘güzellik cerrahı’ (“beauty surgeon”) Charles Willi tarafından yüz ve meme estetik prosedürlerinde augmentasyon amaçlı kullanılmıştır (88). Ancak yağ dokunun hızlı rezorpsiyonu nedeniyle çabucak terkedilmiştir. Lexer, 1910 yılında Neuber’in tekniğini modifiye ederek tek parça büyük blok halinde yağ greftiyle çene ve yanak augmentasyonu uygulamış ve erken ve geç dönemlerde tatmin edici sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir ancak aynı dönemde Lexer’in modifiye ettiği tekniği uygulayan cerrahlar onun uzun dönemdeki tatmin edici sonuçları yerine greftlerin oldukça yüksek oranlarda rezorbe olduğunu bildirmişlerdir (17,87,90). 1911 yılında Bruning subkutan plana yağ enjeksiyonunu deneyen ilk cerrah olmuştur (17,88,90). Başlangıçta başarılı sonuçlar bildirirse de vakalar dramatik rezorpsiyonla sonuçlanmıştır (17,88). 1914 yılına gelindiğinde kraniyofasiyal cerrahiden, meme rekonstrüksiyonuna ve hatta cerrahiye ikincil gelişen ankilozda eklem hareket açıklığını artırmak amacıyla yağ grefti uygulamaları rapor edilmiştir (88). 1956 yılına ait bir makalesinde Lyndon Peer serbest yağ greftlerinde ortalama adiposit sağ kalımının %50 civarında olduğunu bulmuş ve greftin travma ve mekanik kuvvetlere maruz kalmasının greft hacim kaybıyla doğru orantılı olduğunu bildirmiştir (17,91).

Yağ greftleme üzerine yapılmış olan ilk çalışmalarda erken dönemde olumlu sonuçlar bildirilse geniş greft kayıp aralığı nedeniyle ile güvenilmez bir profil çizilmiştir (6,13,20,25,28,32,34,35,38,92). Bu sonuç birçok araştırmacıyı bu oranın tahmin edilebilirliği ve artırılması üzerine çalışmalar yapmaya itmiştir (13,15,17,21–23,32,38,39,93).

1977 yılında liposakşının efektif bir yöntem olarak ortaya konması ile rafine edilmemiş dönem başlamıştır (87). İlk başta vücuttaki orantsız yağ bloklarının yok edilmesi için yaratılan tekniğin zaman geçtikçe yağ greftlemesi için ideal bir sağlayıcı olduğu ortaya çıkmıştır. İşlenmemiş yağ aspiratını ilk kullanan yine Illouz olmuştur. Illouz 1983 yılında vücut şekillendirme amacıyla yaptığı 3000 üzerinde vaka sayısıyla

5-yıllık liposakşın sonuçlarını yayınlamıştır (94). Bu yöntem modern liposakşın tekniklerinin babası olmakla kalmayıp alınan yağların çeşitli amaçlarla greft olarak kullanabilmesinin önünü açmıştır (87).

Daha sonra, 1989 yılında Fournier ‘Lipofilling’ denilen tekniğini kullanmaya başlamış ancak sonuçları ön görülemez olarak kabul edilmiştir (95).

Teknik üç aşamadan oluşmaktadır (95);

1. Düşük basınçta elle lipoaspirasyon
2. Üç dakika süren bir santrifüj
3. Çok planlı enjeksiyon

Dokuyla uyumlu, kalıcı ve doğal görünümlü sonuçlar elde edilen bu teknik uygulama kolaylığı sayesinde hızla yayılmıştır (87).

1.3.2. Günümüz

1997 yılında ünlü plastik cerrah Sydney Coleman pek çok cerraha ulaşip popülerleşen tekniği ‘Lipostructure’ (96,97) ile rafine dönem olarak adlandırılan üçüncü dönemi başlatmıştır (87). Böylece modern anlamda yağ greftleme tekrar popülaritesini kazanmakla kalmayıp belki de günümüzde en sık uygulanan ve üzerinde en çok çalışılan yöntem ünvanını elde etmiştir (13,14,29).

Yöntemin popülaritesi onarım cerrahisinin ‘benzeri benzeriyle onar’ temel prensibi dolayısıyla 21. yüzyılın ilk yarısıyla birlikte plastik cerrahi önderliğinde tüm tıbbi branş ve uygulamalarda zamanla artan bir ivme göstermiştir (6,12–17). Yağ greftleri; skar iyileştirme, yüz gençleştirme, kontur düzeltme, doku defektlerinin onarımı, yüz, meme, kalça gibi bölgelerde estetik amaçlı projeksiyon artışı, radyoterapi görmüş ciltlerde görülen sertleşmeyi gidermek gibi durumlarda başarıyla kullanılmıştır (1,6,7,9,12,13,15,18,22,30–32,93).

1.3.3. Yağ Grefti Sağ Kalım Teorileri

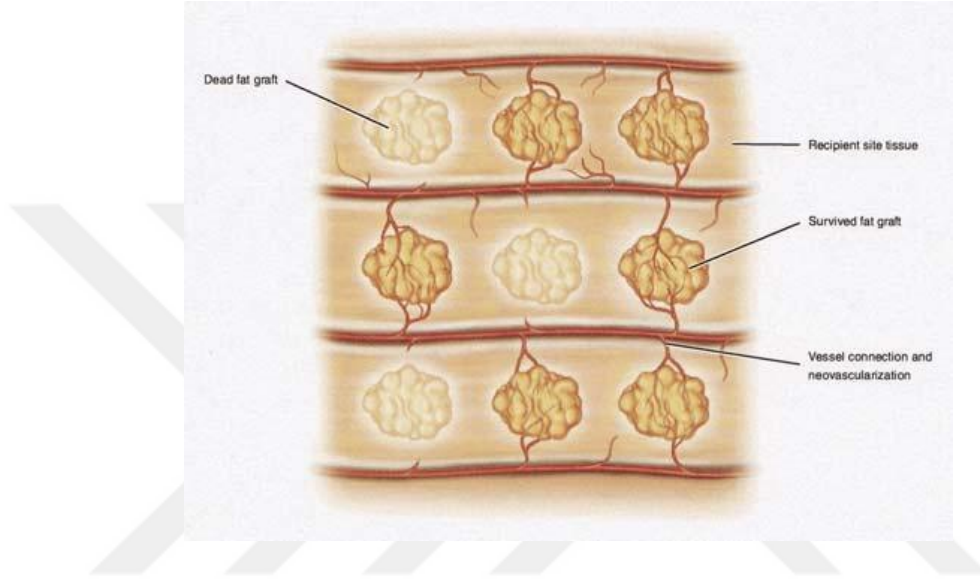
Yağ greftinin nasıl canlı kaldığı, rezorpsiyonunu etkileyen faktörler plastik cerrahide yüzyılın sorusu olmuştur. Konu üzerine yüzlerce araştırma yapılmış birçok teori ve model oluşturulmuştur (33). Bunlardan bazıları geniş kabul görmüş olmasına karşın hiçbiri konuya kesin açıklama getirememiştir. Bu başlık altında üzerinde en çok

görüş birliğine varılmış iki teorem incelenecektir. Bunlardan ilki Lyndon Peer tarafından 1950 yılında ortaya atılan Hücre Sağ Kalım Teorisi (Cell Survival Theory) (98) üzerinden Zhao ve arkadaşları tarafından (4) geliştirilen Greft Sağ Kalım Teorisi'dir (Graft Survival Theory). İkinci teorem ise Suga ve arkadaşları tarafından adipoz kaynaklı kök hücrelerin tanımlanması ve davranışlarının kısmen anlaşılmasıyla birlikte ortaya çıkan Greft Dönüşüm Teorisi'dir (Graft Replacement Theory) (99). Güncel bilgiler bu teorilerde anlatılan mekanizmaların hepsinin birlikte yağ grefti sağ kalımını etkilediği yönündedir. Bazı hastalarda greft sağ kalımı baskın gelirken bazılarında greft dönüşümü daha ön plana çıkabilmektedir (24).

Peer'ın çalışmasında sağ kalım, transplantasyon sonrası 1. yılda yaklaşık %50 olarak raporlanmıştır. Çalışmaya göre sağ kalım mekanizması yağ grefti ile alıcı kan damarları arasında erken dönemde gelişen anostomozların sağladığı kan dolaşımından temel almaktadır. Dolayısıyla greftleme işleminin başarılı olabilmesi için en temel şart greftin alıcı sahaya yerleştirilmesi esnasında canlılığının olabildiğince yüksek tutulmasıdır. Bu nedenle yağ grefti mümkün olan en aravmatik teknikle alınmalı ve yağ, serum, hücresel debris ve kan hücrelerinden arındırılarak en saf hale getirilmelidir (18). Carpenada ve Ribeiro alıcı alandaki vaskülarize dokuyla temas eden greftin yalnızca en dıştaki 2 mm'lik kısmının plazmatik imbibisyon sayesinde canlı kaldığını göstermiştir (100). Dolayısıyla enjeksiyon çok planlı (multiplanar) yapılmalı ve her seferinde küçük miktarda yağ grefti verilmelidir. Bu şekilde alıcı alanla greft arasında mümkün olan en yüksek temas alanı sağlanmış olur (4).

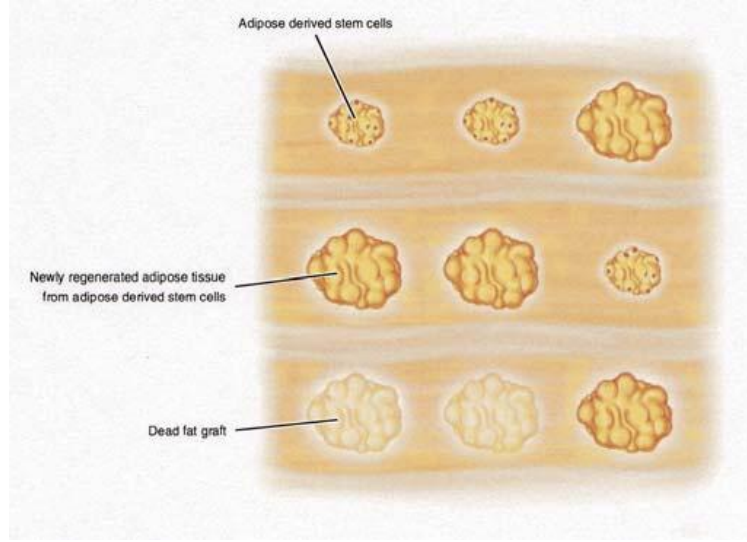
Yakın zamanda Zhao ve arkadaşları transgenik işaretli fareler üzerinde yapılan deneysel bir çalışmayla yağ greftlerinin aktarıldığı sahada gerçekten sağ kalıp kalmadığını göstermek için rastgele birbiriyle eşleştirilmiş iki transgenik fare çeşidi kullanmıştır. Her çift diğerinden yağ grefti alacak şekilde her fareye diğerinden alınan 0,2 mL yağ grefti sırt bölgesine yerleştirilmiştir. 3. gün, 7. gün, 2. hafta, 4. hafta, 2. ay ve 4. ay doku örnekleri alınmış ve bunlar değerlendirilmiştir. Farklı renkler ile kodlanan yağ greftleri gerçekten de aktarım sonrası sağ kalmış ve yapılan CD34 immunhistokimyasal boyamaları ile verici kaynaklı adipositlerin alıcı kaynaklı damarlanmalarla sağ kaldığı gösterilmiştir (4). Değişik zamanlarda alınan örneklerde yağ greftinin yara iyileşmesi aşamalarından (inflamasyon, proliferasyon, maturasyon) geçtiği gözlenmiştir. Bu çalışma yağ greftinin alıcı sahada revaskülarizasyon sayesinde

hayatta kaldığını kanıtlayarak in vivo transplantasyonlar sonrasında yağ greftlerinin nasıl sağ kaldığını anlamamızı sağlamıştır. Sonraki zaman içerisinde greft sağ kalım teorisi bu önemli deneysel çalışma üzerine bina edilmiştir (Resim 11). Ancak bu teori yağ grefti uygulamaları sonrası klinik gözlemlerimizi tamamen açıklamak için yeterli değildir. Bu yüzden in vivo transplantasyon sonrası yağ grefti sağ kalımında farklı mekanizmaların da olması mümkündür (24).



Resim 11: Greft Sağ Kalım Teorisi (24)

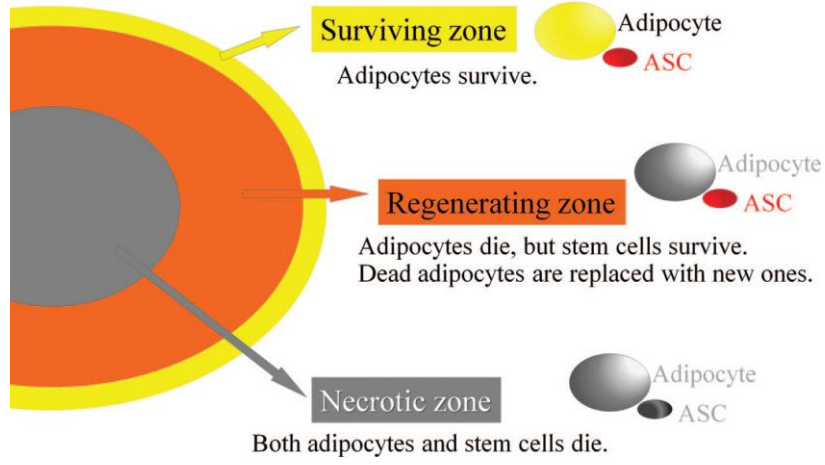
Yoshimura ve arkadaşları tarafından farelerin kasıklarındaki yağ yastıklarında cerrahi olarak oluşturulmuş iskemi modelinde farklı hipoksi derecelerindeki iskemik değişiklikler incelenmiştir (99). Şiddetli iskeminin bütün adipositlerde dejeneratif değişikliklere sebep olduğu bulunmuştur. Yağ yastığındaki adipositler iskemik koşullarda kolayca canlılıklarını yitirirken adipoz kaynaklı kök ve öncül hücreler iskemik koşullarda sağ kalarak doku onarım mekanizmalarını aktifleştirmişlerdir. Aynı yazarlar takip eden çalışmalarında adipositlerin erken ölümünü ve adipoz kaynaklı kök ve öncül hücrelerin aktivasyon ve rejenerasyonuyla replase olduklarını kanıtlamışlardır (101). Bu bulgulardan yola çıkarak Yoshimura ve arkadaşları greft dönüşüm teorisini (Resim 12) geliştirmiştir (24).



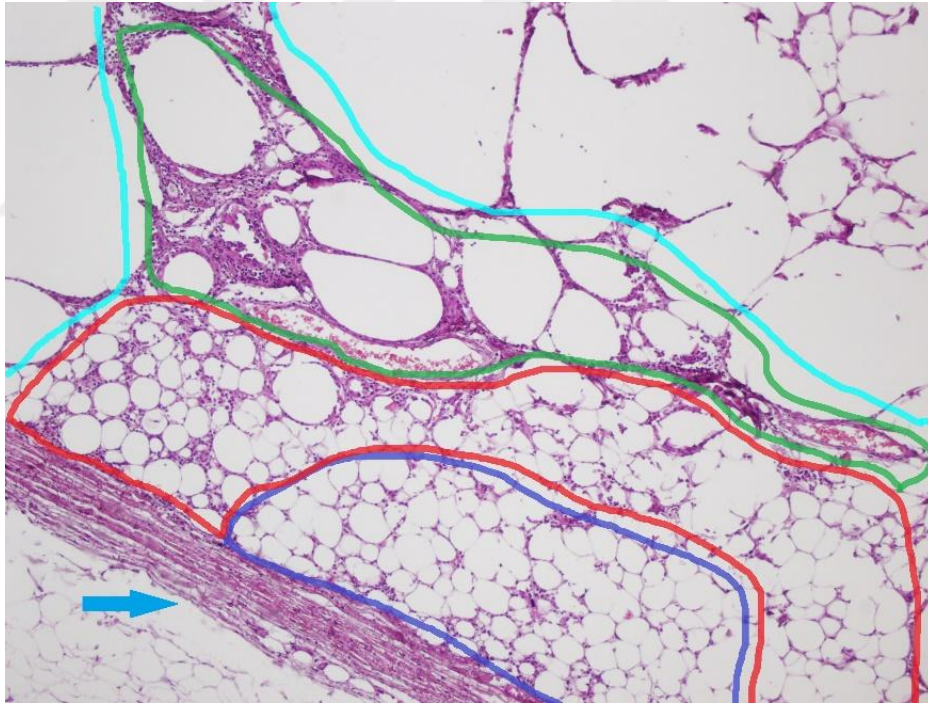
Resim 12: Greft Dönüşüm Teorisi (24)

Bu konuda mihenk taşı olarak kabul gören deneysel çalışmada araştırmacılar, adipositlerin çoğunun ilk 24 saatte öldüğünü sadece alıcı dokuya komşuluk eden 300 µm mesafedeki adipositlerin bazılarının sağ kaldığını göstermişlerdir (101). Öncül hücre sayısının 3. günde anlamlı olarak arttığını ve 7. günde canlı adiposit sayısının belirgin yükseldiğini bildirmişlerdir. Bulgular 3. Ve 7. günler arasında adipositlerin onarım ve rejenerasyonunun başladığını göstermiştir. Çalışma yağ dokunun onarım sırasında dinamik bir rejenerasyon sürecinden geçtiğini ortaya koymuştur. Çalışmada greftte dıştan içe doğru histolojik olarak üç ayrı bölge izlenmiştir (Resim 13, 14). Adipoz kaynaklı kök ve öncül hücrelerin greftleme sonrası 3. günde başladığı; 7. günde adipogeneze dönüşen süreç 3. ayda sona erer. Ancak lipid damlacıklarının rezorpsiyonu 9. aya kadar devam eder (Resim 15). Lipid damlacıkları makrofaj fagositozuyla rezorbe edilir ancak rezorpsiyon oldukça yavaş seyrederek ve bu süre damlacığın çapının büyüklüğüne bağlıdır. Lipid damlacığının çapı çok büyük olduğunda tam rezorpsiyon gelişmeden evvel kist duvarı formasyonu (Resim 16) gelişir ve zamanla kalsifiye olur. Hem öncül ve kök hücrelerin hem de adipositlerin yaşamını yitirdiği greftin santral alanı skar dokusu veya kist formasyonu ile iyileşir. Yağ greftinin nihai hacmi replase edilen adiposit miktarıyla ilişkilidir. Eğer greft olarak kullanılan yağ doku yalnızca küçük çaplı yağ damlacıkları içeriyorsa rezorpsiyon 3. ayda sona erer ve bu tarihten sonra greftte hacim değişikliği beklenmez. (101)

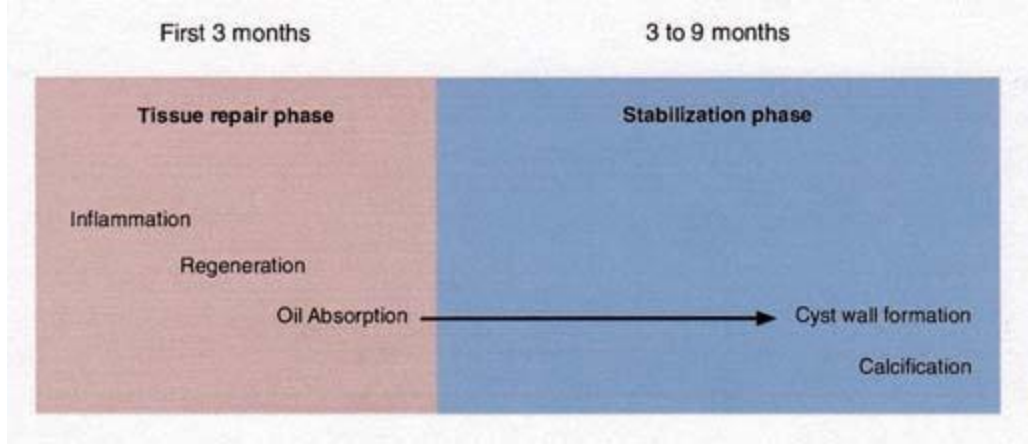
“Three zones” from the periphery after grafting



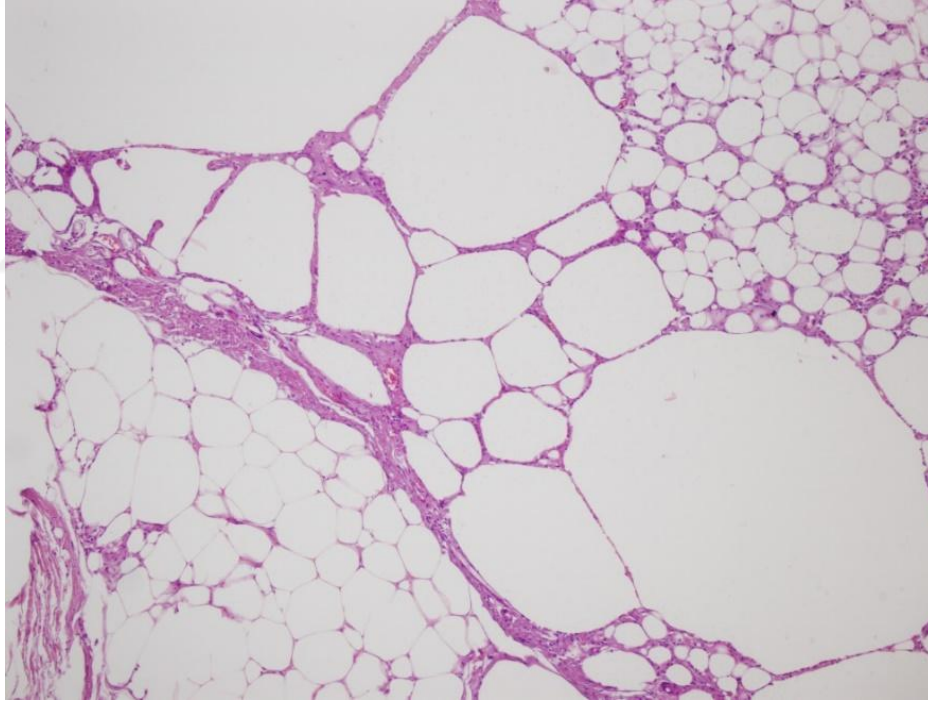
Resim 13: Üç bölge teoremi (101)



Resim 14: Yağ grefti sağ kalım sürecini ifade eden teoriye (99) uyan üç bölge; koyu mavi alan: sağ kalım bölgesi/surviving zone, kırmızı alan: adipogenez bölgesi/regenerating zone, açık mavi ve yeşil alanlar: nekrotik bölge/necrotic zone [açık mavi alan: nekrotik adipositlerden oluşan lipid damlacığı, yeşil alan: lipogranülom sahası, mavi ok: grefti çevre dokudan ayıran kapsülü] (H&E boyama, x100, 7 numaralı denek, DFO grubu)



Resim 15: In vivo yağ grefti transplantasyon sekansı; doku onarım fazı ilk 3 ayı kapsarken, stabilizasyon fazı 3. ayın sonunda başlar (24).



Resim 16: Kist duvarı formasyonu geliştirmeye başlamış geniş vakuoller içeren yağ nekrozu alanı (H&E boyama, x100, 7 numaralı denek, B/B grubu)

1.3.4. Cerrahi Yöntem

Cerrahi bir işlem olarak yağ grefti uygulamaları; yağ greftinin alınması, işleme tekniği ve enjeksiyonu gibi kendi içinde de birçok başlık içeren çok aşamalı bir prosedürdür. Prosedürün her aşaması pek çok farklı uygulama ve fikir ayrılıkları içermektedir. Geliştirilen tekniklerin ana hedefi adiposit sağ kalım oranını artırmak ve daha güvenilir sonuçlar elde etmektir. Uzun dönemde kalıcı ve ön görülebilir sonuçlara ulaşmak için santrifüj, bekletme, süzme veya direkt verme gibi parametreler üzerinden pek çok teknik modifikasyonların tanımlanmasına yol açmıştır ancak bariz üstünlük sağlayan bir yöntem ortaya koyulamamıştır (28,38).

Bütün farklı uygulama teknikleri ve fikir ayrılıklarına rağmen yağ dokunun bilinen en ideal dolgu materyali olması nedeniyle yağ doku grefti uygulamaları giderek artış göstermektedir (6,12–17,59).

Verici alan seçimi otolog yağ grefti başarısında rol oynamaktadır ve greft olarak kullanılacak olan yağ dokunun lipid metabolizması üzerindeki değişikliklerden en az etkilenmesi idealdir (102). Adiposit metabolizması otonom sinir sistemi sayesinde nöroregülasyon fonksiyonu gösterir (45). Bazı araştırmacılar $\alpha 2$ reseptörlerin lipolizi baskılama etkisinden yola çıkarak bu reseptörlerden zengin, diyetdeki değişikliklere dirençli, vasküleritesi az olan alanların yağ grefti donor sahası olarak seçilmesini önermektedir (59). Ancak yapılan araştırmalarda ideal donor saha konusunda fikir birliği yoktur. Coleman; donor sahanın yağ grefti uygulamalarında sonuca etki etmediğini; bu yüzden kolay ulaşılabilir ve estetik kontur sağlayacak bölgelerden yağ grefti alınmasını önermiştir (13). Yine de bazı yazarlar uyluktan alınan yağ greftlerinin daha yüksek yapısal bütünlük, daha az kist formasyonu ve nekroz, azalmış fibrozis gösterdiğinin ve karın ön duvarından alınan yağ greftlerinin artmış vaskülarite gösterdiğinin bazı deneysel çalışmalarla kanıtlanmış olması nedeniyle bu bölgelerden alınan yağ greftlerinin diğer bölgelere kıyasla üstün tutmaktadır (30).

Tümesan anestezisi liposakşın prosedürlerinde kullanılmak amacıyla ilk olarak 1987 yılında Jeffrey A. Klein tarafından geliştirilmiştir (103). Ağrıyı azaltması, azalmış kan kaybı ve işlemi kolaylaştırma gibi birçok faydası bildirilmiştir. Liposakşın öncesi tümesans anestezisi uygulandığında yağ grefti sağ kalımının artması tesadüfen keşfedilmiştir. Agostini ve arkadaşları tümesan solüsyonu enjeksiyonunun yağ dokudaki

adiposit yaşayabilirliğini kuru tekniğe kıyasla artırdığını göstermiştir (19). Epinefrin lidokainle birlikte kullanıldığında yağ doku fonksiyonlarını ve adiposit metabolik aktivitesini kalıcı olarak etkilememektedir. Lokal anestezipler arasında yalnızca artekain epinefrinle birlikte kullanıldığında yağ dokudaki adiposit yaşayabilirliğini kuru tekniğe kıyasla artıramamıştır. Diğer tüm lokal anestezipler lidokain benzeri etki göstererek adiposit yaşayabilirliğine katkı sağlamaktadır (13).

Geçmişte birçok araştırmacı yağ grefti eldesinde kullanılan vakum yardımcı liposakşın, ultrasonik liposakşın ve enjektör yardımıyla aspirasyonu adiposit yaşayabilirlik oranlarına göre kıyaslamış ve farklı izolasyon metodları kullanmaları nedeniyle kullanılan yöntemin önemli olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Yağ hücre fonksiyonları normalde sitoplazmada bulunan ve ancak hücre membranının hasarlanmasıyla hücre dışında bulunabilecek lipojenik bir enzim olan gliserol-3-fosfat dehidrogenaz enzim analiziyle değerlendirilmiş ve histolojik ve fizyolojik olarak vakum yardımcı liposakşın yöntemi ve ultrasonik liposakşın yöntemlerinin her ikisinde de hücre hasar gösterilememiştir. Bazı çalışmalar vakum yardımcı liposakşına kıyasla enjektör yardımıyla aspirasyonun daha yüksek miktarlarda canlı adiposit eldesine izin verdiğini gösterse de alıcı alan hazırlığında tümesan solüsyonu kullanıldığında hücre sayıları ve canlı hücre oranları açısından her iki yöntemde anlamlı farklılık gösterilememiştir (13,104).

Yağ greftinin alıcı alana yerleştirilmeden önce hazırlanması aşamasında, adipositler ve öncül hücreleri dışında kalan yağ, kan, serum, debris ve tümesan solüsyonu gibi hücresel olmayan bileşenlerinden arındırılması için süzme, sentrifugasyon, yıkama ve bunların birtakım türevleri şeklinde birçok yöntem tanımlanmıştır (105–107). Sentrifugasyon, klasik süzme ve yıkama gibi diğer yöntemleri kendi aralarında kıyaslayan hayvan çalışmaları anlamlı farklılık bildirmemiştir (28,36). Bazı hayvan çalışmalarında ise gazlı bezle süzmenin santrifugasyon, klasik süzme yöntemleri ve yıkamaya kıyasla daha fazla canlı hücre içererek daha yüksek olgun greft boyutlarına ulaştığı bildirilmiştir. Bu etkinin diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek miktarda stromal vasküler fraksiyon (SVF) hücreleri ve adipoz kaynaklı kök hücreler içermesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (28). Bazı insan çalışmalarında ise araştırmacılar, sentrifugasyonun yerçekiminden yararlanan süzme yöntemlerine daha tatmin edici sonuçlar ortaya koyduğunu bildirmiştir (108,109).

Ancak bazı çalışmalar bu sonucu desteklememektedir (19,110–113). Amerikan Plastik Cerrahi Derneği tarafından 2012 yılında yayınlanan ulusal konsensus anketi plastik cerrahların %45'inin yağ grefti uygulamaları esnasında yer çekiminden yararlanan metodları (%34 klasik süzme, %11 gazlı bezle süzme) kullandıklarını göstermiştir; bunu %34 ile sentrifugasyon izlemektedir (14). Hayvan ve insan çalışmaları arasındaki sonuç uyumsuzlukları nedeniyle kesin bir sonuca varmak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Yine de mevcut veriler bir araya getirildiğinde bir yöntemin diğerine bariz üstünlüğü olmadığı görülmektedir (13).

Tatmin edici sonuçlar elde edebilmek için lipoaspiratların alıcı sahaya verilmiş biçimi büyük öneme sahiptir. Künt uçlu kanüller daha az travmatik oldukları için daha çok tercih edilmektedir; keskin uçlu kanüller ise rigotomi gibi işlemlerde yapışıklıkları açmak için skarlı alanlarda daha çok kullanılmaktadır. Coleman lipoaspiratların tercih edilen işleminden geçirildikten sonra Luer-Lock enjektörlere geçirilmiş 17-gauge künt kanülle enjeksiyonunu önermektedir (18). Enjeksiyon iğne veya kanül geri çekilirken yapılmalı ve her defasında küçük miktarda yağ infiltre edilmelidir. Bu şekilde yağ greft adacıkları birbirinden ayrılarak vasküler yatakla temas en yüksek düzeye ulaşır ve yağ doku hücreleri stabilize edilerek migrasyon önlenir. Yavaş enjeksiyon hızının (0,5-1,0 mL/sn), hızlı enjeksiyonlara (3,0-5,0 mL/sn) kıyasla daha yüksek olgun greft boyutları geliştirdiği bildirilmiştir. Enjeksiyonun hızının artırılması makaslama kuvvetlerini artırarak hücre hasarını artmasına ve greft içerisine immün sistem hücre infiltrasyonunu artırarak greft rezorpsiyonunun artmasına neden olur (13).

Tavşanlarda yapılan ilk yağ enjeksiyonu deneysel çalışmaları kas içi planın daha yüksek vaskularizasyona sahip olması nedeniyle dermise kıyasla daha yüz güldürücü sonuçlar ortaya koyduğunu bildirmektedir (114). Ancak Rieck ve Schlaak artmış mobilizasyon nedeniyle kas planlarının daha az yağ grefti sağ kalımı gösterdiğini ortaya koymuşlardır (29). Glabella ve dudak gibi yüzün daha hareketli alanlarında malar bölge gibi daha az hareketli alanlara nazaran daha az tatmin edici sonuçlar gösterilmiştir (7). Subperiosteal uygulamaların da yüz güldürücü sonuçlar verdiğini bildiren çalışmalar olmasına karşın (90); insanlarda yağ grefti uygulamaları tipik olarak cilt altı yağlı doku içerisine yapılmaktadır (10). Deneysel modellerde ise greftin sağ kalımının ölçülebilir olması için alıcı sahanın yağ doku içermemesi ve hızlı ve etkin bir anjiyogenez süreci ortaya koyması, harvest (greftlerin toplanması) esnasında, disseksiyonun kolay olmasını

sağlamakta ve daha güvenilir ölçümler ortaya koymaktadır (10). Ek olarak, defekti örten ciltte travma öyküsü ve defektin büyüklüğü gibi diğer değişkenler de greft sağ kalım miktarı ve ömrünü etkilemektedir (13). Geniş yanık alanları gibi fibrotik sahalar seri yağ greftlemeleri gerektirmektedir (7,115). Alıcı saha prekondüsyonunun da yağ grefti sağ kalımında etkili olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır (65,116).

1.4. Yumuşak Doku Defektleri ve Onarımları

Yumuşak doku defektleri doğumsal ve edinsel olarak ikiye ayrılabilir. Doğumsal kaynaklı nedenlere; poland sendromu, hemifasiyal atrofi, amasti vs; edinsel kaynaklı nedenlere yaşlanma, tümör rezeksizyonu, travma vaskülitler (skleroderma), enfeksiyon hastalıkları (HIV), sendromlar (Parry Romberg Sendromu) vs. örnek gösterilebilir.

Yumuşak doku defektleri temelde subkutanöz yağ doku kaybını içeren, kontur defektleri ile sonuçlanan bir dizi fiziksel eksikliği kapsar. Kozmetik, psikolojik ve fonksiyonel sorunlara yol açabilir. Yumuşak doku defeklerine ikincil olduğu düşünülen tümör olguları dahi bildirilmiştir (117,118). Yumuşak doku onarımları plastik cerrahinin temel konularından ve sık pratiklerinden biridir. Bu amaçla enjekte edilebilir veya implante edilebilir, kalıcı veya emilebilir, otolog veya otolog olmayan pek çok materyal kullanılmıştır.

1.4.1. Dolgu Materyalleri

Günümüzde yumuşak doku defektlerinin onarımı için birçok madde denenmiş olmasına karşın defektlerin düzeltilmesinde ideal bir materyal henüz ortaya koyulamamıştır. Farklı avantajlara sahip enjekte edilebilir materyallerin üretilmesiyle minimal invazif girişimler daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. İdeal yumuşak doku onarım materyalinde aranan özellikler; doku uyumluluğu, kolay temin edilebilme, kolay uygulama, düşük maliyet, kalıcılık, karsinogenik olmama, teratojenik olmama, doğal görünüm, dağılmama veya yer değiştirmeme, morbidite oluşturmama, geniş serilerde tutarlı ve yinelenabilir sonuçlar oluşturma ve minimum yan etki şeklinde sıralanabilir. (8,17)

Geçmişten günümüze yumuşak doku defektlerinin onarımında pek çok materyal kullanılmış ancak bu kriterlerin tümünü karşılayan bir ürün ortaya koyulamamıştır. Bu materyallerin çoğunda kalıcı etki oluşturamama, yabancı cisim reaksiyonu, doğal olmayan görünüm gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca ürünlerin çoğu yüksek maliyetlidir. Otolog dokular ideal yumuşak doku materyallerinde aranan çoğu özelliği karşılayabilmektedir. Dermis ve fasya gibi dokular geniş defektlerin düzeltilmesinde uzun süre kullanılmıştır. Fakat bu dokuların elde edilmesin için ek insizyonlar gerekmekte ve bu insizyonlar skarla sonuçlanmaktadır. Bu tip otolog dokular enjekte edilebilir sıvı materyallerin akışkanlığına ve esnekliğine sahip değildir. (44)

Tarihsel öneme sahip fakat klinik kullanımı giderek azalan ürünlerden birisi saflaştırılmış sığır kollajenidir. Zyderm I ve II ve Zyplast (Inamed, Santa Barbara, CA) isminde üç ticari formu mevcuttur. Kontür düzensizliklerini gidermek amaçlı özellikle ince yüz çizgilerinin tedavisinde FDA tarafından onaylanmış ilk dolgu maddesi olmasından dolayı tarihsel bir önemi vardır. Sığır kollajeni enjeksiyon sonrası yabancı cisim granülomu oluşturabilmektedir. Bu komplikasyonların tedavisinde kullanılmak üzere üretilmiş hazır kollajenaz enzimleri bulunmaktadır. Bovine spongiform ensefalopati (deli dana) hastalığı ile ilgili kaygılar nedeniyle sığır kaynaklı kollajen kullanımı büyük oranda terkedilmiştir. (8,11)

Silikon ve kimyasal olarak benzeri materyaller geçmişte sıkça kullanılmıştır. Pek çok hastada istenilen estetik sonuca ulaşılmasını sağladığından yüksek kullanım potansiyeline sahip olmuş, düşük maliyetli ve kolay bulunabilir olmasıyla birlikte uygunsuz ve kötüye kullanımı da artış göstermiştir (17). İstenilen sonuç genellikle çoğul uygulamalar neticesinde elde edilebilmektedir. FDA onaylı iki ticari ürün bulunmaktadır. Ancak bu ürünlerin hiçbiri geç dönem komplikasyonları nedeniyle kozmetik uygulamalar için onay alamamıştır. Geç dönem komplikasyonları arasında kronik ödem, lenfadenopati, skar gelişimi, cilt ülserasyonu, ciltte incelme ve renk değişikliği ve silikonoma bildirilmiştir. Komplikasyon gelişen olguların çoğu tam düzelme için genellikle cerrahiye ihtiyaç duyarlar. Bu da hastalar için ekstra gelişecek insizyon skarı anlamına gelmektedir. Günümüzde silikon tercih edilen bir ürün değildir. (8,11)

Sentetik kalsiyum hidroksiapatit (CaHA) mikrosferleri 20 yılı aşkın süredir oral ve maksillofasial defektlerin onarımı, vokal kord paralizi tedavisi ve radyografik yumuşak doku işaretleme işlemlerinde kullanılmaktadır. CaHA enjeksiyonu sonrasında doku histiyosit ve fibroblastları uyarılarak kollajen matriks üretimi artar. Bu etki 15-24 ay kadar sürer. Zamanla mikrosferler kalsiyum ve fosfat iyonlarına parçalanarak normal metabolik yollarla elimine edilirler. Radiesse (Merz Aesthetics, Raleigh, NC) yüzde nazolabial fold augmentasyonu ve HIV ilişkili lipoatrofinin düzeltilmesi endikasyonlarıyla 2006 yılında FDA onayı almıştır. Yüzeyel enjeksiyonlarda yüksek nodül formasyonu ve yabancı cisim reaksiyonu riski mevcuttur. Nodüller masaj, iğne rigotomi veya direkt cerrahi eksizyonla tedavi edilebilir. Cerrahi eksizyonun ek bir insizyon skarı anlamına geleceği unutulmamalıdır. Kalsifikasyon veya ossifikasyon bildirilmemiştir. (8,11)

Poly-L-laktik asit; alfa hidroksiasit ailesinden sentetik, canlı dokuda çözünebilir bir laktik asit polimeridir. Enjeksiyon sonrası subklinik inflamasyon ve fibroplazi geliştirerek progresif dermal hacim artışına neden olur. Sculptra (Galderma S.A., Fort Worth, TX) 2004 yılında derin kırışıklıkların ve HIV ilişkili fasiyal lipoatrofinin tedavisinde FDA onayı almıştır. Kalıcılığı 1-2 yıldır ancak klinik kullanımı terkedilmiştir. (8,11)

Hyaluronik asit (HA) ekstraselüler matriks bileşenlerinden biridir. Türevleri, doğal görünüm sağlamaları, kolay kullanımları, kalıcı olmayan etkileri ve düşük insidanslı yan etkileri sayesinde dünya çapında en popüler dolgu materyalleri haline gelmiştir. Kollajenin aksine tüm hayvan türlerinde ve mikroorganizmalarda özdeştir ve bu özelliği nedeniyle immunolojik reaksiyon oluşturmaz. Su bağlama yeteneği ile cilt turgorunun sağlanmasına katkıda bulunur. Restylane (Q-Med AB, Uppsala, SW) hayvan kaynaklı olmayan FDA onaylı ilk HA (Aralık 2003) türevidir. Sayıları onlarla ifade edilen farklı marka ve bunların farklı yoğunluk ve zincir uzunluğuna sahip yüzlerce ürünü bulunmaktadır. Akışkan özelliği nedeniyle uygulaması kolaydır, kalıcılığı ortalama 4-12 aydır. İstenmeyen etkilerinin giderilmesi amacıyla üretilmiş hazır hyaluronidaz ticari ürün formları bulunmaktadır. Ödem, kızarıklık, morarma gibi lokal yan etkileri vardır ve bunlar kollajen bazlı ürünlere göre daha sık gözlenir. En önemli dezavantajları yüksek maliyet (ülkelere ve bölgelere göre değişkenlik gösterebilmektedir) ve istenilen etki elde edildiğinde kalıcılığının olmamasıdır. (8,11)

Öz (otolog) yağ doku yukarıda belirtilen ideal dolgu materyali özelliklerinin önemli bir kısmını karşılamaktadır. Bunlar; doku uyumluluğu, kalıcılık, karsinojenik olmama, teratojenik olmama, doğal görünüm ve minimum yan etki olarak sıralanabilir (18,93). Ancak işlem sentetik dolgu materyallerinden farklı olarak verici alan gerektirdiğinden cerrahi bir operasyondur. Dolayısıyla sağ kalımın ön görülebilir olmayışı ve ek uygulamalar gerektirebilme ihtimali, işlemin; maliyeti ve uygulanabilirliği üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir (13,30).

Yukarıda da bahsedildiği üzere; düşük maliyetli, elde edilmesi ve uygulaması kolay madde ve yöntemlerin cerrahi ve klinik araştırmalarda kullanılabilirliği yüksek olduğu için deneysel çalışmaların bu tarz maddeler üzerinde yoğunlaşması uygulamaların daha geniş kabul görebilmesi açısından önem arz etmektedir. 2000 yılında Yüksel ve arkadaşları insülinin yağ grefti sağ kalımını artırmadaki etkisinin IGF-1 ile (27); 2010 yılında Hong ve arkadaşları ise yayınladıkları makalede insülinin yine yağ grefti sağ kalımı üzerine olan etkisinin bFGF gibi büyüme faktörleriyle benzer olduğu bildirmiştir (28). 2001 yılında Ayhan ve arkadaşları buradan yola çıkarak selektif beta β 1 bloker olan metoprololün hücre membranlarında siklik AMP aracılıklı adenilat siklaz inhibisyonu üzerinden lipolizi azaltıcı (62) etkisinden yararlanıp yağ grefti sağ kalım miktarlarını insülin ile kıyaslamışlardır (26). Deferoksamin, demir zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılan demiri şelatlayıcı bir ajandır (22,24,25,63). Prolil hidrosilaz enjimi HIF-1 (hipoksiyle indüklenebilir faktör) yıkıcı enzimdir ve kofaktörü demirdir (22–24). Anjiyogeneze dolaylı yoldan katkısı nedeniyle daha önce yağ grefti sağ kalımı üzerine etkisi araştırılmış olumlu sonuçlar bildirilmiştir (16,25). Temiz ve arkadaşları 2016 yılında yayınladıkları bir makalede deferoksaminin HIF-1 α üzerinden dolaylı etkiyle yağ grefti hipertrofisine yol açacağı tezini savunmuşlardır (16). Belirtilen özelliklere sahip, yağ grefti sağ kalımı üzerine daha önce yapılmış metoprolol ve deferoksaminin etkilerini karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız, insülin, metoprolol ve deferoksaminin yağ grefti sağ kalımını artırmadaki etkinliklerini kıyaslamayı amaçlamaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma öncesi İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmış ve çalışma boyunca hayvan deneyleri araştırma protokollerine sadık kalınmıştır. Çalışma ve deney hayvanlarının bakımı İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Çalışmamızda ağırlıkları $\sim 300 \pm 10$ gr arasında değişen 22 adet erkek 8-9 haftalık Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Ancak çalışma süresince hepsi birinci cerrahi işlem dolaylı olmak üzere beş denek kaybedilmiştir. Deney 17 adet denekle sonlandırılmıştır. Çalışma boyunca sıçanlar her kafeste bir hayvan olacak şekilde $21-22^{\circ}$ C oda sıcaklığında, 12 saat gündüz / 12 saat gece fotoperiyodunda muhafaza edilmiştir. %18-20 protein içeren pellet sıçan yemi ve içme suyu sağlanan 22 adet polikarbonat kafeste tutulmuştur.

Çalışma deney hayvanlarının sırtı dört ayrı kadrana ayrılacak şekilde (Resim 17) tasarlanarak tüm hayvanların tüm gruplara dahil edilmesi amaçlanmıştır (119). Böylelikle farklı maddelerin aynı genotip üzerinde denenebilmesinin önü açılmıştır. Bu da deney gruplarını daha homojen, çalışmayı ise daha güvenilir hale getirmiştir. Ayrıca bu yöntemle hayvan israfının önüne geçilerek denek sayısının çoğaltılabilmesi amaçlanmıştır.

Denekler sakrifiye edilirken greft olarak kullanılmayan yağ dokudan her hayvandan birer tane olacak şekilde alınan yağ doku biyopsisi, greft olarak kullanılmış yağ dokular arasında histolojik kıyas yapılabilmesi amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Bu grup, Öz Yağ Doku Grubu (ÖYD grubu) olarak anılmakta olup histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemelerin tamamına dahil edilmiştir (Tablo 18).



Resim 17: Deney gruplarının belirlenmesi [21: denek numarası (1-22)] (Tablo 18)

ÖYD: Öz yağ doku grubu	n=22/Denek sakrifikasyonu esnasında diğer gruplarla histolojik kıyaslama yapmak amacıyla alınan greft olarak kullanılmamış yağ doku
S: Kontrol (SERUM) grubu; her sıçanın sırtındaki sol kraniyal cepte bulunan yağ greftleri	n=22/Sol kraniyal cebe konulan yağ greft grubu
I: İnsülin (INS) grubu; her sıçanın sırtındaki sağ kraniyal cepte bulunan yağ greftleri	n=22/Sağ kraniyal cebe konulan yağ greft grubu
D: Deferoksamin (DFO) grubu; her sıçanın sırtındaki sol kaudal cepte bulunan yağ greftleri	n=22/Sol kaudal cebe konulan yağ greft grubu
B: Beta bloker (Metoprolol-B/B) grubu; her sıçanın sırtındaki sağ kaudal cepte bulunan yağ greftleri	n=22/Sağ kaudal cebe konulan yağ greft grubu

Tablo 18: Deney gruplarının belirlenmesi

Çalışmanın histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çalışma 8 temel aşamadan oluşmaktadır.

- ✓ Otolog yağ doku grefti alınması
- ✓ Yağ greftlerinin pay edilmesi ve ağırlık olarak ölçülmesi
- ✓ Yağ greftlerinin inkübasyonu
- ✓ Yağ greftlerinin belirlenen bölgelere yerleştirilmesi
- ✓ Yağ grefti olgunlaşma süreci
- ✓ Deneklerin sakrifikasyonu ve yağ greftlerinin yeniden toplanması
- ✓ Histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme
- ✓ İstatistiksel değerlendirme

Denekler çalışma öncesinde tartma işlemine tabi tutularak çalışmanın ağırlık kriteri olan $\sim 300 \pm 10$ gr ile uygunlukları kontrol edilmiştir. Deney sonuna dek sağ kalan sıçanlarda deney boyunca genel durumları ile ilgili bir probleme rastlanmamıştır. Deney 17 adet denekle sonlandırılmıştır.

2.1. Otolog Yağ Doku Grefti Alınması

Sıçanlarda cilt altı dokuda yağ grefti çalışılması için yeterli miktarda beyaz yağ dokusu bulunmamaktadır. İnsan yağ grefti modelindeki cilt altı beyaz yağ dokusunu taklit etmesi amacıyla deneklerin inguinal bölgeleri verici alan olarak seçilmiştir. Aynı zamanda cerrahi olarak ulaşılması kolay ve morbiditesinin düşük olması verici alan olarak inguinal yağ yastığının seçilmesinde etkin rol oynamıştır.

Cerrahi öncesi sıçanlara genel anestezi için 30-35 mg/kg ketamin + 10 mg/kg ksilazin karışımı karın içi zerk edilmiştir. Lokal asepsi kurallarına uygun olarak cerrahi alan olan kasık ve sırt bölgeleri traşlanmış ve povidon iyot ile temizlenmiştir (Resim

19). Cerrahi profilaksi amaçlı işlem öncesi tek doz cilt altı 150 mg/kg ampisilin + sulbaktam tatbik edilmiştir.



Resim 19: Cerrahi öncesi hazırlık

Kasık bölgesine yapılan yaklaşık bir santimetrelık kesi ile cilt altına geçilerek kasık yağ yastığı tek parça yağ doku grefti olarak alınmıştır (Resim 20). Alınan yağ greftlerinin daha sonraki ağırlık ölçümlerinde anlamlı bir sonuç elde etmek için birbirlerine eş olmasına çalışılmıştır.



Resim 20: Sıçan kasık yağ yastığı

2.2. Yağ Greftlerinin Pay Edilmesi ve Ağırlık Olarak Ölçülmesi

Birinci cerrahi işlem sırasında elde edilen yağ greftleri (Resim 21) herhangi bir işleme tabi tutulmadan önce hızlıca ve kurummasına izin verilmeden ağırlık değerleri hassas terazi (Resim 22) yardımıyla ölçülüp kaydedilmiştir. Alınan yağ doku grefti tabla üzerinde bistüri ile dört yaklaşık eşit parçaya ayrılarak inkübasyon ve transfer için hazır hale getirilmiştir. Dört parça greftin her biri ayrı ayrı hassas terazi yardımıyla ağırlık olarak ölçülerek not edilmiştir.



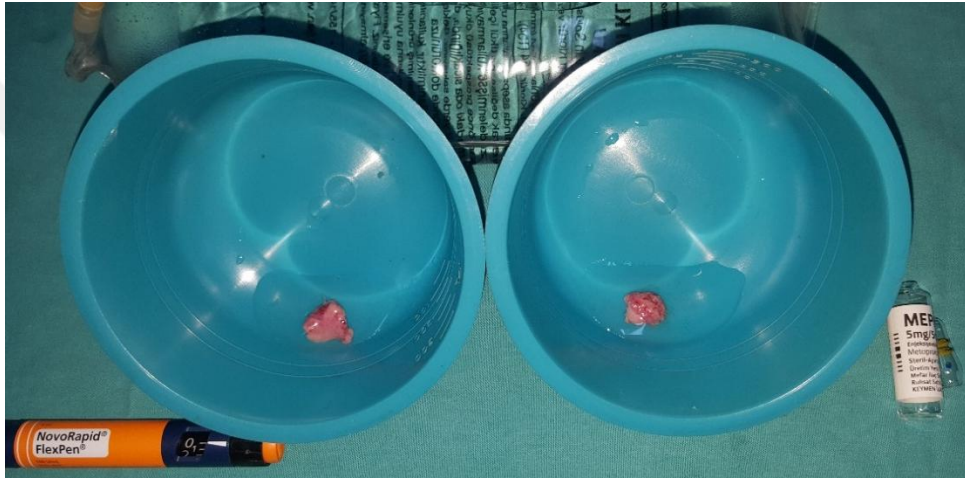
Resim 21: Çıkarılmış yağ yastığı



Resim 22: Çalışmamızda kullanılmış olan hassas terazi

2.3. Deney Gruplarının Hazırlanması ve Uygulanan İşlemler

Cerrahi işlem sırasında steril ortamda insülin ve metoprolol grubu ceplerine yerleştirilecek olacak yağ greftleri beş dakika süreyle petri kabı içerisinde sırasıyla 5 mL regular insülin (Novo Rapid FlexPen 3 mL 100 IU/mL; Novo Nordisk Sağlık Ürünleri Tic. Ltd. Şti, TR) (35) ve 5 mL metoprolol (Mepolex 5 mg/5 mL IV Enjektör Çözelti İçeren Ampul; Keymen İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti, TR) (35) içeren inkübatörde bekletilmiştir (Resim 23). İnkübasyon işlemleri Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanların vucüt sıcaklığını taklit etmek amacıyla 37 °C (35,120) ortamda gerçekleştirilmiştir.



Resim 23: İnsülin ve beta bloker solüsyonlarında inkübe edilmiş yağ greftleri

Alıcı alan olarak yağ doku içermeyen, kas fasyası üstü plan seçilmiştir. Bu sayede yağ greftlerinin cilt altı yağlı dokuyla karıştırılmaması dolayısıyla patolojik incelemenin daha objektif olması hedeflenmiştir.

Cerrahi işlem sırasında; deney hayvanlarının sırt bölgelerine yapılan dört adet yaklaşık birer santimetrelik insizyon ile kas fasyası üstü plana inilmiştir. Cilt ve cilt altı yağlı doku makas yardımı ile yaklaşık 1x1 santimetrelik alanda dekole edilerek kas fasyası üstü planda alıcı alan hazırlanmıştır. Kontrol ve deferoksamin gruplarına ait yağ greftleri herbiri kendisi için daha önce belirlenen (sol kraniyal; kontrol grubu, sol kaudal: deferoksamin grubu) alanlara işleme tabi tutulmadan ve kuruması beklenmeden yerleştirilmiştir (Resim 24). İnkübasyon işlemi sonrası; insülin ve beta bloker gruplarına

ait yağ greftleri herbiri kendisi için daha önce belirlenen (sağ kraniyal: insülin grubu, sağ kaudal: beta bloker grubu) alanlara yerleştirilmiştir. Verici ve alıcı alanlardaki kesiler emilemeyen dikişler ile kapatılmıştır (Resim 25).

Cerrahi işlem sonrası bir ay boyunca üç günde bir kez olmak üzere toplam on doz, kontrol grubuna 0,2 mL %0,9 NaCl solüsyonu, deferoksamin grubuna 0,2 mL 300 mg deferoksamin ile hazırlanmış %0,9 NaCl solüsyonu enjekte edilmiştir (34).



Resim 24: Alıcı saha; solda greftleme öncesi, sağda greftleme sonrası



Resim 25: Emilemeyen dikişler ile primer onarılmış verici saha insizyonu

2.4. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Yağ Greftlerinin Yeniden Toplanması

Cerrahi sonrası deneklerdeki yağ doku greftlerinin sağ kalımını gözleyebilmek için oniki haftalık süre beklenmiştir. Üç aylık süreçten sonra sıçanlara cerrahi işlem öncesi ötenazi amacıyla yüksek doz 150 mg/kg pentobarbital intraperitoneal enjeksiyonu uygulanmıştır. Cerrahi kontaminasyonu en aza indirmek amacıyla yüksek doz pentobarbital enjeksiyonu tercih edilmiştir. Cerrahi alan olan sırt bölgeleri tıraşlanarak povidon iyot ile temizlenmiştir.



Resim 26: Olgunlaşma sürecini tamamlamış yağ greftleri. Greft sahalarına dik uzanan yeni kan damarı gelişen alanlara dikkat ediniz.

Sıçanların sırt bölgelerinde orta hat üzerinden longitudinal kesiler yapılarak yağ greftleri ortaya koyulmuş (Resim 26), çevrelerindeki geçiş alanı ile beraber kesilip çıkarılarak hızlıca ve kurumalarına izin verilmeden ağırlık değerleri hassas terazi yardımıyla ölçülüp kaydedilmiştir.

Ötenazi uygulanan hayvanlar İÜ Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Deneysel Hayvanları Laboratuvarı tıbbi atık toplama sistemine uygun şekilde kırmızı tıbbi atık poşetlerinde uzaklaştırılmıştır.

2.5. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Toplanan materyaller öncelikle %10'luk formaldehit solüsyon içeren önceden numaralandırılmış kaplara yerleştirilerek histopatolojik inceleme için uygun muhafazaya alınmıştır. Tüm materyaller İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Formaldehit solüsyonu içerisindeki dokuların tamamı uzun aksları boyunca ikiye bölünüp ayrı ayrı kasetlenerek takip cihazına yerleştirilmiştir. Parafinize olmuş dokulardan bloklaşma işlemi gerçekleştirilerek parafin bloklardan dörder mikronluk seri kesitler lama alınmıştır. İmmünohistokimyasal inceleme için kesit alınan lamalar elektrostatik pozitif yüklüdür.

Seri kesitler sırasıyla;

1. kesit Hematoksilen&eoziin
2. kesit Perilipin
3. kesit CD34
4. kesit CD31

olacak şekilde histopatolojik ve immünohistokimyasal boyamalar için ayrılmıştır.

Dokular onar dakika sürelerle xylol içerisinde bekletilerek deparafinize edilmiştir. Deparafinize edilmiş dokular hidrasyon amacıyla sırasıyla saf alkol, %95'lik alkol, %80'lik alkol ve %70'lik alkolden onar dakika süreyle geçirilmiştir. Dokular

Meyer Hematoksilen'e alınıp on dakika boyunca tutulmuştur. Hematoksilenden çıkarılan dokular akan su altında yaklaşık olarak 5-10 dakika boyunca yıkanmıştır. Dokular eozine daldırılıp bir dakika boyunca tutulmuştur. Dokulardaki fazla eozini uzaklaştırmak için sırasıyla %70'lik, %80'lik, %95'lik ve saf alkolden geçirilmiştir. İlk 3 alkole dokular daldırılıp çıkarılırken saf alkolde on dakika tutulmuştur. Çıkış ksilölü ve kapatma aşamalarından sonra dokular kurumaya bırakılmıştır.

Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarmada dahil olmak üzere tüm immunhistokimyasal boyama işlemleri otomatik immunohistokimya boyama cihazında (VENTANA Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) gerçekleştirilmiştir. İşlem için cihaza uygun biyotinsiz HRP multimer bazlı hidrojen peroksit substrat ve 3,3'- diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (Ventana) kullanılmıştır.

Perilipin antikoru için 1/100 dilüsyon uygulanmıştır. CD31 antikoru için 1/100 dilüsyon uygulanmıştır. CD34 antikoru için 1/400 dilüsyon uygulanmıştır. Zıt boyamaları boyama cihazında hematoksilen ve mavileştirici solüsyonla tamamlanıp dehidratasyon ve ksilen aşamalarından sonra işlem sonlandırılmıştır.

2.5.1. Değerlendirme Yöntemi

Hematoksilen-eozin (H&E) boyalı kesitlerde geniş vakuoller içeren nekrotik doku artıkları olan alanlar (yağ nekrozu yüzdeleri) incelenmiştir. Immunohistokimyasal boyalı preparatlar hematoksilen-eozin (H&E) boyalı kesitlerin incelenmesine eş zamanlı olarak bakılmıştır. Değerlendirme OLYMPUS marka BX53F model ışık mikroskopunda x40 büyütmede 5x5 mm²'lik alanlar halinde tüm kesit alanını içerecek şekilde yapılarak değerler oranlanmıştır.

Perilipin lipid damlacıklarına bağlanarak yüzeylerini kaplayan böylelikle canlı adipositleri hormona duyarlı lipazın etkisinden koruyan bir proteindir. Perilipin antikoruyla yapılan immunohistokimyasal boyama yöntemi canlı adipositleri, ölü adipositlerden ayırmak amacıyla kullanılmaktadır (101). Perilipin antikoru bunu canlı adipositlerdeki lipid damlacıklarına bağlanarak yapmaktadır. Çalışmamızda perilipin ile boyanan lipoblast ve matür adiposit yüzdelerine bakılmıştır.

Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) insanlarda 17 numaralı kromozomda yer alan bir gen tarafından kodlanan bir proteindir. CD31 (cluster of differentiation 31) olarak da bilinen bu protein yaşlanan nötrofillerin eliminasyonunda anahtar rol oynar. Bu molekül çoğunlukla vasküler endotel hücre yüzey belirteci olarak bulunmaktadır (121). Bu nedenle CD31 antikoru immunohistokimyasal incelemelerde yeni kan damarı gelişiminin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (34). Çalışmamızda CD31 antikoru ile boyalı preparatlarda gruplar arasındaki yeniden damarlanma oranlarına bakılmıştır. Değerlendirmede CD31 ile boyanan alanı hiç olmayan kesitler hiç=0 (%0-10) olarak değerlendirilmiş; boyanan alan içeren kesitler zayıf=1 (%10-40), orta=2 (%40-70) ve güçlü=3 (%70-100) olarak değerlendirilmiştir.

CD34 yaygın olarak bilinen hematopoetik kök hücre belirtecidir. Yapılan çalışmalarda adipoz kaynaklı kök hücrelerin sitometrik analizlerle CD34 ekspresyonu gösterdikleri bildirilmiştir (4,122). Çalışmamızda CD34 antikoru ile boyalı preparatlarda gruplar arasındaki kök hücre içermeye oranlarına bakılmıştır. Değerlendirmede CD34 ile boyanan alanı hiç olmayan kesitler hiç=0 (%0-10) olarak değerlendirilmiş; boyanan alan içeren kesitler zayıf=1 (%10-40), orta=2 (%40-70) ve güçlü=3 (%70-100) olarak değerlendirilmiştir.

2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versiyon 21.0, 2012, Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde sürekli değişkenler için ortalama değer, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler; kesikli değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri hesaplanmıştır. Gruplardaki değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Smirnov testi ile ölçülmüştür. Sayısal veriler için bağımlı gruplarda t testi kullanılmıştır ve değişim yüzdesi için delta hesaplanmıştır. İki grup arası karşılaştırmalarda; parametrik olmayan verilerde Mann-Whitney U testi, kesikli veriler için bağımlı gruplarda McNemar testi kullanılmıştır. İki'den fazla gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik olmayan sayısal verilerde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Post-hoc analizler için Mann-Whitney U testi kullanılıp istatistiksel anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmesiyle saptanmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilerek $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak tanımlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Ağırlık Analizleri

3.1.1. Deney Öncesi ve Sonrası Ağırlık Değişimlerinin Analizi

Ağırlık değerleri için gram (gr) değişim değerleri için yüzde (%) kullanılmıştır.

Deney sonu SERUM, DFO, INS ve B/B gruplarında ağırlık deney öncesi döneme göre anlamlı (sırasıyla $p<0.010$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$) düşüş göstermiştir (Tablo 27).

	Ağırlık Değişimi (gr)			p
	Min-Mak	Medyan	Ortalama±SS	
SERUM				
Öncesi	0,34 - 1,00	0,63	0,64 ± 0,16	0,008 ^E
Sonrası	0,13 - 0,94	0,40	0,45 ± 0,22	
DFO				
Öncesi	0,42 - 1,00	0,60	0,63 ± 0,16	0,000 ^E
Sonrası	0,09 - 0,76	0,34	0,36 ± 0,15	
INS				
Öncesi	0,36 - 1,00	0,61	0,63 ± 0,18	0,000 ^E
Sonrası	0,19 - 0,56	0,40	0,39 ± 0,10	
B/B				
Öncesi	0,37 - 1,00	0,60	0,63 ± 0,16	0,000 ^E
Sonrası	0,23 - 0,76	0,42	0,42 ± 0,15	

^E Eşleştirilmiş Örneklem t test

Tablo 27: Deney öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin analizi

3.1.2. Ağırlık Değişimlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

Deney sonu greft ağırlıkları tüm gruplarda deney öncesi döneme göre anlamlı düşüş göstermesine karşın (Tablo 27); değişim yüzdelerinde gruplar arasında anlamlı ($p>0.05$) farklılık görülmemiştir (Tablo 28).

Ağırlık Değişimi (%)							
	Denek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	p	χ ²
SERUM	17	-26,65	35,32	-80,60	51,61	0,589	1,92
DFO	17	-42,03	20,90	-82,00	8,57		
INS	17	-34,34	22,84	-69,00	3,70		
B/B	17	-31,09	26,00	-71,00	20,00		

^k Kruskal-Wallis test

Tablo 28: Deney öncesi ve sonrası ağırlık değişimlerinin gruplar arası karşılaştırılması

3.2. Histopatolojik İnceleme

3.2.1. Yağ Nekrozu Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

Yağ nekrozu yüzdeleri dört deney grubu kendi arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı ($p > 0.05$) farklılık görülmemiştir (Tablo 29).

Yağ Nekrozu (%)								
	Denek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p	χ ²
SERUM	17	19,41	22,49	15,00	00,00	80,00	0,811	0,962
DFO	17	18,82	17,90	10,00	00,00	60,00		
INS	17	19,12	25,51	10,00	00,00	80,00		
B/B	17	23,82	25,40	10,00	00,00	70,00		

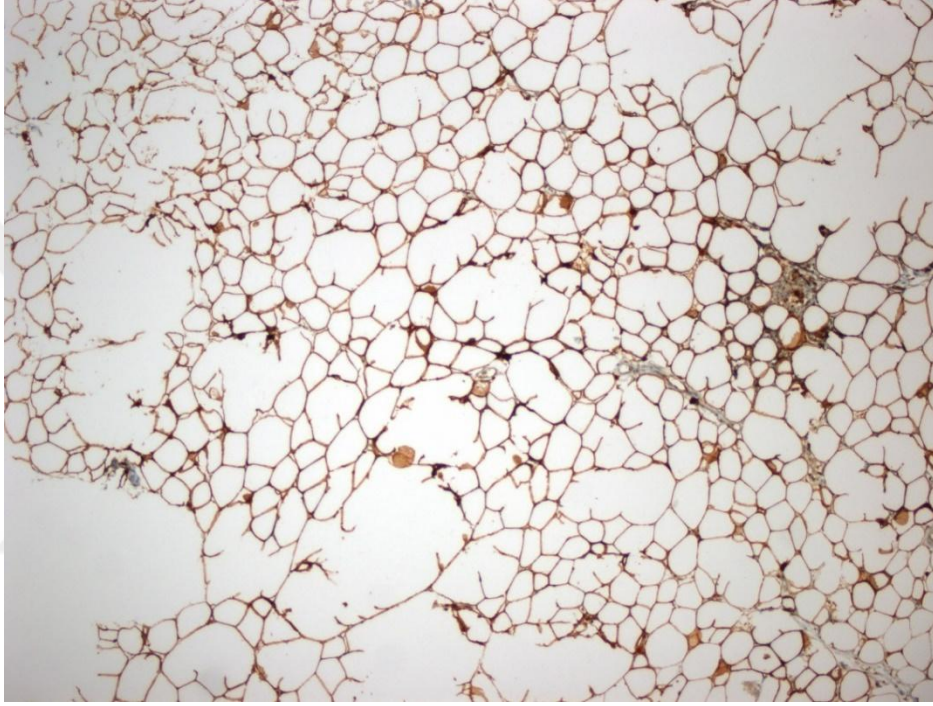
^k Kruskal-Wallis test

Tablo 29: H&E boyalı kesitlerde yağ nekrozu yüzdelerinin gruplar arası karşılaştırılması

3.3. İmmunohistokimyasal İnceleme

3.3.1. Perilipin Yüzdeleri

İncelemede immatür hücrelerin görüldüğü alanlarda perilipin ekspresyonu fokal ve zayıf olarak izlenmiştir. Perilipin pozitifliği sadece kuvvetli boyanma gösteren alanlarda pozitif kabul edilmiştir (Resim 30).



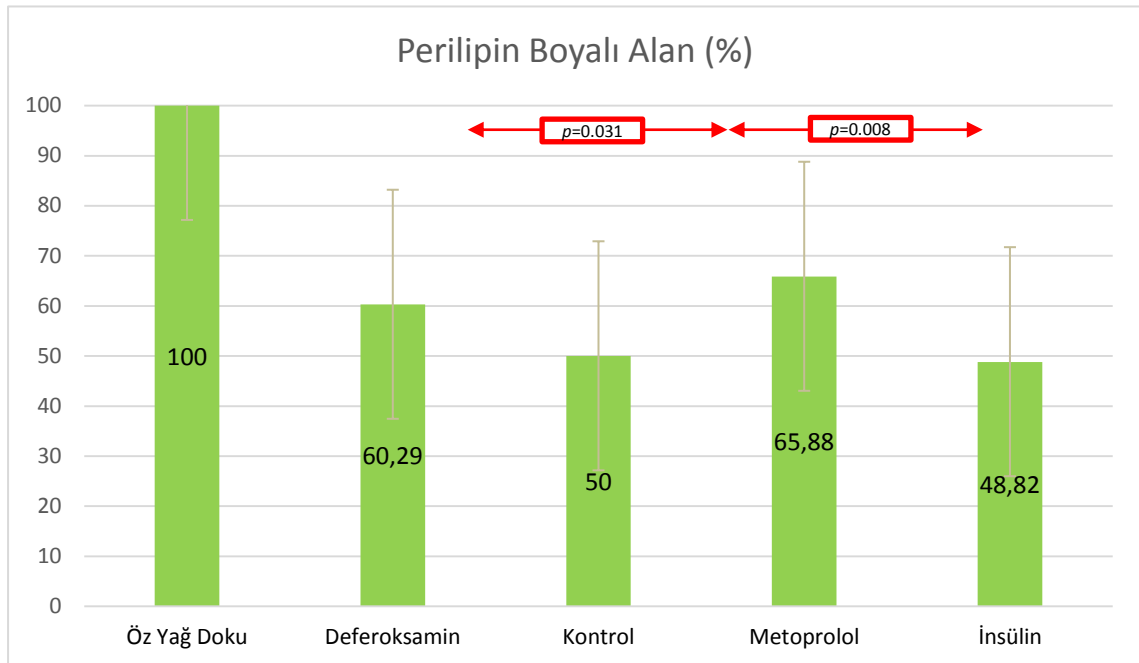
Resim 30: Perilipinle kuvvetli boyanma gösteren örnek alan (Perilipin İHK boyama, x100, 7 numaralı denek DFO grubu)

Dört deney grubu kendi arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık görülmüştür (Tablo 31).

		Perilipin Boyalı Alan (%)								
	Denek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p^*	χ^2^*	p^{**}	χ^2^{**}
SERUM	17	50,00	21,87	40,00	20,00	80,00	0,037	8,46	0,031	6,957
DFO	17	60,29	19,40	70,00	25,00	80,00				
INS	17	48,82	17,64	50,00	30,00	80,00				
B/B	17	65,88	16,22	70,00	40,00	90,00				
^K Kruskal-Wallis test			p^* SERUM, DFO, INS, B/B gruplarının kıyaslanması			p^{**} DFO, INS, B/B gruplarının kıyaslanması				

Tablo 31: Perilipin boyalı alan yüzdelерinin gruplar arası karşılaştırılması

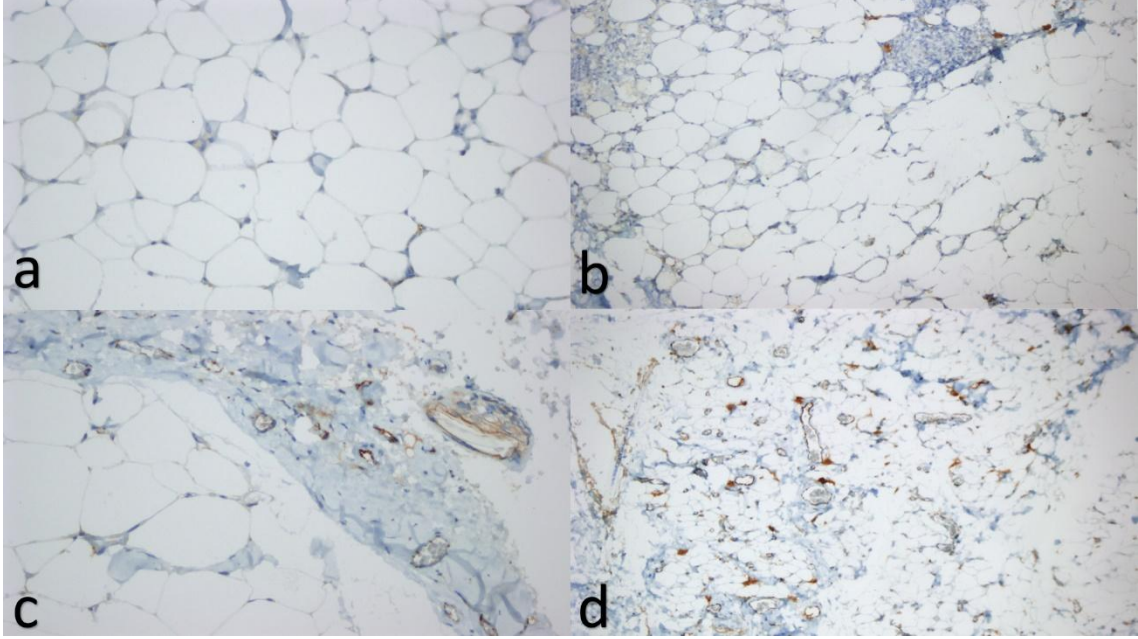
Yapılan post-hoc analizlerde B/B grubunda perilipin boyalı alan yüzdesi SERUM grubundan anlamlı ve INS grubundan daha anlamlı (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$) olarak yüksek bulunmuştur (Grafik 32).



Grafik 32: Perilipin boyalı alan yüzdeleri

3.3.2. CD31 Oranları

CD31 ile boyanan alanı hiç olmayan kesitler hiç=0 (%0-10) olarak değerlendirilmiş; boyanan alan içeren kesitler zayıf=1 (%10-40), orta=2 (%40-70) ve güçlü=3 (%70-100) olarak değerlendirilmiştir (Resim 33).



Resim 33: CD31 boyalı alanlar; **a:** hiç=0 (%0-10), **b:** zayıf=1 (%10-40), **c:** orta=2 (%40-70), **d:** güçlü=3 (%70-100) (CD31 İHK boyama, a ve c: x400, b ve d: x200, 11 numaralı denek, kontrol grubu)

ÖYD grubuyla SERUM, DFO ve B/B grupları CD31 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). ÖYD ve INS grupları CD31 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,01$). Aynı sıçandan alınan materyal CD31 açısından incelendiğinde INS grubunda boyanmanın ÖYD grubundan güçlü olduğu görülmektedir (Tablo 34, Tablo 38).

		INS				Toplam		p
		1		2 ve 3		Sayı	%	
		Sayı	%	Sayı	%			
ÖYD	1	4	26,70	11	73,30	15	100,00	0,006
	2 ve 3	1	50,00	1	50,00	2	100,00	
	Toplam	5	29,40	12	70,60	17	100,00	

^{McN} McNemar testi

Tablo 34: CD31 boyanma oranlarının ÖYD ve INS grupları arası karşılaştırılması

SERUM grubuyla DFO, INS ve B/B grupları CD31 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak SERUM grubuyla INS grubunun ikili karşılaştırmasında p değerinin anlamlıya yakın olması dikkat çekicidir (Tablo 35, Tablo 38)

		INS				Toplam		p
		1		2 ve 3		Sayı	%	
		Sayı	%	Sayı	%			
SERUM	1	4	36,40	7	63,60	11	100,00	<u>0,070</u>
	2 ve 3	1	16,70	5	83,30	6	100,00	
	Toplam	5	29,40	12	70,60	17	100,00	

^{McN} McNemar testi

Tablo 35: CD31 boyanma oranlarının SERUM ve INS grupları arası karşılaştırılması

DFO ve B/B grupları CD31 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı, INS ve B/B grupları CD31 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak çok daha anlamlı bir fark saptanmıştır (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,005$). Aynı sıçandan alınan materyal CD31 açısından incelendiğinde DFO grubunda boyanmanın B/B grubundan güçlü, INS grubunda boyanmanın B/B grubundan çok daha güçlü olduğu görülmektedir (Tablo 36, Tablo 37). Ancak DFO ve INS grupları CD31 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). (Tablo 38)

		B/B				Toplam		p
		1		2 ve 3				
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
DFO	1	9	100,00	0	00,00	9	100,00	0,031
	2 ve 3	6	75,00	2	25,00	8	100,00	
	Toplam	15	88,20	2	11,80	17	100,00	

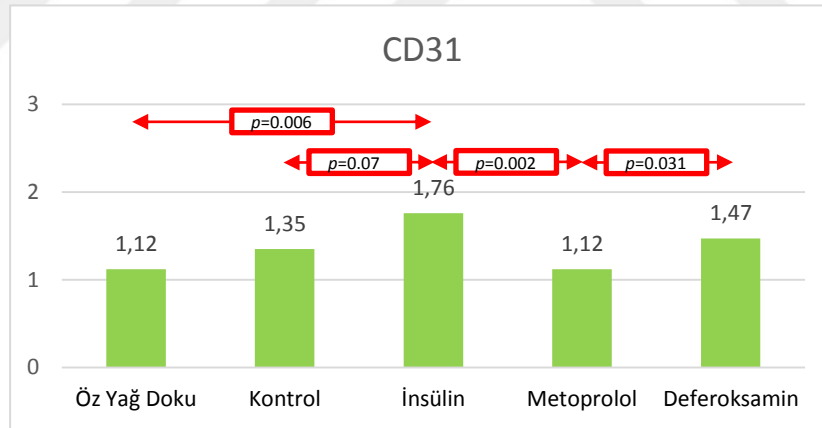
^{McN} McNemar testi

Tablo 36: CD31 boyanma oranlarının DFO ve B/B grupları arası karşılaştırılması

		B/B				Toplam		p
		1		2 ve 3				
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
INS	1	5	100,00	0	00,00	5	100,00	0,002
	2 ve 3	10	83,30	2	16,70	12	100,00	
	Toplam	15	88,20	2	11,80	17	100,00	

^{McN} McNemar testi

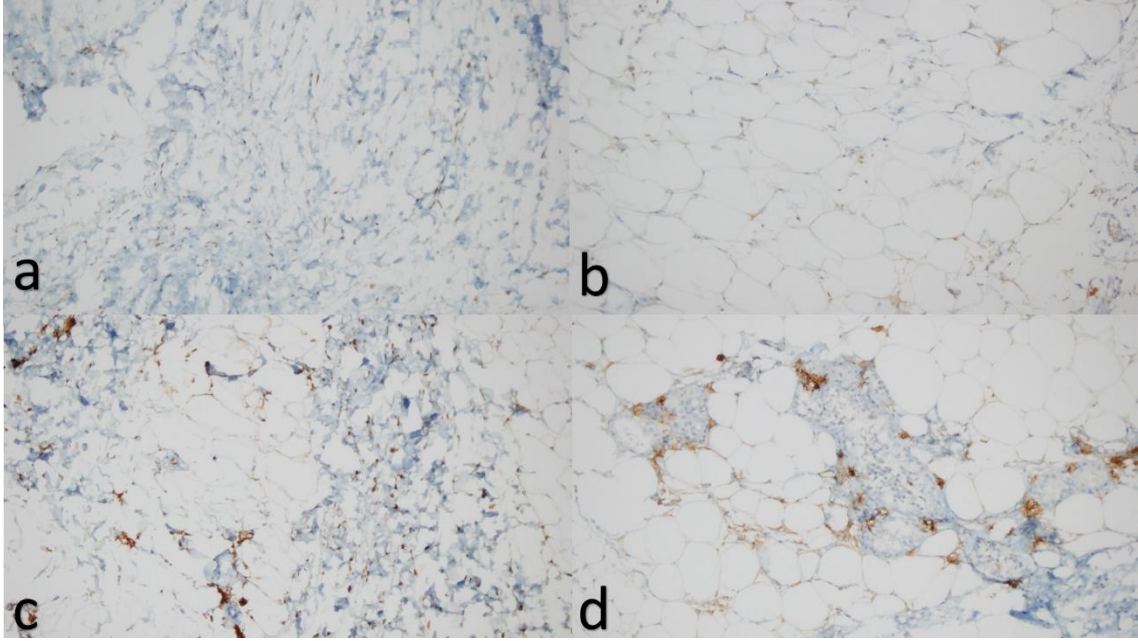
Tablo 37: CD31 boyanma oranlarının INS ve B/B grupları arası karşılaştırılması



Grafik 38: CD31 boyanma oranlarının kesitsel verilerinin gruplardaki ortalama değerleri ve diğer grupların ikili karşılaştırmasında kullanılan McNemar testleriyle elde edilmiş p değerleri

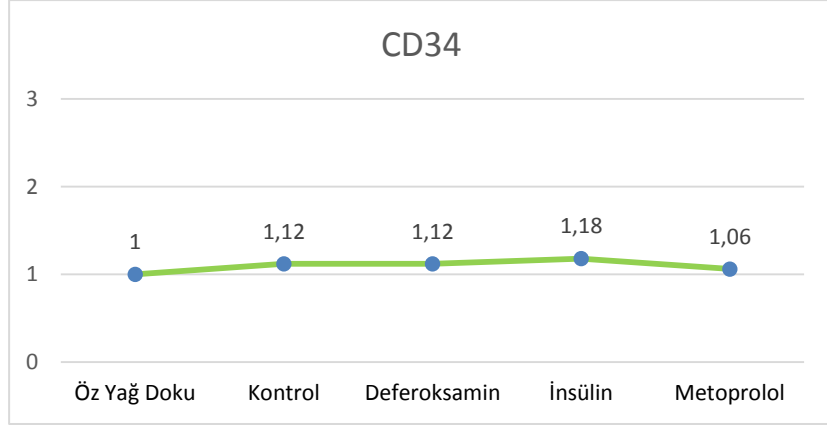
3.3.3. CD34 Oranları

CD34 ile boyanan alanı hiç olmayan kesitler hiç=0 (%0-10) olarak değerlendirilmiştir; boyanan alan içeren kesitler zayıf=1 (%10-40), orta=2 (%40-70) ve güçlü=3 (%70-100) olarak değerlendirilmiştir (Resim 39).



Resim 39: CD34 boyalı alanlar; **a:** hiç=0 (%0-10), **b:** zayıf=1 (%10-40), **c:** orta=2 (%40-70), **d:** güçlü=3 (%70-100) (CD34 İHK boyama, a, b ve c: x200, d: x400, 4 numaralı denek, INS grubu)

ÖYD grubunda CD34 boyanma oranları tüm deney hayvanlarında zayıf olması nedeniyle McNemar testiyle değerlendirilememiş dolayısıyla istatistiksel incelemeye katılamamıştır. SERUM grubuyla DFO, INS ve B/B grupları, DFO grubuyla INS ve B/B grupları ve INS grubuyla B/B grubu CD34 boyanma oranları açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). (Grafik 40)



Grafik 40: CD34 boyanma oranlarının kesitsel verilerinin gruptaki ortalama değerleri

4.TARTIŞMA

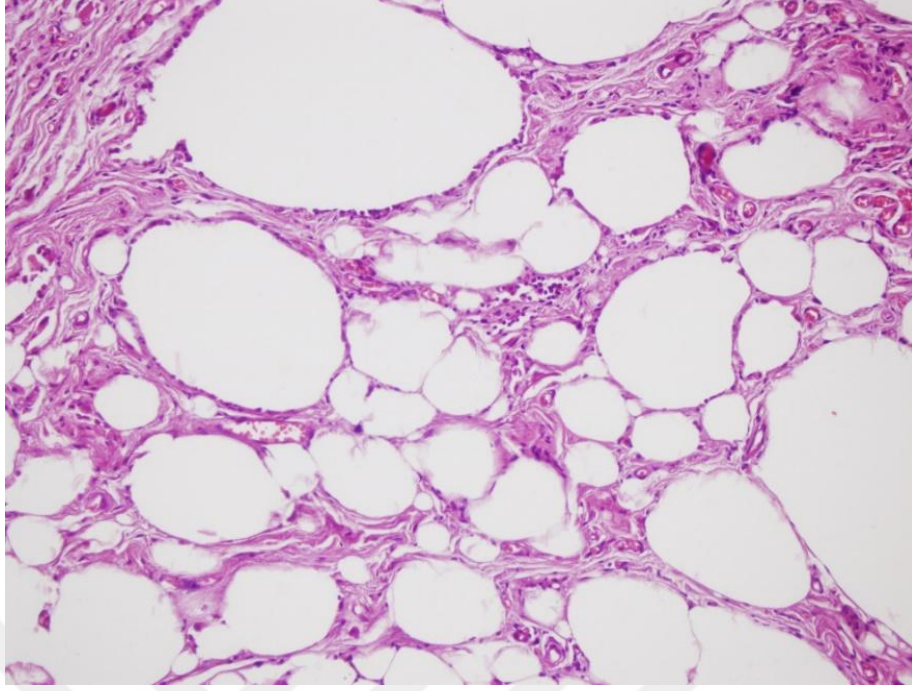
Yaşlanan cildin formunu geriye döndürmek, ciltteki nedbe dokusunu yumuşatmak ve bunun getirdiği cilt kalitesinde artış, bir kontur defektini gidermek, yüz, meme, kalça gibi bölgelerde estetik amaçlı projeksiyon artışı, radyoterapi görmüş ciltlerde görülen sertleşmeyi gidermek, bir bölgedeki doku azlığını gidermek yağ greftinin kullanım alanlarından sadece birkaçıdır (1,6,7,9,12,13,15,18,22,30–32,93). Ucuz, tekrarlaması kolay, komplikasyonu az, biyouyumluluğu yüksek, verici alanda majör deformiteler oluşturmayan, kolay uygulanabilir bir teknik olması sebebiyle plastik cerrahinin elindeki önemli tekniklerden biri haline gelmiştir. Ancak implant materyallerine kıyasla sahip olduğu bu avantajlara karşın rezorpsiyonuna bağlı greft ağırlık ve hacim kayıplarının her daim miktar ve oran olarak ön görülememesi önemli bir problem teşkil etmektedir (1,4,20,22,30,33,34,93). Güvenilir, tekrar edilebilir ve sağ kalımı yüksek sonuçların elde edilebilmesi için gerekli koşullar üzerine çalışmalar yapılmış ve bu günümüzde plastik cerrahinin önündeki en önemli sorunlardan biri olmuştur (13,15,21–23,32,38,39,93).

Günümüzde enjekte edilebilir materyal çeşitliliğinin de artmasıyla minimal invazif işlemler insan hayatında popüler bir yer edinmiştir (8,11,17). Prensip olarak benzeri benzeriyle onarmak, biyouyumluluk, doğal görünüm ve kalıcılık göz önünde bulundurulduğunda yağ grefti birçok üstünlük barındırmaktadır (12,13,15,18,22,23,116). Ayrıca maliyet de bu mukayeseye dahil edildiğinde yağ greftinin üstünlüğü daha da artmaktadır (4,5,13,14,20,30,37). Ancak yağ grefti sağ kalımının sınırlayıcı bir faktör olması işlemin çoğul seanslar gerektirebilmesine yol açmaktadır (7,13,25,36,123). Yanı sıra yağ grefti sağ kalım yüzdesinin tahmin edilebilir olmayışı ve süzme, inceltme ve santrifugasyon gibi çeşitli ek metodların kullanılması ve bu yöntemler arasında standardizasyonun olmayışı işlemin tercih edilebilirliğini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (1,6,23,36,90,124).

Yağ grefti ilk olarak 1893 yılında Gustav Adolf Neuber tarafından uygulanmıştır (1–7,88). Ancak yağ dokunun hızlı rezorpsiyonu nedeniyle hızlıca terkedilmiştir. Yaklaşık yüz yıl sonra Sydney Coleman liposakşın teknikleriyle yağ alımını; isim babası olduğu ‘Lipostructure’ tekniğiyle modern bir yağ grefti uygulama tekniğine dönüştürmüştür (96). 19. Yüzyıl sonlarındaki uygulamalara kıyasla birçok cerrah erken

iyi sonuçlar bildirmiş olsa da zaman içerisinde geniş bir rezorpsiyon aralığı olduğunun görülmesi yöntemin güvenilirliğine gölge düşürmüştür (32). Sonraki yıllarda bu sorun, konu üzerine yapılan neredeyse tüm araştırmaların temel kaynağı olmuştur (13,15,21–23,32,38,39,93). Bu bağlamda birçok maddenin yağ grefti sağ kalımını deneysel olarak artırdığı iddiası ortaya atılmış (34,35,40,51,125–127) olmasına rağmen rutin olarak klinik uygulamalarda kabul gören bir materyal ortaya koyulamamıştır (2,3,13,26,36,41,128,129). Amerikan Plastik Cerrahi Derneği tarafından 2012 yılında yapılan ulusal konsensus anketinde 2584 plastik cerraha yağ grefti elde etme, hazırlama, uygulama teknikleri ve kısa ve uzun dönem sonuç algıları ile ilgili sorular yöneltilmiştir. Ankete göre; otolog yağ doku transferi oldukça yaygın bir uygulama olmasına rağmen çok az cerrahın tamamen aynı tekniği uyguladığı görülmüştür (14).

Pek çok çalışmada yağ greftlerinin altı ay ile bir yıl içerisinde %30-70'inin kayıba uğradığı ve bu alanların lipogranümatöz alanlarla (Resim 41) yer değiştirdiği raporlanmıştır (24,37,99,130). Bu, yağ grefti sağ kalımı sonuçlarında belirsizliğe neden olmaktadır. Bu durum kök hücre proliferasyon-apoptoz döngüsü ve buna eşlik eden üç bölge teorisi dahil olmak üzere pek çok teori ile açıklanmaya çalışılmıştır (3,24,37,67,69,99,101,130). Bu teorilerin ortak noktaları yara iyileşme sürecini takip eden yeni damar oluşumunun meydana gelmesidir. Anjiyogenez safhasında transfer edilen kök hücre karakterindeki öncül hücreler ve içerdikleri büyüme faktörleri etkili olmaktadır. Doku mühendisliği ile yağ dokusundan elde edilen pek çok kök hücre ve büyüme faktörü ile yapılmış olan çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir (1,3,4,13,18,28,40,101,130). Greftin uzaysal olarak küresel halde olduğunu düşünecek olursak anjiyogenez başlangıçta sınırlı bir alanı etkileyeceğinden santralde yağ nekrozu gelişmesi kaçınılmaz olacaktır. Zamanla santraldeki bu nekroz alanının fibrozis ile yer değiştirerek değişken oranlarda greft involüsyonuna yol açması beklenmektedir (24,38,99,101,130).



Resim 41: Geniş vakuoller etrafında görülen fibrotik infiltratlarla karakterize lipogranülom alanı (H&E boyama, x200, 4 numaralı denek, kontrol grubu)

Yağ grefti sağ kalımı üzerine yapılan birçok çalışma kök hücre kültürleri, büyüme faktörleri ve yüksek teknoloji gerektiren cihazlar üzerinde yoğunlaşmıştır (1,3,4,13,18,28,40,101). Teknik zorluklar ve yüksek maliyetler göz önüne alındığında bu yöntemlerin klinik ve cerrahi uygulamalarda geniş kitlelere ulaşması ve sürdürülebilirliği mümkün olamamıştır. Yağ grefti uygulamalarının avantajlarının ucuz ve tekrarlanması kolay olması nedeniyle sağ kalımı artırmak için kullanılacak madde veya tekniğin de aynı özellikleri taşıması gerekmektedir.

Yağ grefti sağ kalımı üzerine bildirilmiş olan yüzlerce çalışma olmasına karşın klinik uygulamalar gibi onların birer yansımaları olan deneysel çalışmalarda da metodolojik farklılıklar nedeniyle objektif kıyaslamalar yapmak mümkün olamamaktadır (5,6,13,15,18,19,21,23,36,41,124). Yapılan çalışmalardaki başlıca yöntemsel farklılıklar; deney hayvanının türünün seçimi, deney hayvanının cinsiyetinin seçimi, verici alan seçimi, deneysel model (grupların oluşturulması), işleme tekniği, alıcı alan seçimi, olgunlaşma süresi, sonuç değerlendirme parametre ve kriterleri olarak sıralanabilir (2,23,41,107).

Yağ grefti deneysel çalışmalarında kullanılan in vivo modellerin büyük çoğunluğunu sıçanlar ve fareler üzerinde yapılmış olan çalışmalar oluşturmaktadır. Daha büyük hayvan modellerinin insan anatomi ve fizyolojisini daha iyi taklit edebileceği düşünülmüş olsa da artan finansal maliyet ve tesis kapasiteleri araştırmacıları daha çok sıçan veya fare kullanmaya yöneltmiştir. Atimik fare gibi bu tür çalışmalarda kullanılan popüler transgenik ürünler de yine bu kriterin dışında kalmaktadır. Sıçan ve fare barınma, beslenme, bakım, dayanıklılık, ulaşılabilme ve cerrahi işleme uyum gibi faktörler bir arada göz önüne alındığında diğer modellere göre üstünlük kazanmaktadır (41). Çalışmamızda dayanıklılık, bakım, besleme ve maliyet faktörleri ön planda tutularak Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda, dişi cinsiyet kullanılması östrojen ilişkili olarak yağ grefti sağ kalımı üzerinde değişken etkilere neden olabilir (16,39,131,132). Bu etki, östradiol (E₂) ve adipoz kaynaklı kök ve öncül hücrelerdeki östrojen reseptör etkileşimleri sayesinde gerçekleşir ve bu hücrelerin (ADSCs) büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi davranışlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar (133–135). Buradan yola çıkarak; Luo ve arkadaşları 2013 yılında artan östradiol seviyelerinin yüksek miktarda VEGF üretimini uyardığını ve bu etkinin konsantrasyon bağımlı olduğunu göstermişlerdir (136). Östrojenin siklik bir döngüsünün olması ve yağ metabolizması üzerinde kanıtlanmış etkilerinin bulunması nedeniyle yağ grefti sağ kalımı üzerine tasarlanan çalışmalarda erkek cinsiyet kullanılmalı ve cinsiyet vurgusu mutlaka yapılmalıdır. Yağ grefti sağ kalımı üzerine literatür incelendiğinde çalışmaların büyük çoğunluğunda cinsiyet vurgusu yapılmadığı ya da dişi cinsiyet kullanıldığı görülmüştür (3,4,6,13,16,19,24,25,28,32,34,36,41,69,93,99,101,105,122,124,130,137,138).

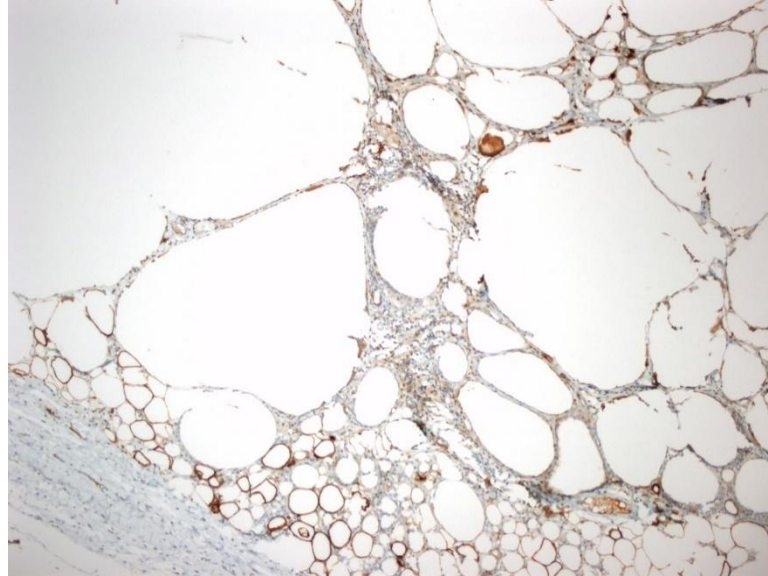
Literatürde erkek cinsiyet vurgusu yapan çalışmalar bulunmaktadır (10,25,29,30,37,90,125,126,139,140). Sonuçların cinsiyet kaynaklı lipojenik etkilerden arındırılabilmesi amacıyla çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Eylül 2017’de Lujan-Hernandez ve arkadaşları 1968-2015 yılları arasında yayınlanan bütün yağ grefti deneysel çalışmalarını derlemiş ve çalışmaların %52’sinde otolog yağ grefti kullanıldığını bildirmişlerdir. Bunların büyük çoğunluğunu hayvanın kendi inguinal yağ yastığının hayvanın sırtına greft olarak yerleştirilmesi oluşturmaktadır (41). Sıçanlarda inguinal yağ yastığı ulaşılması kolay ve morbiditesi

düşük bir donör saha olduğu için otolog yağ grefti kullanılan deneysel çalışmalarda çokça tercih edilmiştir (4,40,51,116,139–143). Aynı çalışmada deneysel çalışmaların %51’inde alıcı alan olarak deney hayvanlarının sırtının kullanıldığı; yağ greftlerinin kas fasiyası üstü cilt altı plana yerleştirildiği belirtilmiştir (41). Bunu %28 ile skalp, %12 ile karın içi takip etmiştir. Tanik ve arkadaşları subkutan dorsumun sıçanlarda yağ doku içermemesinin ve pannikulus karnosus ve dorsal kaslar arasında olmasının daha hızlı ve etkin bir anjiyogenez süreci ortaya koyacağını, harvest (greftlerin toplanması) işleminde disseksiyonun kolay olacağını ve anjiyogenezin makroskobik izlemine de kolaylaştıracağını bildirmişlerdir (10). Çalışmanın deneklerin sakrifikasyonu ve yağ greftlerinin tekrar toplanması safhasında seçilen alıcı sahanın anjiyogenezin makroskobik izlemine izin verdiği görülmüştür (Resim 26). Ayrıca yağ greftlerinin pannikulus karnosus ve dorsal kas planları arasından kolayca disseke edilebildiği gözlemlenmiştir.

Literatürde sıçanlar üzerinde yağ grefti sağ kalımı üzerine daha önce yapılmış olan birçok araştırmada her deney grubu için dört ile on adet denek kullanıldığı görülmüştür (3,4,10,21,25,28,29,34–36,38–40,51,90,101,105,116,127,137,139–141,143–146). Bu sayı çalışma öncesi yapılan istatistiksel güç analizlerinde (power analysis) cerrahi temelli deneysel uygulamalarda anlamlı sonuçlar elde edebilmek için yeterli miktar değildir. Deneysel çalışmaların büyük çoğunluğu her deney hayvanını bir deney grubuna dahil eden metodoloji üzerine kurulmuştur. Ancak bazı çalışmalarda alıcı olarak seçilen anatomik sahanın birden fazla alt bölüme ayrılarak aynı deney hayvanının birden fazla gruba dahil edildiği görülmüştür (35,119). Yağ grefti sağ kalımında genetik, fizyolojik, metabolik farklılıklar belirleyici olmaktadır (140,143,147). Çalışmamızda her deney hayvanının sırtı dört ayrı kutuba ayrılarak dört deney grubunun da tek hayvan üzerinde toplanması sağlanmıştır (Resim 17, Tablo 18). Böylelikle, sonuçların güvenilirliğinin artırılması ve hayvan sayısının daha etkin kullanılması hedeflenmiştir. Bu sayede gruplar arasında standardizasyon sağlanmış ve oluşabilecek hemodinamik, fizyolojik, genetik ve metabolik farklılıklar ortadan kaldırılmıştır.

Yoshimura ve arkadaşları yağ grefti sağ kalımı üzerine yapılan deneysel çalışmalarda greftleme sonrası birkaç gün içerisinde alıcı vaskülarize yatağa temas eden greftin en dışındaki yaklaşık 300 µm derinliğindeki greft sahası dışında bütün adipositlerin yaşamını yitirdiğini göstermişlerdir (130); 1994 yılında Carpaneda ve Ribiero bu mesafeyi yaklaşık 2 mm olarak bildirmişlerdir (100). Yoshimura ve arkadaşları aynı çalışmada bu sürecin birinci güne karşılık geldiğini; adipositlerin şiddetli iskemi durumunda ($pO_2 < 15$ mmHg) ilk 24 saatte öldüklerini ve iskeminin uzamasıyla buna vasküler endotelyal hücrelerin ve adipoz kaynaklı kök ve öncül hücrelerin dahil olduğunu bildirmişlerdir (130). Şiddetli iskemide dahi adipoz kaynaklı kök hücreler ilk 72 saate kadar canlılıklarını sürdürebilmekte ve ölen hücrelerden ortaya çıkan medyatörler sayesinde aktive olarak doku hasarını çoğalma/proliferasyon, göç/migrasyon ve farklılaşma/diferensiasyon yetenekleri sayesinde onarmaya çalışmaktadırlar (99). İskeminin adipoz kaynaklı kök ve öncül hücrelerinin tümünün kaybına sebep olacak kadar uzun sürdüğü durumlarda ise bu durum duvar formasyonu geliştirerek enkapsüle hale getirilmiş yağ kistleri, lipogranülomlar ve/veya fibrozis ile sonlanmaktadır (Resim 42). Ancak Yoshimura ve arkadaşlarına göre bu durum şaşırtıcı bir şekilde yağ kistlerinin uzunca bir süre rezorbe olmamasından dolayı yağ grefti ağırlık ve hacmini etkilememektedir (130).

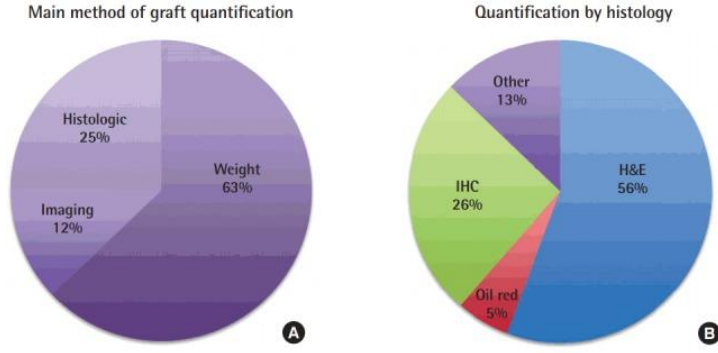


Resim 42: Kist duvar formasyonu geliştirmiş yer yer fibrotik infiltratlar içeren yağ kistleri komşuluğundaki, membranları perilipin boyalı adipositlerle karakterize adipogenez alanları (Perilipin İHK boyama, x100, 7 numaralı denek, DFO grubu)

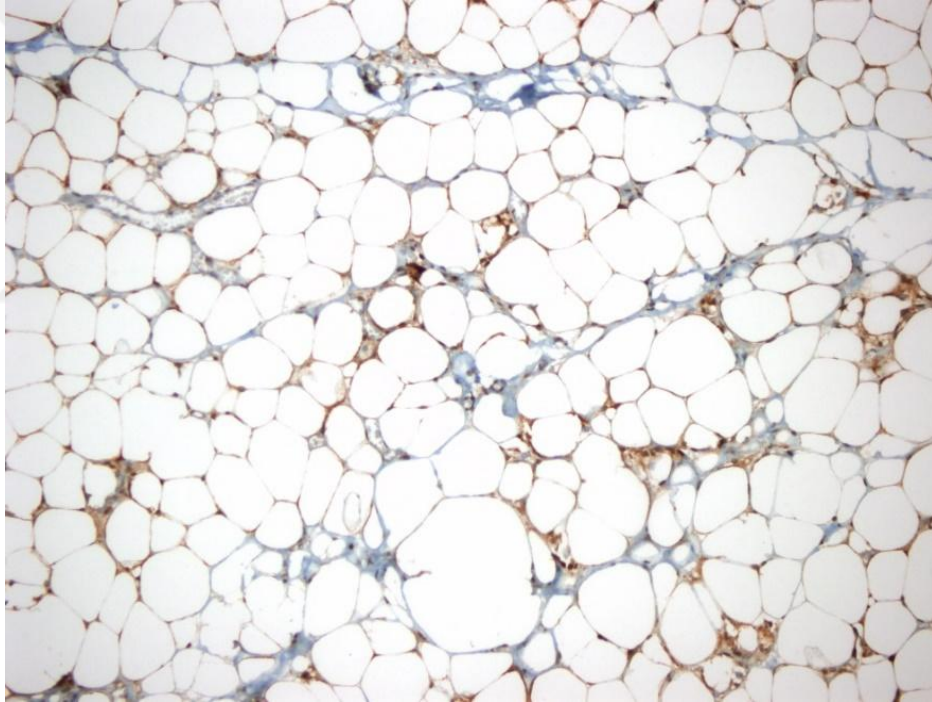
Yağ grefti sağ kalım hacminin değerlendirilmesinde kullanılan bugüne kadar bildirilmiş temel parametreler ağırlık ölçümü, histolojik inceleme ve görüntüleme yöntemleridir (41). Bunlar arasında en sık kullanılmış olanı %63 ile ağırlık ölçümü olmasına karşın çalışmaların birçoğunda bu yöntem tek başına yeterli bulunmayarak hücrel kompozisyonun da incelenebilmesi için çoğunlukla histolojik incelemeler çalışmalara dahil edilmiştir (Resim 43). Boyama teknikleri arasında en sık kullanılan H&E olmasına rağmen metabolik durumlarından bağımsız olarak tüm yapıları eşit düzeyde boyadığı için kanıt değeri düşüktür (41). İmmunohistokimyasal boyamalar daha yüksek teknik gerektirmelerine karşılık hedefe yönelik boyama yaptıkları için daha spesifiktirler (101,148–151). Yağ grefti sağ kalımında en sık etkin kullanılan immunohistokimyasal ajan perilipindir (41,152). Perilipin, parafinize kesitlerde metabolik olarak aktif adipositlerde yüzey belirteci olarak bulunur ve ölü adipositlerde boyanma göstermez (37,99,101,142,150–153). Bu nedenle çalışmamızda adiposit yüzdeleri hesaplanırken H&E boyama yöntemi yerine canlı yağ hücreleri varlığını göstermek için immunohistokimyasal belirteç olarak perilipin kullanılmıştır (Resim 44).

CD31 (PECAM-1) vasküler endotelial hücreleri ve hematopoetik kök hücreleri yaygın olarak boyadığı için anjiyogenez ve inflamasyonun değerlendirilmesinde sık kullanılan bir immunohistokimyasal ajandır (121). CD34 yaygın bilinen kök hücre belirteçidir ve adipoz kaynaklı kök hücrelerin CD34 pozitif, CD31 negatif olarak boyanmasıyla hematopoetik kök hücrelerden ayrıldığı bilinmektedir (27,101,122,154–160).

Çalışmamızda değerlendirme parametreleri olarak hassas terazi ile yağ greft ağırlık ölçümü, histolojik incelemede; H&E ile yağ nekroz alanları oranı, immunohistokimyasal incelemede; perilipin ile canlı adiposit yüzdesi, CD31 ile yeniden damarlanma ve CD34 ile kök hücre aktivitesi oranları kullanılmıştır.



Resim 43: A; hacim değerlendirmede kullanılan temel yöntemler, B; histolojik değerlendirmede kullanılan boyama teknikleri. IHC: immunohistokimyasal. (41)



Resim 44: Düzenli yağ doku histolojik çatısı göstermesine karşın perilipinle zayıf boyanmış alan (Perilipin İHK boyama, x200, 2 numaralı denek, DFO grubu)

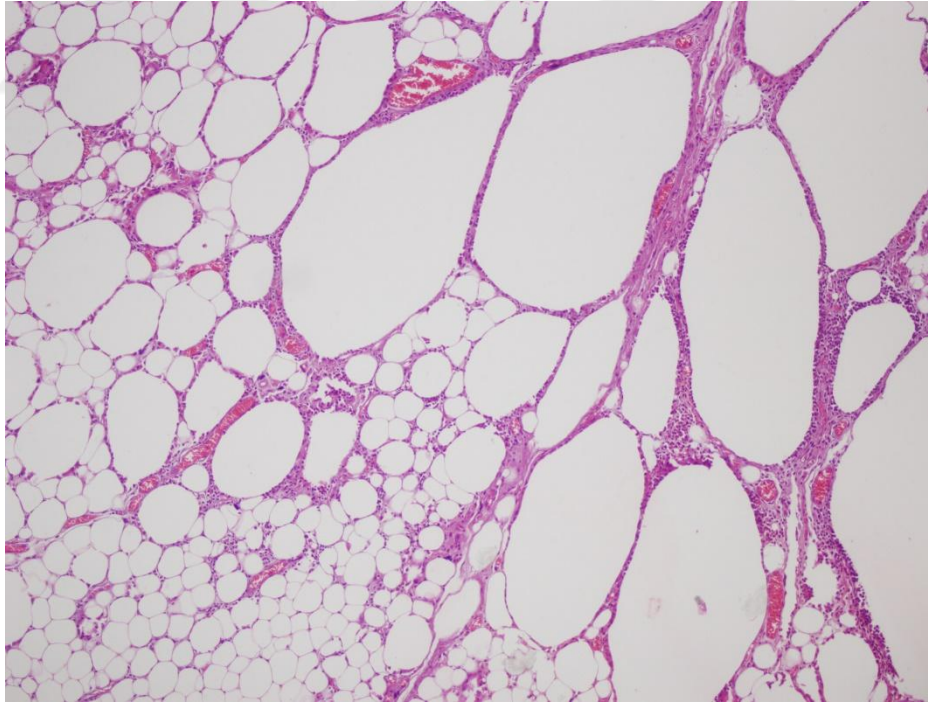
CD31 aktivasyon ölçüm tekniklerinin büyük çoğunluğu 1991 yılında Weidner tarafından tanımlanan Weidner Metodu olarak bilinen iMVD (intratumoral microvessel density) ölçüm tekniğine dayanmaktadır (161). Bu yöntemle tümöral davranışların anlaşılması amacıyla günümüze kadar birçok tümör ksenograft deneysel çalışması yapılmıştır. Neredeyse tüm solid tümörlerin değerlendirilmesinde popüler olan bu teknik tümör çalışmaları üzerinde geliştirildiği için CD31 ve benzeri vasküler endotelial belirteçleri kullanarak 'hot spot' şeklinde tabir edilen vaskülarizasyon açısından yoğun olan noktalarda gelişen kan damarlarının sayılmasını esas almaktadır (162). Ancak yağ grefti vaskülarizasyonunda histolojik olarak homojene yakın bir dağılım gösteren anjiyogenez anlamlıdır ve bu solid tümörlerdeki anjiyogenez tipiyle uyum göstermez. Çünkü hot spot kavramı bir nevi intratümöral granülom odaklarını tanımlamaktadır. Bu yüzden tümöral dokularda gözlenen hot spot şeklinde tarif edilen vasküler açıdan yoğun noktalar yağ doku greftlerinde lipogranülom ve fibrozis odaklarına karşılık gelmektedir. Buradan yola çıkılarak, yağ grefti histolojisindeki anjiyogenez şekli solid tümörlerdeki anjiyogenez tipinden farklı olduğu için hot spot kavramıyla değerlendirilmesinin; dolayısıyla MVD (mikrovasküler yoğunluk ölçümü) ölçümlerinin anlamsız olduğu söylenebilir. Bu nedenle çalışmamızda; CD31 ve CD34 değerleri, tüm kesit alanları tek tek incelenip hiç (%0-10), zayıf (%10-40), orta (%40-70), güçlü (%70-100) boyanma şeklinde değerlendirilerek sırasıyla 0, 1, 2, 3 kesitsel değerleri verilip ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu oranlar gruplar arası karşılaştırmalarda kullanılmıştır.

İnsülin, asetil-CoA karboksilaz induksiyonu sayesinde yağ asitlerinin sentezini uyarmakta ve yağ doku hipertrofisine yol açarak lipojenik aktivite göstermektedir (49,50). 2000 yılında Yüksel ve arkadaşları tarafından yayınlanan makalede insülinin yağ grefti sağ kalımını artırmadaki etkisinin IGF, bFGF gibi büyüme faktörlerine denk olduğu bildirilmiştir (40). Nöroregülasyon mekanizmasına sahip yağ doku metabolizmasında sempatik sinir sistemi baskın olup eğilim lipoliz lehinedir. Bu etki β adrenerjik reseptörlerle sağlanır (31). İnsanlarda β_1 reseptörler yağ doku metabolizmasındaki nöroregülasyon görevinin temelini oluşturur (55). B/B deney grubunda kullanılan metoprolol gibi selektif β_1 reseptör blokleri ajanların yağ doku metabolizması üzerine etkisi lipogenez lehine olacaktır. 2001 yılında Ayhan ve arkadaşları buradan yola çıkarak selektif β_1 bloker olan metoprololün hücre

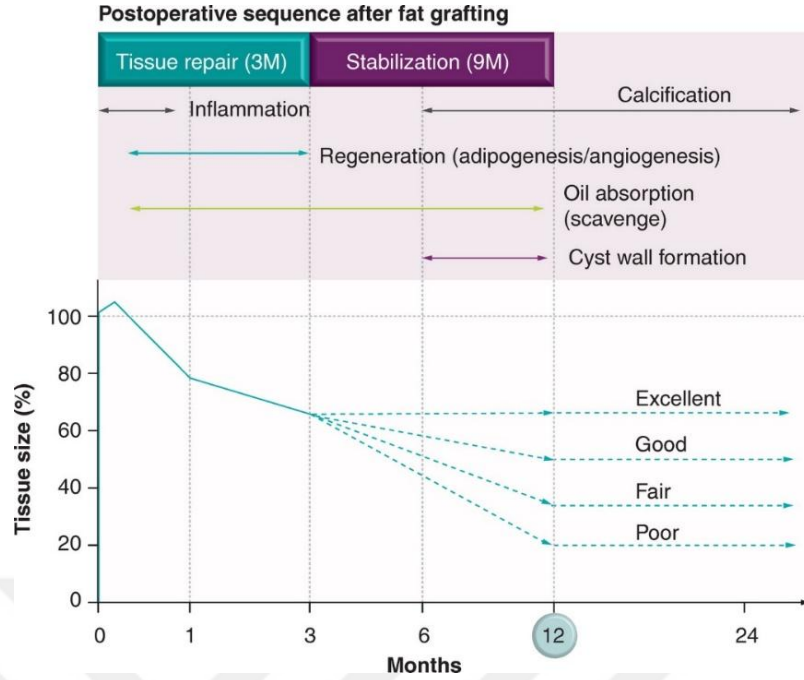
membranlarında cAMP aracılıklı adenilat siklaz inhibisyonu üzerinden lipolizi azaltıcı/antilipolitik (56) etkisinden yararlanıp yağ grefti sağ kalım miktarlarını insülin ile kıyaslamışlardır (35). Çalışmamızda Ayhan ve arkadaşları tarafından bildirilen (greftin alıcı alana yerleştirilmeden önce ilgili materyale -çalışmamızda metoprolol ve insülin- deney hayvanının vücut sıcaklığına eşdeğer ortamda maruziyeti) inkübasyon modeli (35) kullanılmıştır.

Ayhan ve arkadaşlarının çalışmasında deney sonlandırma süresi greft rezorpsiyon ve olgunlaşma süreci de göz önünde bulundurularak 9 ay olarak belirtilmiştir. Rezorpsiyon süresi, Pajvani ve arkadaşlarına göre lipid damlacığının boyutuna bağlı olarak birkaç hafta ile birkaç ay arasında değişmektedir (163) ve bu rezorpsiyon lipid damlacıklarının, etraflarında duvar formasyonu (Resim 45) oluşturan M1 makrofajlar tarafından infiltre edilerek fagosite edilmesi yoluyla olmaktadır (142). Suga ve arkadaşları greft olarak kullanılan yağ dokunun makroskobik olarak hayatta kalmış gibi görünmesine karşın greftteki canlı hücrelerin adipogenez yoluyla sağ kalan adiposit kaynaklı kök ve öncül hücrelerden geliştiğini savunarak greft dönüşüm teorisini (graft replacement theory) ortaya koymuşlardır (99). Aynı çalışma, adipogenez üç aya kadar devam ederken; lipid damlacığı rezorpsiyonunun 12. aya dek sürdüğünü belirtmektedir (Resim 46). Üçüncü ayın sonunda adipogenezin sonlanmasıyla birlikte bahsedildiği üzere yağ kistleri; M1 makrofajlar tarafından etrafları sarılıp duvar formasyonu geliştirerek küçük çaptaki kistler fibrozis ile sonuçlanmakta, büyük çaptaki kistler ise altıncı aydan itibaren duvar formasyonuna kalsifikasyon eklenerek enkapsüle halde kalmaktadırlar (130). Literatürdeki birçok çalışma deney sonlandırma süresi olarak adipogenezin sonlandığı belirtilen üçüncü ay sonu yani 12 haftayı baz almaktadır (16,39,41,99,130,142). Deneysel sonlandırma noktası olarak yağ greft sağ kalımının tamamlandığı belirtilen 12. haftanın sonunu temel olan bu genel görüş, çalışmamızda 12. hafta sonunda deney sonlandırıldığında deney hayvanlarının greft olarak kullanılmayan kendi yağ dokularından alınan materyallerin CD34 yani kök hücre aktivasyonları açısından tüm deney gruplarıyla histolojik olarak benzer düzeyde boyanmaları ve istatistiksel olarak farklılık göstermemeleriyle desteklenmiştir. Bu dönemden sonra yağ grefti belirtildiği gibi ağırlık veya hacim olarak değişime uğramaktan ziyade histolojik olarak olgunlaşma gösterir. Ancak üçüncü ayın sonunda çok sayıda büyük çaplı yağ kistleri bulunması durumunda greft, bu kistlerin muhtemel

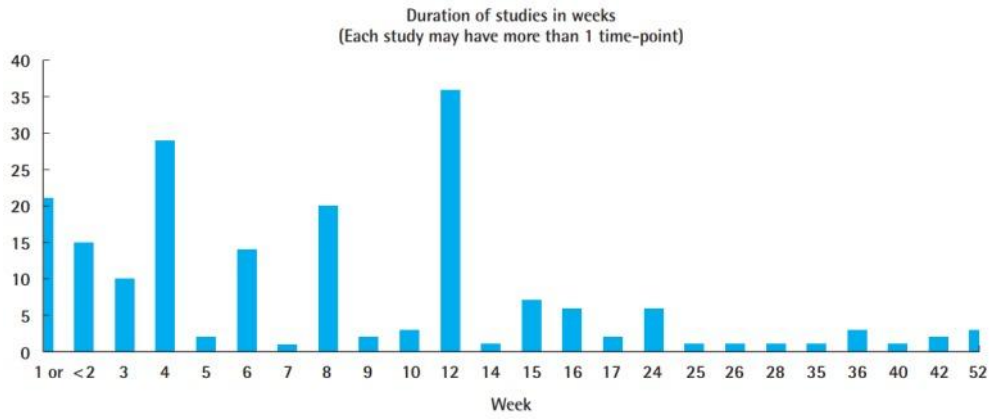
involüsyonuna bağlı olarak bir yıl sonuna kadar atrofiye olabilmektedir (24). 1968-2015 yılları arasında yağ greftleri üzerinde yapılmış olan tüm çalışmalar birlikte incelendiğinde; yağ grefti olgunlaşma döneminin sonu olarak sadece 12 haftayı deney sonlandırma noktası kabul eden çalışmaların %19 ile en yüksek orana sahip olduğu bulunmuştur (41). Bu oran birden fazla deney sonlandırma noktasına sahip çalışmalar da eklendiğinde %35'e çıkmaktadır (Resim 47). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda tüm denekler 12. haftanın sonunda sakrifiye edilerek çalışma sonlandırılmıştır. Çalışmamızda, literatür ortalamasının (2,3,34–36,40,51,90,145,147) çok üzerinde örneklem sayısına ulaşılmış olmasına rağmen Ayhan ve Temiz'in çalışmalarının (34,35) aksine deney öncesi ve deney sonu yağ grefti ağırlık değişim ortalamaları benzer olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (Ayhan: $p < 0,05$, Temiz: $p < 0,001$, çalışmamızda: $p > 0,5$). Her iki çalışmada da, çalışmamıza kıyasla daha az sayıda denek kullanılmış ve çalışmamızda kullandığımız tüm deney grupların aynı deney hayvanı üzerinde toplanmasına dayanan metodoloji kullanılmamıştır.



Resim 45: Yağ nekrozu alanlarındaki lipid damlacıkları (yağ kistleri) etrafında gelişen kist duvar formasyonu; geniş vakuollerin etrafındaki kalınlaşmakta olan çeperele dikkat ediniz. (H&E boyama, x100, 2 numaralı denek, kontrol grubu)



Resim 46: Greft olgunlaşma süreci (130)



Resim 47: 1968-2015 yılları arasında yağ greftleri üzerine yapılan çalışmaların haftalara göre yüzdesel olarak deney sonlandırma noktaları (41)

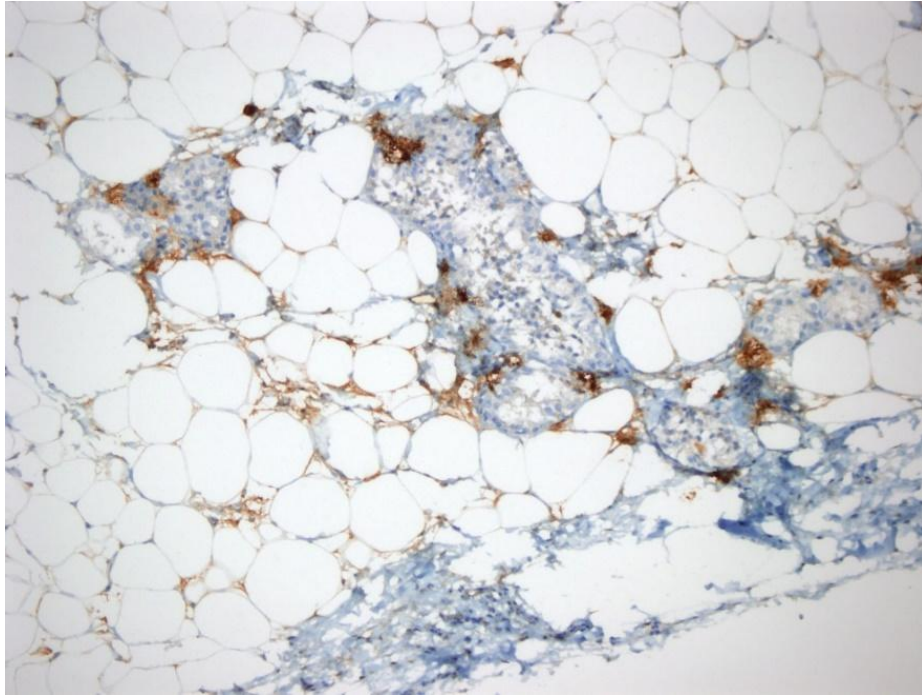
Çalışmamızda, B/B grubu, kontrol grubu karşısında yaklaşık %30 perilipin boyalı canlı yağ hücre artış oranı göstermiştir. INS grubu ise kontrol grubuna yaklaşık eşit bir oran ortaya koymuştur (SERUM: %50-INS: %48,8). Bu durumda B/B grubunun canlı yağ doku oranı olarak kontrol ve INS gruplarına kıyasla yağ grefti sağ kalımını

artırdığından söz edilebilir (sırasıyla $p=0,031$ ve $p=0,008$). Metoprololün yağ grefti sağ kalımı üzerine göstermiş olduğumuz olumlu etkisi Ayhan ve arkadaşlarının (35) çalışmasının sonuçlarıyla ($p<0,05$) uyumlu olsa da; insülin için bildirdikleri olumlu etki çalışmamızda izlenmemiştir. Çalışmada, H&E boyama yöntemiyle histolojik inceleme yapılmıştır. Ancak çalışmamızda, daha fazla denek kullanılmış, tüm gruplar aynı deney hayvanı üzerinde çalışılmış ve değerlendirmeler H&E boyama yöntemi yerine daha spesifik olduğu bildirilmiş (37,99,101,142,150–153) perilipin, CD31 ve CD34 gibi immunohistokimyasal belirteçlerle yapılmıştır. Bununla birlikte, aynı çalışmada kontrol grubu olarak salin solüsyonuyla inkübe edilen greftlerin yüksek miktarda fibrozis, multinükleer dev hücre, az miktarda olgun adiposit ve yüksek miktarda yağ nekrozu içerdiği ve insülin ile inkübe edilen greftlerin de kontrol gurubu kadar olmasa da benzer durumla sonuçlandığı bildirilmiştir. Yüksel ve arkadaşlarının insülinin yağ grefti sağ kalımı üzerine olumlu etkisinin olduğunu hatta bu etkinin IGF-1 ile eşdeğer olduğunu ($p<0,05$) bildirdikleri (40) çalışmada da Ayhan ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzer sonuçlar elde edilmiş; H&E boyama ile yapılan incelemede canlı adiposit yüzdelерinin arttığı gösterilmiştir. Ancak Yüksel ve arkadaşlarının çalışmasında da diğer çalışmada olduğu gibi spesifitesi yüksek perilipin vb. bir immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanılmamıştır. Bu veriler, çalışmamızda ulaştığımız, metoprololün yağ grefti sağ kalımına yönelik olumlu etkisini doğrular nitelikte olmasına karşın yukarıda da belirtildiği üzere insülinin olumlu etkisi çalışmamızda görülmemiştir. Ayrıca Yüksel ve arkadaşlarının çalışmasında metodoloji, polimerize materyallerle hazırlanan insülin içeren mikrosferlerin enjeksiyonu modeline dayanmaktadır. Çalışmada poli-laktik-glikolik asit/poli-etilen-glikol kullanılarak insülin içeren mikrosferlerin hazırlanmış ve bu materyal sıçanlardan hazırlanan yağ grefti ile karıştırılarak sıçanların deri altına enjekte edilmiştir. Kullanılan metodolojinin farklı olması insülinin etkilerinde görülen farklılığı açıklayabilir.

Yağ nekrozu oranlarında grup ortalamaların benzer olarak bulunması ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiş ($p>0,05$) olmasına rağmen gruplar arasındaki farklı perilipin yüzdeleriyle gösterilmiş farklı canlı hücre oranları büyük çaplı yağ kistlerine bağlı uzun dönemde gelişebilecek lipoatrofi ilişkili ağırlık ve hacim kayıpları hakkında fikir verici olabilir. Bu durum daha fazla canlı hücre içeren B/B grubunun uzun dönemde ağırlık ve hacim olarak muhtemel daha az lipoatrofiye

uğrayacağını dolayısıyla daha yüksek sağ kalım sunabileceğini ifade eder. Ancak deney sonlanma noktası yağ greftleme sekansının olgunlaşma safhası sonu olan (Resim 46) bir yıl sonuna kadar uzatılmadan kesin bir kanıya varılamaz.

CD34 aktivasyonunun (Resim 48) tüm deneklerde ve tüm gruplarda zayıf olarak izlenmiş olması (Grafik 40) ve gruplar arasındaki yaklaşık değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması ($p>0,05$) yağ greftleme sonrası sekansın (Resim 46) ilk üç aylık doku onarım periyodunu tamamladığını destekler niteliktedir. Dikkat edilirse ÖYD grubunun CD34 aktivasyon (Grafik 40) değerlerinin de sayısal ve istatistiksel olarak diğer gruplarla eşdeğer olduğu görülebilir. Bir başka deyişle zayıf ve hayvanın kendi yağ dokusuna yakın CD34 tutulum yoğunlukları düşük kök hücre aktivasyonunun yani adipogenezin sona erdiğinin bir göstergesidir. Dolayısıyla yağ greftleri sağ kalımı aşamasını tamamlanmış olgunlaşma yani maturasyon safhası başlamıştır. Bu durum maturasyon safhası sonunda yukarıda da bahsedildiği üzere yağ kistlerinin büyüklüğüne bağlı olarak ağırlık ve/veya hacim açısından nadiren de olsa değişiklikler olabilmesine karşın canlı yağ hücre oranının artmasının bu tarihten sonra beklenmediğine işaret etmektedir.



Resim 48: CD34 aktivasyonu yüksek alan (CD31 İHK boyama, x400, 4 numaralı denek, INS grubu)

CD31 aktivasyonu INS grubunda, B/B grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Yine INS grubundaki CD31 aktivitesi kontrol grubu karşısında yüksek bulunmuş ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıya yakın bir değer ($p=0,070$) ortaya koymuştur. Ayrıca INS grubunun CD31 aktivitesine göre DFO grubundan daha güçlü boyandığı görülmüş ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Gruplardaki CD34 aktivasyonları zayıf olarak bulunmuş ve hayvanın greft olarak kullanılmamış kendi yağ dokusuna yakın değerler ortaya koymuştur (Grafik 40). Bu durum, bahsedildiği gibi kök hücre aktivasyon düzeyinin greft olarak kullanılmamış normal yağ doku düzeylerine geri döndüğünü ve greft sağ kalım sürecinin sona erdiği tezini destekler niteliktedir. Hematopoetik ve adipoz kaynaklı kök hücre miktarlarının düşük olmasından yola çıkılarak INS grubundaki CD31 aktivasyonunun hematopoetik kontaminasyon, inflamasyon ve/veya fibrotik aktivite artışıyla ilişkili olabileceği akla gelmektedir (27,101,122,154–160). Ancak özellikle INS grubunda, ÖYD grubu da dahil olmak üzere neredeyse tüm gruplara karşı görülen bu CD31 aktivasyonunun (Tablo 38) tam nedeninin açıklanabilmesi için metodolojisi INS ve yağ greftine etkileri üzerine odaklı inflamasyon ve fibrozisi göstermek için kullanılan immunohistokimyasal belirteçleri de içeren ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, perilipin boyalı alan yüzdesi ortalamasının kontrol grubuna neredeyse denk olduğu (SERUM: %50-INS: %48,8) da göz önünde bulundurularak INS grubunun yağ grefti sağ kalımı üzerine anlamlı etkisinin bulunmadığı; çalışmamızda immunohistokimyasal düzeyde gösterilmiş ve bu bulgunun sabit olduğu düşük CD34 aktivasyonlarıyla teyit edilmiştir.

Deferoksamin, demir zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılan demiri şelatlayıcı bir ajandır (62,64–66). Prolil hidroksilaz enjimi HIF-1 (hipoksiyle indüklenebilir faktör) yıkıcı enzimidir ve kofaktörü demirdir (62–64). Deferoksaminin anjiyogeneze dolaylı yoldan katkısı nedeniyle (62,63) daha önce yağ grefti sağ kalımı üzerine etkisi araştırılmış olumlu sonuçlar bildirilmiştir (34,65). Temiz ve arkadaşları 2016 yılında yayınladıkları bir makalede deferoksaminin HIF-1 α üzerinden dolaylı etkiyle yağ grefti hipertrofisine yol açacağı tezini savunmuşlardır (34). Çalışmamızda Temiz ve arkadaşları tarafından bildirilen (materyalin -çalışmamızda deferoksamin ve serum- üzer gün arayla alıcı alana toplam on doz perkutan verilmesi) enjeksiyon modeli (34) kullanılmıştır. Ancak Temiz ve arkadaşları deney sonlandırma noktası olarak 8. haftanın

sonunu seçmişlerdir. Bu süre, Suga ve arkadaşları tarafından belirtilen 12 haftalık olgunlaşma periyodu (99) göz önünde bulundurulduğunda rezorpsiyonun sürmesi ve kök hücre aktivitesinin azalması beklenebilir (Resim 46). Bu durum, çalışmamızda CD34 aktivitesinin tüm gruplarda hayvanın greft olarak kullanılmamış kendi öz yağ dokusuna benzer olarak bulunmasıyla desteklenmiştir.

Çalışmamızda, DFO grubu, kontrol grubu karşısında yaklaşık %20 perilipin boyalı canlı yağ hücre artış oranı göstermiştir. Ancak DFO grubunun gösterdiği bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Temiz ve arkadaşlarının çalışmasında (34) greftlerdeki histolojik olarak normal görülen yağ doku alanlarının deney grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı bildirilmiştir ($p>0,002$). Ancak çalışmamızda daha fazla denek kullanılmış, tüm gruplar aynı deney hayvanı üzerinde çalışılmış ve değerlendirmeler H&E boyama yöntemi yerine daha spesifik olduğu bildirilmiş (37,99,101,142,150–153) perilipin, CD31 ve CD34 gibi immunohistokimyasal belirteçlerle yapılmıştır.

CD31 aktivasyonu DFO grubunda, B/B grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Gruplardaki CD34 aktivasyonlarının zayıf ve hayvanın greft olarak kullanılmamış kendi yağ dokusuna yakın değerler ortaya koyması (Grafik 40) yani hematopoetik ve adipoz kaynaklı kök hücre miktarlarının düşük olmasından yola çıkılarak DFO grubundaki CD31 aktivasyonunun hematopoetik kontaminasyon, inflamasyon ve/veya fibrotik aktivite artışıyla ilişkili olabileceği akla gelmektedir (27,101,122,154–160).

5. SONUÇ

Daha önce bildirilen, sıçanlar üzerinde yağ grefti sağ kalımı üzerine yapılmış olan birçok araştırmada örneklem genişliği istatistiksel güç analizlerine (power analysis) göre cerrahi temelli deneysel uygulamalarda anlamlı sonuçlar elde edebilmek için küçük kalmaktadır. Çalışmamızda her deney hayvanının sırtı dört ayrı kutuba ayrılarak tüm deney gruplarının tek hayvan üzerinde toplanması sağlanmıştır (Resim 17, Tablo 18). Böylelikle, hayvan sayısının daha etkin kullanılması sağlanmış, daha az sayıda deney hayvanı kullanılarak daha geniş örneklem boyutu yakalanabilmiştir. Yağ grefti sağ kalımında genetik, fizyolojik, metabolik farklılıklar belirleyicidir. Çalışmamızda kullanılan tüm deney gruplarını aynı deney hayvanında toplayan metodoloji sayesinde sonuçların güvenilirliğinin artırılması hedeflenmiştir. Bu sayede gruplar arasında standardizasyon sağlanmış ve oluşabilecek hemodinamik, fizyolojik, genetik ve metabolik farklılıklar ortadan kaldırılmıştır.

Östrojenin (E_2), adipoz kaynaklık kök ve öncül hücrelerdeki (ADSCs) büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi davranışlarının düzenlenmesinde etkin rol oynaması, çalışmalarda dişi deney hayvanlarının kullanılmasının doğal bir sonucu olarak yağ grefti sağ kalımı üzerinde değişken etkilere neden olabilir. Östrojenin siklik bir döngüsünün olması ve yağ doku öncül hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesinde kanıtlanmış etkilerinin bulunması nedeniyle yağ grefti sağ kalımı üzerine tasarlanan çalışmalarda erkek cinsiyet kullanılmalı ve cinsiyet vurgusu mutlaka yapılmalıdır.

Yağ grefti sağ kalım hacminin değerlendirilmesinde kullanılan boyama teknikleri arasında en sık kullanılan H&E metabolik durumlarından bağımsız olarak tüm yapıları eşit düzeyde boyar. Ancak immunohistokimyasal boyamalar hedefe yönelik boyama yaptıkları için daha spesifiktirler. Çalışmamızda kullanılan perilipin, parafinize kesitlerde metabolik olarak aktif adipositlerde yüzey belirteci olarak bulunur; canlı yağ hücre varlığını işaretlerken ölü adipositlerde boyanma göstermez. CD31 vasküler endotelial hücreleri ve hematopoetik kök hücreleri yaygın olarak boyayan anjiyogenez ve inflamasyonun değerlendirilmesinde sık kullanılan bir immunohistokimyasal ajandır. CD34 yaygın bilinen kök hücre belirteçidir ve adipoz kaynaklı kök hücrelerin CD34 pozitif, CD31 negatif olarak boyanmasıyla hematopoetik kök hücrelerden ayrıldığı bilinmektedir. Perilipin, CD31 ve CD34 gibi çalışmamızda

kullanılan, immunohistokimyasal belirteçlerin yağ greft sağ kalımı üzerine yapılan çalışmalarda kullanılması hedefe yönelik boyama yaptıkları için sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

CD31 aktivasyon ölçüm teknikleri Weidner Metodu olarak bilinen iMVD (intratumoral microvessel density) ölçüm tekniğine dayanmaktadır. Neredeyse tüm solid tümörlerin değerlendirilmesinde popüler olan bu teknik 'hot spot' şeklinde tabir edilen vaskülarizasyon açısından yoğun olan noktalarda gelişen kan damarlarının sayılmasını esas alır. Ancak yağ grefti vaskülarizasyonunda homojen bir anjiyogenez anlamlıdır ve bu solid tümörlerdeki anjiyogenez tipiyle uyum göstermez. Bu vasküler açıdan yoğun noktalar yağ doku greftlerinde lipogranülom ve fibrozis odaklarına karşılık gelebilmektedir. Yağ grefti histolojisindeki anjiyogenez şekli solid tümörlerdeki anjiyogenez tipinden farklı olduğu için hot spot kavramıyla değerlendirilmesi ve MVD (mikrovasküler yoğunluk ölçümü) ölçümleri yapılması oldukça güçtür.

Çalışmamızda kolay ulaşılabilir ve maliyeti düşük maddeler seçilmiş; literatür ortalamasının çok üzerinde örneklem sayısına ulaşılmış ve önceki çalışmaların aksine kontrol grubuyla benzer yağ grefti ağırlık değişim oranları elde edilmiştir. Buna karşın metoprololün yağ grefti sağ kalımını canlı yağ hücre oranı olarak artırdığı önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuş ve bu bulgu farklı olarak immunohistokimyasal incelemelerle gösterilmiştir. Ancak insülin ve deferoksamin için önceki çalışmalarda bildirilen yağ grefti sağ kalımı üzerine olumlu etki çalışmamızda görülmemiş; kontrol grubuyla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç tüm deney gruplarında hayvanın kendi yağ dokusuna benzer derecede zayıf kök hücre aktiviteleriyle desteklenmiştir. Gelecekte tasarlanacak olan çalışmalarda, uzun ve kısa etkili, farklı etki gücü ve reseptör selektivitesine sahip beta blokerlerin yağ grefti sağ kalımı üzerine olan etkilerinin kıyaslanması amaçlanabilir. Ayrıca yağ grefti olgunlaşma dönemi tamamlandıktan sonra birinci yıl sonunda inflamasyon ve fibrozisi değerlendirmek için kullanılan immunohistokimyasal belirteçler çalışmaya eklenerek sonuçların kalıcılığının test edildiği yeni çalışmalar gelecekte yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Hsu VM, Stransky CA, Bucky LP, Percec I. Fat grafting's past, present, and future: Why adipose tissue is emerging as a critical link to the advancement of regenerative medicine. *Aesthetic Surg J* [Internet]. 2012;32(7):892–9.
2. Yu NZ, Huang JZ, Zhang H, Wang Y, Wang XJ, Zhao R, et al. A systemic review of autologous fat grafting survival rate and related severe complications. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(9):1245–51.
3. Craft RO, Rophael J, Morrison WA, Vashi A V., Mitchell GM, Penington AJ. Effect of local, long-term delivery of platelet-derived growth factor (PDGF) on injected fat graft survival in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2009;62(2):235–43.
4. Zhao J, Yi C, Li L, Zheng Y, Wu K, Liang L, et al. Observations on the survival and neovascularization of fat grafts interchanged between C57BL/6-gfp and C57BL/6 mice. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(3):398–406.
5. Locke MB, de Chalain TMB. Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Ann Plast Surg* [Internet]. 2008;60(1):98–102.
6. Gir P, Brown SA, Oni G, Kashefi N, Mojallal A, Rohrich RJ. Fat grafting: Evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130(1):249–58.
7. Mojallal A, Shipkov C, Braye F, Breton P, Foyatier JL. Influence of the recipient site on the outcomes of fat grafting in facial reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(2):471–83.
8. Eppley BL, Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: Clinical overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(4):98–106.
9. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat Injection to the Breast: Technique, Results, and Indications Based on 880 Procedures Over 10 Years. *Aesthetic Surg J*. 2009;29(5):360–76.
10. Thanik VD, Chang CC, Lerman OZ, Allen RJ, Nguyen PD, Saadeh PB, et al. A murine model for studying diffusely injected human fat. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(1):74–81.

11. Carruthers J, Carruthers A, Humphrey S. Introduction to fillers. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(5):120–31.
12. Godse K, Abhyankar S, Patil S, Nadkarni N, Marwah M, Kulkarni A. Fat ful'fill'ment: A review of autologous fat grafting. *J Cutan Aesthet Surg* [Internet]. 2013;6(3):132.
13. Strong AL, Cederna PS, Rubin JP, Coleman SR, Levi B. The Current state of fat grafting: A review of harvesting, processing, and injection techniques. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(4):897–912.
14. Kling RE, Mehrara BJ, Pusic AL, Young VL, Hume KM, Crotty CA, et al. Trends in autologous fat grafting to the breast: A national survey of the american society of plastic surgeons. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(1):35–46.
15. Simonacci F, Bertozzi N, Grieco MP, Grignaffini E, Raposio E. Procedure, applications, and outcomes of autologous fat grafting. *Ann Med Surg.* 2017;20:49–60.
16. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):45.
17. Klein AW, Elson ML. The history of substances for soft tissue augmentation. *Dermatologic Surg.* 2000;26(12):1096–105.
18. Coleman SR. Structural fat grafting: More than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3):108–20.
19. Agostini T, Lazzeri D, Pini A, Marino G, Li Quattrini A, Bani D, et al. Wet and dry techniques for structural fat graft harvesting: Histomorphometric and cell viability assessments of lipoaspirated samples. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130(2):331–9.
20. Erdim M, Tezel E, Numanoglu A, Sav A. The effects of the size of liposuction cannula on adipocyte survival and the optimum temperature for fat graft storage: an experimental study. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* [Internet]. 2009;62(9):1210–4.

21. Davis K, Rasko Y, Oni G, Bills J, Geissler P, Kenkel JM. Comparison of adipocyte viability and fat graft survival in an animal model using a new tissue liquefaction liposuction device vs standard coleman method for harvesting. *Aesthetic Surg J*. 2013;33(8):1175–85.
22. Jatana KR, Smith SP. The Scientific Basis for Lipotransfer: Is It the Ideal Filler? *Facial Plast Surg Clin North Am* [Internet]. 2008;16(4):443–8.
23. Kakagia D, Pallua N. Autologous fat grafting: In search of the optimal technique. *Surg Innov*. 2014;21(3):327–36.
24. Pu LLQ. Mechanisms of fat graft survival. *Ann Plast Surg*. 2016;77(8):84–6.
25. Yi C, Pan Y, Zhen Y, Zhang L, Zhang X, Shu M, et al. Enhancement of viability of fat grafts in nude mice by endothelial progenitor cells. *Dermatologic Surg*. 2006;32(12):1437–43.
26. Frame JD. The Past, Present, and Future of Facial Fat Grafting. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* [Internet]. 2018;26(1):1–6.
27. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208(1):64–76.
28. Fisher C, Grahovac TL, Schafer ME, Shippert RD, Marra KG, Peter Rubin J. Comparison of harvest and processing techniques for fat grafting and adipose stem cell isolation. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(2):351–61.
29. Rieck B, Schlaak S. In vivo tracking of rat preadipocytes after autologous transplantation. *Ann Plast Surg*. 2003;51(3):294–300.
30. Ullmann Y, Shoshani O, Fodor A, Ramon Y, Carmi N, Eldor L, et al. Searching for the favorable donor site for fat injection: In vivo study using the nude mice model. *Dermatologic Surg*. 2005;31(10):1304–7.
31. Ramseyer VD, Granneman JG. Adrenergic regulation of cellular plasticity in brown, beige/brite and white adipose tissues. *Adipocyte* [Internet]. 2016;5(2):119–29.
32. Zielins ER, Brett EA, Longaker MT, Wan DC. Autologous Fat Grafting: The Science behind the Surgery. *Aesthetic Surg J*. 2016;36(4):488–96.

33. Billings E, May JW. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(2):368–81.
34. Temiz G, Sirinoglu H, Yesiloglu N, Filinte D, Kaçmaz C. Effects of Deferoxamine on Fat Graft Survival. *Facial Plast Surg.* 2016;32(4):438–43.
35. Ayhan M, Şenen D, Adanall G, Görgü M, Erdoğan B, Albayrak B. Use of beta blockers for increasing: Survival of free fat grafts. *Aesthetic Plast Surg.* 2001;25(5):338–42.
36. Smith P, Adams WP, Lipschitz AH, Chau B, Sorokin E, Rohrich RJ, et al. Autologous human fat grafting: Effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(6):1836–44.
37. Sunaga A, Sugawara Y, Katsuragi-tomioka Y, Kobayashi E. The Fate of Nonvascularized Fat Grafts: Histological and Bioluminescent Study. *Plast Reconstr Surg – Glob Open [Internet].* 2013;1(6):e41.
38. Condé-Green A, Wu I, Graham I, Chae JJ, Drachenberg CB, Singh DP, et al. Comparison of 3 techniques of fat grafting and cell-supplemented lipotransfer in athymic rats: A pilot study. *Aesthetic Surg J.* 2013;33(5):713–21.
39. Hao L, Luo S, Li X, Yu D, Diao Z, Ren L, et al. Estradiol Enhanced Survival Ratio of Fat Transplant Adipose Tissue-Derived Stem Cells Treated with Estradiol Enhance Survival of Autologous Fat Transplants. *Tohoku J Exp Med.* 2013;231(2312):101–10.
40. Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, Wamsley S, Jensen J, Boutros S, et al. Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(5):1712–20.
41. Lujan-Hernandez J, Appasani R, Sullivan K, Siegel-Reamer L, Lalikos JF. Experimental in-vivo models used in fat grafting research for volume augmentation in soft tissue reconstruction. *Arch Plast Surg.* 2017;44(5):361–9.
42. Frayn KN, Karpe F. Regulation of human subcutaneous adipose tissue blood flow. *Int J Obes [Internet].* 2014;38(8):1019–26.
43. Ergün A. Yağ dokusu ve yağ hücresi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2005;25(3):412–20.

44. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes*. 2003;27(8):875–88.
45. Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso JA, Fernández S, Rodríguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev*. 2014;27(1):63-93.
46. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191-200.
47. Boucher J, Kleinridders A, Ronald Kahn C. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1):a009191.
48. Antal CE, Newton AC. Spatiotemporal Dynamics of Phosphorylation in Lipid Second Messenger Signaling. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013;12(12):3498–508.
49. Witters LA, Watts TD, Daniels DL, Evans JL. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988;85(15):5473–7.
50. Haystead TA, Hardie DG. Both insulin and epidermal growth factor stimulate lipogenesis and acetyl-CoA carboxylase activity in isolated adipocytes. Importance of homogenization procedure in avoiding artefacts in acetyl-CoA carboxylase assay. *Biochem J* [Internet]. 1986;234(2):279–84.
51. Hong SJ, Lee JH, Hong SM, Park CH. Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and β -fibroblast growth factor in autologous fat transplantation. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2010;63(7):1202–8.
52. Slavin BG, Ballard KW. Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue. *Anat Rec*. 1978;191(3):377–89.
53. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: Anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*. 1997;4(2):211–32.
54. Proença ARG, Sertié RAL, Oliveira AC, Campaña AB, Caminhotto RO, Chimin P, et al. New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014;47(3):192–205.

55. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res.* 2006;53(6):482–91.
56. Fogari R, Zoppi A, Pasotti C, Poletti L, Tettamanti F, Maiwald C. Effects of different beta-blockers on lipid metabolism in chronic therapy of hypertension. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol [Internet]*. 1988;26(12):597–604.
57. Markman B. Anatomy and physiology of adipose tissue. *Clin Plast Surg.* 1989;16(2):235–44.
58. Ercan A. (2017). *Sıçanlarda yağ grefti sağ kalımına sigara dumanının etkisinin deneysel olarak araştırılması.* (Yayınlanmamış Tez). İstanbul Üniversitesi, Türkiye.
59. Fulton JE, Parastouk N. Fat Grafting. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2008;16(4):459–65.
60. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A, et al. The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care [Internet]*. 2014;3(5):390–9.
61. Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Paleolog EM, Davies AH. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J Vasc Surg [Internet]*. 2013;58(1):219–30.
62. Duscher D, Neofytou E, Wong VW, Maan ZN, Rennert RC, Inayathullah M, et al. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2015;112(1):94–9.
63. Shen X, Wan C, Ramaswamy G, Mavalli M, Wang Y, Duvall CL, et al. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *J Orthop Res.* 2009;27(10):1298–305.
64. Wu Y, Li X, Xie W, Jankovic J, Le W, Pan T. Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 α and induction of autophagy in SH-SY5Y cells. *Neurochem Int.* 2010;57(3):198–205.
65. Flacco J, Chung N, Blackshear CP, Irizarry D, Momeni A, Lee GK, et al. Deferoxamine Preconditioning of Irradiated Tissue Improves Perfusion and Fat Graft Retention. *Plast Reconstr Surg [Internet]*. 2018;141(3):655–65.

66. O'Malley G. F. (2015). Iron Poisoning - Injuries; Poisoning. In: Merck Manual [Internet].
67. Wang C, Cai Y, Zhang Y, Xiong Z, Li G, Cui L. Local injection of deferoxamine improves neovascularization in ischemic diabetic random flap by increasing HIF-1 α and VEGF expression. *PLoS One*. 2014;9(6):3–10.
68. Sorisky A, Molgat ASD, Gagnon A. Macrophage-Induced Adipose Tissue Dysfunction and the Preadipocyte: Should I Stay (and Differentiate) or Should I Go? *Adv Nutr An Int Rev J* [Internet]. 2013;4(1):67–75.
69. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* [Internet]. 2016;69(2):170–9.
70. Segura S, Requena L. Anatomy and histology of normal subcutaneous fat, necrosis of adipocytes, and classification of the panniculitides. *Dermatol Clin*. 2008;26(4):419–24.
71. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(6):664–75.
72. Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc*. 2010;5(7):1294–311.
73. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*. 2004;22(5):560–7.
74. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
75. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(1):48–55.
76. Levi B, James AW, Nelson ER, Vistnes D, Wu B, Lee M, et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One*. 2010;5(6):e11177.

77. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.
78. Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5(5):362-9.
79. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006;24(2):376-85.
80. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg*. 2010;64(2):222-8.
81. Hafner A-L, Dani C. Human induced pluripotent stem cells: A new source for brown and white adipocytes. *World J Stem Cells* [Internet]. 2014;6(4):467–72.
82. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*. 2015;116(8):1413-30.
83. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang C-Y, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002;99(16):10730–5.
84. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardeña G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* (80-). 1998;281(5383):1683–6.
85. Alemany M. Regulation of adipose tissue energy availability through blood flow control in the metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(10):2108-19.
86. Obregon M-J. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol* [Internet]. 2014;5(12):1–12.
87. Mojallal A, Foyatier JL. Historique de l'utilisation du tissu adipeux comme produit de comblement en chirurgie plastique. *Ann Chir Plast Esthet*. 2004;49(5):419–25.
88. Davis, K. Making the Body Beautiful: A Cultural History of Aesthetic Surgery (review). *Bulletin of the History of Medicine* 2000;74(4):848-9.

89. Uroskie TW, Colen LB. History of breast reconstruction. *Semin Plast Surg* [Internet]. 2004;18(2):65–9.
90. Önel D, Emekli U, Çizmecici MO, Aköz F, Bilgiç B. Review of fat grafting and the fate of the subperiosteal fat graft. *Eur J Plast Surg*. 2003;26(4):169–74.
91. Peer LA. The neglected free fat graft. *Plast Reconstr Surg*. 1956;18(4):233–50.
92. Hamed S, Egozi D, Kruchevsky D, Teot L, Gilhar A, Ullmann Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e13986.
93. Locke MB, Chalain TMB De, Plast F. Current Practice in Autologous Fat Transplantation Suggested Clinical Guidelines Based on a Review of Recent Literature. *Ann Plast Surg*. 2008;60(1):98–102.
94. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: A 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(5):591–7.
95. Fournier PF. Fat grafting: My technique. *Dermatologic Surg*. 2000;26(12):1117–28.
96. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg* [Internet]. 1997;24(2):347–67.
97. Coleman SR. Structural Fat Grafting. *Aesthetic Surg J*. 1998;18(5):386–8.
98. Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts: With postulation of a “cell survival theory.” *Plast Reconstr Surg*. 1950;5(3):217–30.
99. Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, et al. Adipose tissue remodeling under ischemia: Death of adipocytes and activation of stem/ progenitor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(6):1911–23.
100. Carpaneda CA, Ribeiro MT. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic Plast Surg*. 1994;18(1):17–9.
101. Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: Evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(5):1081–92.

102. Li K, Gao J, Zhang Z, Li J, Cha P, Liao Y, et al. Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. *Aesthetic Plast Surg*. 2013;37(1):153–8.
103. Klein JA. The tumescent technique for liposuction surgery. *Am J Cosmet Surg*. 1987;4(4):263–7.
104. Keck M, Kober J, Riedl O, Kitzinger HB, Wolf S, Stulnig TM, et al. Power assisted liposuction to obtain adipose-derived stem cells: Impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual aspiration. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg [Internet]*. 2014;67(1):e1–8.
105. Chajchir A, Benzaquen I, Moretti E. Comparative experimental study of autologous adipose tissue processed by different techniques. *Aesthetic Plast Surg*. 1993;17(2):113–5.
106. Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ. Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(2):761–5.
107. Mojallal A, Foyatier JL. Facteurs influençant la survie de la greffe d'adipocytes. *Ann Chir Plast Esthet [Internet]*. 2004;49(5):426–36.
108. Butterwick KJ. Lipoaugmentation for aging hands: A comparison of the longevity and aesthetic results of centrifuged versus noncentrifuged fat. *Dermatologic Surg*. 2002;28(11):987–91.
109. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: Optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(3):1033–41.
110. Xie Y, Zheng D, Li Q, Chen Y, Lei H, Pu LLQ. The effect of centrifugation on viability of fat grafts: an evaluation with the glucose transport test. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2010;63(3):482–7.
111. Condé-Green A, Gontijo De Amorim NF, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: A comparative study. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2010;63(8):1375–81.
112. Pulsfort AK, Wolter TP, Pallua N. The effect of centrifugal forces on viability of adipocytes in centrifuged lipoaspirates. *Ann Plast Surg*. 2011;66(3):292–5.

113. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: A quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113(1):391–5.
114. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1990;85(3):378–86.
115. Bruno A, Delli Santi G, Fasciani L, Cempanari M, Palombo M, Palombo P. Burn scar lipofilling: Immunohistochemical and clinical outcomes. *J Craniofac Surg.* 2013;24(5):1806–14.
116. Sezgin B, Ozmen S, Bulam H, Omeroglu S, Yuksel S, Cayci B, et al. Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg [Internet].* 2014;67(5):712–20.
117. Kong MF, Jogia FR, Nayyar V, Berrington R, Jackson S. Squamous cell carcinoma in a heel ulcer in a patient with diabetes. *Diabetes Care.* 2008;31(7):2008.
118. Türegün M, Nişancı M, Güler M. Burn scar carcinoma with longer lag period arising in previously grafted area. *Burns.* 1997;23(6):496–7.
119. Eppley BL, Sidner RA, Platis JM, Michael Sadove A. Bioactivation of free-fat transfers: A potential new approach to improving graft survival. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90(6):1022–30.
120. Lillie LE, Temple NJ, Florence LZ. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: Weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum Exp Toxicol.* 1996;15(8):612–6.
121. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2514–23.
122. Raposio E, Caruana G, Petrella M, Bonomini S, Grieco MP. A Standardized Method of Isolating Adipose-Derived Stem Cells for Clinical Applications. *Ann Plast Surg.* 2016;76(1):124–6.
123. Sarkarat F, Kahali R. Fat Graft with Growth Factors. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am [Internet].* 2018;26(1):33–9.

124. Fagrell D, Eneström S, Berggren A, Kniola B. Fat cylinder transplantation: An experimental comparative study of three different kinds of fat transplants. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(1):90–8.
125. Pires Fraga MF, Nishio RT, Ishikawa RS, Perin LF, Helene A, Malheiros CA. Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2010;63(12):e818-22.
126. Ullmann Y, Hyams M, Ramon Y, Beach D, Peled IJ, Lindenbaum ES. Enhancing the survival of aspirated human fat injected into nude mice. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(7):1940–4.
127. Chung CW, Marra KG, Li H, Leung AS, Ward DH, Tan H, et al. VEGF microsphere technology to enhance vascularization in fat grafting. *Ann Plast Surg*. 2012;69(2):213–9.
128. Por YC, Yeow VKL, Louri N, Lim TKH, Kee I, Song IC. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg [Internet]*. 2009;62(8):1030–4.
129. Gupta R, Brace M, Taylor SM, Bezuhyly M, Hong P. In Search of the Optimal Processing Technique for Fat Grafting. *J Craniofac Surg [Internet]*. 2015;26(1):94–9.
130. Yoshimura K, Eto H, Kato H, Doi K, Aoi N. Manipulation of Stem Cells for Adipose Tissue Repair/Reconstruction. *Regen Med*. 2011;6(6s):33–41.
131. Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ. Estrogen: An emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *J Diabetes Res*. 2015;2015:916585.
132. Zhou J, Lu P, Ren H, Zheng Z, Ji J, Liu H, et al. 17 β -Estradiol protects human eyelid-derived adipose stem cells against cytotoxicity and increases transplanted cell survival in spinal cord injury. *J Cell Mol Med*. 2014;18(2):326–43.
133. Hong L, Colpan A, Peptan IA. Modulations of 17- β Estradiol on Osteogenic and Adipogenic Differentiations of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng [Internet]*. 2006;12(10):2747–53.
134. Hong L, Colpan A, Peptan I a, Daw J, George A, Evans C a. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng [Internet]*. 2007;13(6):1197–203.

135. D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning: evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem.* 2005;280(43):35983–91.
136. Luo S, Hao L, Li X, Yu D, Diao Z, Ren L, et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Treated with Estradiol Enhance Survival of Autologous Fat Transplants. *Tohoku J Exp Med [Internet].* 2013;231(2):101–10.
137. Nguyen PSA, Desouches C, Gay AM, Hautier A, Magalon G. Development of micro-injection as an innovative autologous fat graft technique: The use of adipose tissue as dermal filler. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2012;65(12):1692–9.
138. Kirkham JC, Lee JH, Medina MA, McCormack MC, Randolph MA, Austen WG. The impact of liposuction cannula size on adipocyte viability. *Ann Plast Surg.* 2012;69(4):479–81.
139. Livaoğlu M, Buruk CK, Uraloğlu M, Ersöz Ş, Livaoğlu A, Sözen E, et al. Effects of lidocaine plus epinephrine and prilocaine on autologous fat graft survival. *J Craniofac Surg.* 2012;23(4):1015–8.
140. Phipps KD, Gebremeskel S, Gillis J, Hong P, Johnston B, Bezuhyly M. Alternatively activated M2 macrophages improve autologous fat graft survival in a mouse model through induction of angiogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2015;135(1):140–9.
141. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope.* 2000;110(8):1333–8.
142. Kato H, Mineda K, Eto H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, et al. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: Dynamic total tissue remodeling during the first 3 months. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(3).
143. Soares MA, Ezeamuzie OC, Ham MJ, Duckworth AM, Rabbani PS, Saadeh PB, et al. Targeted protection of donor graft vasculature using a phosphodiesterase inhibitor increases survival and predictability of autologous fat grafts. *Plast Reconstr Surg.* 2015;135(2):488–99.
144. Shoshani O, Livne E, Armoni M, Shupak A, Berger J, Ramon Y, et al. The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg.* 2005;115(3):853–9.

145. Shoshani O, Shupak A, Ullmann Y, Ramon Y, Gilhar A, Kehat I, et al. The effect of hyperbaric oxygenation on the viability of human fat injected into nude mice. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(6):1390–6.
146. Zhou J, Lu P, Ren H, Zheng Z, Ji J, Liu H, et al. NIH Public Access. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2014;31(2):1911–23.
147. Garza RM, Rennert RC, Paik KJ, Atashroo D, Chung MT, Duscher D, et al. Studies in fat grafting: Part IV. adipose-derived stromal cell gene expression in cell-assisted lipotransfer. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(4):1045–55.
148. El Tal AK, Abrou AE, Stiff MA, Mehregan DA. Immunostaining in Mohs micrographic surgery: A review. *Dermatol Surg*. 2010;36(3):275-90.
149. Schimming TT, Grabellus F, Roßner M, Pechlivanis S, Sucker A, Bielefeld N, et al. PHH3 immunostaining improves interobserver agreement of mitotic index in thin melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2012;34(3):266-9.
150. Hao X, Zhang T, Yang Y, Feng H, Wang Y, Song Y, et al. Morphological features of cell death and tissue remodeling of fat grafts. *Ann Plast Surg*. 2015;74(6):722-7.
151. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-55.
152. Kato H, Araki J, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Mineda K, et al. Normobaric hyperoxygenation enhances initial survival, regeneration, and final retention in fat grafting. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134(5):951-9.
153. Zanata F, Bowles A, Frazier T, Curley JL, Bunnell BA, Wu X, et al. Effect of cryopreservation on human adipose tissue and isolated stromal vascular fraction cells. *Plast Reconstr Surg*. 2018;141(2):232e-243e.
154. Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 2005;205(1):114–22.
155. Simonacci F, Bertozzi N, Raposio E. Off-label use of adipose-derived stem cells. *Ann Med Surg (Lond)*. 2017;24: 44–51.

156. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry* [Internet]. 2010;77(1):22–30.
157. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*. 2008;102(1):77–85.
158. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2008;17(6):1053–63.
159. Spiekman M, van Dongen JA, Willemsen JC, Hoppe DL, van der Lei B, Harmsen MC. The power of fat and its adipose-derived stromal cells: emerging concepts for fibrotic scar treatment. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(11):3220–35.
160. Corselli M, Crisan M, Murray IR, West CC, Scholes J, Codrea F, et al. Identification of perivascular mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry. *Cytometry A*. 2013;83(8):714–20.
161. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36(2):169–80.
162. Marien KM, Croons V, Waumans Y, Sluydts E, De Schepper S, Andries L, et al. Development and Validation of a Histological Method to Measure Microvessel Density in Whole-Slide Images of Cancer Tissue. *PLoS One*. 2016;11(9):1–20.
163. Pajvani UB, Trujillo ME, Combs TP, Iyengar P, Jelicks L, Roth KA, et al. Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: A new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy. *Nat Med*. 2005;11(7):797–803.