



TÜRKİYE CUMHURİYETİ KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**TİYOKOLŞİKOSİD GRUBU KAS GEVŞETİCİ İLAÇLARIN YAĞ GREFTİ
YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DR. MEHDI ASADOV

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

KOCAELİ-2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**TİYOKOLŞİKOSİD GRUBU KAS GEVŞETİCİ İLAÇLARIN YAĞ GREFTİ
YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DR. MEHDI ASADOV

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ CAN İLKER DEMİR**

**ANABİLİM DALI BAŞKANI
PROF. DR. MURAT ŞAHİN ALAGÖZ**

**Bu tez, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
2021/2670 proje numarası ile desteklenmiştir.**

KOCAELİ-2021

TEŞEKKÜRLER

Tıp Doktoru Eğitimi aldığım İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesindeki eğitim günlerimden beri mesleki ideallerimin zirvesinde yer alan Plastik, Estetik ve Rekonstrüktif Cerrahi Uzmanlığı eğitimini tamamlayıp, 2016 yılından beri adeta evim olan Kocaeli Üniversitesi Plastik Cerrahi Kliniği'nden ayrılıyorum. Bu zorlu ve bir o kadar da onurlu yolda her zaman desteklerini esirgemeyen, tecrübelerini benle paylaşan, benim donanımlı bir uzman hekim olarak yetişmemde emek harcayan her bir insana, tüm hocalarımın teşekkürü borç bilirim.

Bize toplumda üst düzey kimlik kazandıran, ideallerimizi barındıran mesleğimizi bize hayatını emanet eden hastalar sayesinde öğrendiğimizi ve bunun bilinciyle kararlar almamız gerekliliğini bize her zaman hatırlatan bilgi birikimi, etik kuralları ve profesyonelliği ile bize hep örnek olan anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Murat Şahin ALAGÖZ'e çok teşekkür ederim. Değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Emrah Kağan YAŞAR'a bilgi-birikimi ve tecrübelerini her zaman paylaştığı için, mesleki olarak zorlandığım her anda yanımda olduğu için teşekkür ederim. Asistanlığımın ilk yıllarından itibaren bir ağabeyim olarak hekimliği ve çalışkanlığını her daim örnek aldığım tez danışmanım, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Can İlker DEMİR'e tez hazırlama sürecinde verdiği destek ve iyi bir uzman olarak yetişmem için yaptığı tüm yardımlar için teşekkür ederim.

Kendisi ile çalışarak, deneyimlerinden faydalanabilme fırsatı bulduğum için çok şanslı olduğum sayın hocam Prof. Dr. Hakan AĞIR'a teşekkür ederim.

Klinikte birlikte omuz omuza çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma verdikleri destek ve zor anlarımızda gösterdikleri sabır için çok teşekkür ederim. Servis ve ameliyathane hemşirelerimize, personellerimize, poliklinik çalışanlarımıza çok teşekkür ederim.

Tez aşamasında verdikleri destekten dolayı Vet. Hekim Cüneyt ÖZER'e ve tüm DETAB çalışanlarına; çalışmanın histopatolojik değerlendirmesinde büyük katkısı ve emeği olan Kocaeli Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Büşra Yaprak BAYRAK'a, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Sibel Balcı'ya çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımı yapabilmem için, 2021/2670 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak, doğduğum günden beri beni iyi bir insan olarak yetiştirmek için sonsuz gayret gösteren, mutluluğumda ve başarılarımda tartışmasız en büyük pay sahibi olan değerli aileme:Karakteri,adaleti ve zorluklara korkusuzca yürümesini her zaman örnek aldığım babam Eldar ASADOV'a, pozitif enerjisini her daim yüzüme yansıtan ve mücadeleci ruhunu benimsediğim annem Zulfiyya ASADOVA'ya, her anımda yanımda olup, beni destekleyen sevgili kardeşlerim Sakina ASADOVA'ya ve Murad ASADOV'a sonsuz TEŞEKKÜR EDERİM...



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
RESİM VE ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Yağ Greftinin Tarihçesi	2
2.2. Yağ Dokusunun Genel Özellikleri	4
2.3. Otolog Yağ Greftinin Alınması, Hazırlanması ve Uygulama Teknikleri	5
2.4. Yağ Greftinin Tutma Aşamaları	7
2.5. Tiyokolşikosid Grubu Kas Gevşeticiler	12
2.5.1. Tiyokolşikosid Grubu Kas Gevşeticilerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	12
2.5.2. Tiyokolşikosid Grubu Kas Gevşeticilerin Farmakolojik Özellikleri	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
3.1. Deney Hayvanları ve Bakım-Barınma Koşulları	14
3.2. Sıçanlara Anestezi Uygulanması	14

3.3. Deney Grupları	16
3.4. Deney Cerrahisi Akış Planı	16
3.4.1. Kullanılan Cerrahi Araç ve Gereçler	16
3.4.2. Deney	17
3.4.3. Deneyin Sonlandırılması: Yağ Grefti Örneklerinin Alınması ve Histopatolojik İnceleme	26
3. 4. 4. İstatistiksel Değerlendirme	33
4. BULGULAR	34
4.1. Makroskopik Değerlendirme	34
4.2. Histopatolojik İnceleme	38
4.3. İmmunohistokimyasal İnceleme	49
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	64
ÖZET	65
ABSTRACT	66
EKLER	67

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

- RPM: Dakikada devir sayısı
SVF: Stromal vasküler fraksiyon
ASC: Adiposit kaynaklı kök hücre
TGF beta: Transforme edici büyüme faktörü beta
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
CD: küme farklılaşma işaretçisi
CAL: Hücre destekli lipotransfer
VEC: Vasküler endotelyal hücreler
P_tO₂: Parsiyel oksijen basıncı
C27H33NO10S: N-((7S)-3-(beta-D-glucopiranosiloksi)-1,2-dimetoksi-10-(metilsülfanil)-9-okso-5,6,7,9-tetrahidrobenzo(a)heptalen-7-il)asetamid
GABA: Gama amino bütirik asit
RANKL: Osteoklast hücre yüzeyi reseptörü ligandı
H&E: Hematoksilen Eosin
Btx-A: Botulinum toksin-A
EGF: Epidermal büyüme faktörü
ER- α : Östrojen reseptör- α
NF- κ B: Nükleer faktör kappa B
PRP: Plateletten zengin plazma

RESİMLER VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 1: Greft sağkalım ve greft yerine koyma teorilerinin kombinasyonunu tarif eden şematik diyagram. Yağ grefti periferik zonda greftin hayatta kalma teorisi ile tariflenen şekilde, aralık zonda ise greft yerine koyma teorisi ile tariflenen şekilde hayatta kalıyor. Santral zondaki adiposit ve adiposit türevi kök hücreler ölüyor.....8

Resim 2: Yağ dokusunun yeniden şekillenmesinin ilk 3 ayı boyunca, nakledilen adipositlerin mikro ortamlarına bağlı olarak farklı kaderleri vardır. Bu şemada adiposit kaderi dört modele ayrılmıştır: hayatta kalma, başarılı rejenerasyon, başarısız rejenerasyon (skatrizasyon) ve yağ kisti oluşumu. Skatrizasyon ve yağ kisti oluşumu genellikle 3 ayda tamamlanmamaktadır.....10

Resim 3: Deneyleerin gerçekleştirdiği Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi (a); operasyonların yapıldığı standartlara uygun ameliyathane odası (b).....15

Resim 4: Denekler postoperatif bakım ünitesinde ayrı kafeslerde barındırıldı ve günlük bakımları yapıldı.....16

Resim 5: Operasyon sırasında kullanılan cerrahi aletler.....17

- Resim 6:** Alıcı sahanın hazırlanması. a) preoperatif olarak ciltte işaretlemeler yapıldı; b) İnterskapuler bölge orta hattan yapılan 1 cm'lik horizontal insizyonla girildi; c) Panniculus karnozus tabakasının altından oksipital bölgeye ciltaltı tünel oluşturuldu; d) oksipital bölgede kasüstü planda standart poş oluşturuldu.....20
- Resim 7:** Oksipital bölgeye doğru oluşturulan ciltaltı poşun giriş insizyonundan görünümü.....21
- Resim 8:** a) Sağ inguinal bölgede 1 cm'lik standart insizyon planlandı; b) İnsizyonun ardından sağ inguinal yağ yastıkçığı üzerine düşüldü.....22
- Resim 9:** Yağ yastıkçığı çevre dokulardan keskin ve künt diseksiyonla ayrıldı ve greft şeklinde alındı.....23
- Resim 10:** a) Elde edilen yağ greftinin makroskopik görünümü; b) Doku örneği dijital hassas terazide ölçüldü; c) Yüzdürme yöntemiyle hacim ölçümü yapıldı.....24
- Resim 11:** Greft ölçüm işlemleri sonrasında; a) interskapuler bölgedeki insizyondan girilerek; b) cilt altından tünelize şekilde oksipital bölgedeki alıcı alana transfer edildi.....25
- Resim 12:** a) inguinal bölgedeki donör saha; b) sırt bölgesindeki alıcı saha insizyonları non-absorbable sütürlülerle primer onarıldı.....26
- Resim 13:** On iki haftalık takip süresi sonrasında oksipital bölgeden yapılan insizyonla yağ greftlerine ulaşıldı.....27
- Resim 14:** On iki haftalık takip sonrasında; a) Oksipital bölgeye uygulanmış olan yağ greftinin alıcı sahadan alınmasından hemen önceki makroskopik görünümü; b) Zeminden grefte doğru giden vasküler yapılar makroskopik olarak görülmekte (siyah ok); c) Greftin alıcı sahadan alınmasından hemen sonra zeminde clavotrapezius kaslarının görünümü....28
- Resim 15:** Gruplara ait sonuç greft örnekleri a) kontrol grubu greft örneği; b) oral uygulama grubu greft örneği; c) parenteral uygulama grubu greft örneği.....38

Resim 16: Kistik vakuol ve yağ nekrozu bulguları- H&E boyama. a) Kontrol grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (H&E, x200 büyütme) b) Parenteral uygulama grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (H&E, x400 büyütme).....41

Resim 17: Kistik vakuol ve yağ nekrozu bulguları- Oil red boyama. a) Kontrol grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (Oil red, x400 büyütme); b) Parenteral uygulama grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (Oil red, x400 büyütme).....42

Resim 18: Yağ dokusunda şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu- H&E boyama. a) Kontrol grubunda düşük derece adipositlerde şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu (kalın ok) b) Parenteral uygulama grubunda düşük derece adipositlerde şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu (kalın ok) (H&E, x200 büyütme).....45

Resim 19: Fibrozis ve inflamasyon bulguları- H&E boyama. a) Kontrol grubunda düşük derece fibrozis (kalın ok), yüksek derece inflamasyon (işaretli alan) (H&E, x400 büyütme); b) Parenteral uygulama grubunda grubunda yüksek derece düzeyde fibrozis (işaretli alan), düşük derece inflamasyon görünümü (H&E, x400 büyütme).....48

Resim 20: Viable-non viable adiposit sayımı a) Kontrol grubunda galectin 3 ile boyama paterni; b) Oral uygulama grubunda galectin 3 ile boyama paterni (kalın ok) (Galectin 3, x400 büyütme); c) Kontrol grubunda perilipin ile boyama paterni; d) Oral uygulama grubunda perilipin ile boyama paterni (kalın ok) (Perilipin, x400 büyütme).....51

Resim 21: Gelişimini tamamlamış vasküler yapıların değerlendirilmesi a) Kontrol grubunda damar duvarı (kalın ok); b) Oral uygulama grubunda boyanan damar duvarları (kalın oklar), (CD31, x400).....53

Resim 22: Neovaskülogenezin değerlendirilmesi a) Kontrol grubunda boyanan damar duvarı (kalın ok) VEGF, x200); b) Parenteral uygulama grubunda boyanan damar duvarları (kalın oklar), (VEGF, x400).....55

TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1: DeneY sıralamasının Şematize tablosu.....	19
Tablo 2: Grupların istatistiksel olarak karŐılaŐtırmasında denek ağırlık yŪzde deĐiŐim oranları arasında anlamlı farklılık saptanmadı, $p > 0,05$ bulundu. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil).....	34
Tablo 3: Deneklerde ilk operasyonda uygulanan ve ikinci operasyonda elde edilen sonuĐ yaĐ greftlerinin aĐırlık ve hacim deĐerleri ŐlçŪlerek kaydedildi.....	35
Tablo 4: Grupların istatistiksel olarak karŐılaŐtırmasında greft ağırlık ve hacim yŪzde deĐiŐim oranları arasında anlamlı farklılık saptandı, $p < 0,05$ bulundu. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil).....	36
Tablo 5: Ūç grubun ikili karŐılaŐtırmasında parenteral uygulama grubundaki greft aĐırlık yŪzde deĐiŐim oranları kontrol grubuna gŪre anlamlı olarak daha az saptanmıŐtır.....	37
Tablo 6: Ūç grubun ikili karŐılaŐtırmasında oral ve parenteral uygulama grubundaki greft hacim yŪzde deĐiŐim oranları kontrol grubuna gŪre anlamlı olarak daha az saptanmıŐtır.....	37
Tablo 7: Histopatolojik parametrelerin puanlanması.....	39

Tablo 8: Gruplar arasında histopatolojik parametrelerin değerlendirilmesi. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil).....	39
Tablo 9: Üç grubun ikili karşılaştırmasında parenteral uygulama grubundaki fibrozis oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı.....	46
Tablo 10: Üç grubun ikili karşılaştırmasında parenteral uygulama grubundaki inflamasyon oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandı.....	47
Tablo 11: Gruplar arasında immunohistokimya parametrelerinin değerlendirilmesi. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil).....	49
Tablo 12: Üç grubun ikili karşılaştırmasında oral uygulama grubundaki CD31 ile immunohistokimyasal boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı.....	52
Tablo 13: Üç grubun ikili karşılaştırmasında kontrol grubundaki VEGF ile immunohistokimyasal boyanma oranları parenteral uygulama grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı.....	54
Grafik 1: Grafik her 3 gruba ait yağ grefti ağırlık yüzde değişim oranlarının medyan, 25. ve 75. yüzdelerdeki değerler karşılaştırılması.....	36
Grafik 2: Gruplar arasında yağ grefti hacim yüzde değişim oranlarının medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerler karşılaştırılması.....	37
Grafik 3: Gruplar arasında yağ nekrozu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Grafik 4: Gruplar arasında kist-vakuol oluşumu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Grafik 5: Gruplar arasında vaskülarizasyon histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.....	43
Grafik 6: Gruplar arasında adipositlerde şekil bozukluğu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.	43

Grafik 7: Gruplar arasında miyelin figür oluşumu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.....	44
Grafik 8: Gruplar arasında fibrozis histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.....	46
Grafik 9: Gruplar arasında inflamasyon histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.....	47
Grafik 10: Gruplar arasında perilipin ve galectin ile immunohistokimyasal boyamayla değerlendirilen adiposit yaşayabilirliği parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması	50
Grafik 11: Gruplar arasında CD31 ile immunohistokimyasal boyamayla değerlendirilen vaskülarizasyon parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması	52
Grafik 12: Gruplar arasında VEGF ile immunohistokimyasal boyamayla değerlendirilen vaskülarizasyon parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması	54

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otolog yağ nakli zamanla plastik cerrahide hacim ve kontür deformitelerinin düzeltilmesinde hem estetik hem de rekonstrüktif işlemlerde yüksek etkinlik gösteren önemli tekniklerden biri olmuştur. İlk zamanlarda yağ grefti nakli her ne kadar sadece estetik prosedürlerde kullanılmış olsa da yeni gelişmelerle rekonstrüktif cerrahide de cazip seçenek haline gelmiştir. Yağ grefti yöntemi yüz gençleştirilmesi, meme augmentasyonu, radyasyon hasarının hafifletilmesi, meme kapsül kontraktürleri tedavisi, post-travmatik deformitelerin, doğumsal anomalilerin ve yanık hasarının düzeltilmesinde başarılı şekilde kullanılmıştır.¹⁻⁷ Rekonstrüksiyonda otolog yağ grefti kullanımının; donör saha morbiditesinin az olması, prosedürün teknik olarak karmaşık olmaması, düşük maliyet, immun reaksiyon oluşmaması, vücutta kaynakların genellikle yeterli olması gibi birçok yararlı özellikleri vardır. Bunun dışında, yağ dokusu greftlerinde biyoaktif faktörler mevcuttur. Adipoz doku partikülleri; adipoz kök hücreler veya preadipositler, fibroblastlar, vasküler endotelial hücreler ve birçok immün hücreler içermektedir.⁸ Stromal vasküler fraksiyonel hücrelerin ve adipoz kök hücrelerin anjiojenik özellikleri sayesinde yağ grefti sağkalımını arttırması konusu son yıllarda geniş araştırma konusu olmuştur.^{9,10} Adipoz doku kaynaklı hücre kültürleri doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında geniş kullanım alanı bulmuştur.

Çalışmamızın amacı tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların alıcı sahada erken dönemde yağ greftinin temas ettiği yüzeyde kasların travmatik myospazmına bağlı yıkıcı etkilerinin izole edilmesi ve başlayan rejenerasyon süreci için stabil bir mikroçevre sağlanmasının ağırlık ve hacim kaybına etkisinin değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Yağ Greftinin Tarihçesi

Jacques Reverdin ¹¹ 1869 yılında insanda başarılı olarak epidermis dokusunu naklederek, orijinal bölgesinden tamamen ayrılmış bir doku parçasının, yüzeyi kaplamak için vücudun başka bir bölümüne nakledildiğinde hayatta kalabileceğini kanıtlamıştır. Deri greftleme kısa sürede kronik yaraların tedavisi için tercih edilen yöntem haline gelmiştir.

Tarihsel olarak yağ greftlemesi ile ilgili ilk bildiri 1893 yılında koldan yağ dokusu olarak, osteomyelit sonrası çökmüş fasiyal skarı düzeltmek için kullanan Alman cerrah *Gustav Neuber* tarafından yayınlanmıştır.¹² Bunu 2 yıl sonrasında ameliyat sonrası göğüs deformitesini düzeltmek için kalçadan lipom transferi yapan *Vincenz Czeerny* takip etmiştir.¹³ O zamanın şartlarında yağ grefti nakli öngörülemez sonuçları ile çok zor prosedürler olarak sayılmaktaydı. Yağ dokusunu alıcı alana uygulamak için şırıngaların piyasaya sürülmesine kadar, yağ her zaman en-blok olarak, genellikle dermis (dermal yağ grefti olarak da adlandırılır) ile naklediliyordu.Bu problemlerinin çözümü için *Eugene Hollânder* ilk kez yağı küçük çaplı kanüller ile enjekte etmiştir.^{14,15}

Yağın iyileştirme potansiyeli, Birinci Dünya Savaşı'nın neden olduğu korkunç şekil bozukluklarının yönetimiyle karşı karşıya kalan cerrahlar tarafından fark edilmiştir. Yaralara, iyileşme sürecini desteklemek veya yaralanan askerlerin ateşli silah yaralarından kaynaklanan düzensiz yara izlerini düzeltmek için yağ uygulanmıştır. Alman maksillofasiyal cerrah *Erich Lexer* ¹⁶ ilk olarak, yüzü bozulmuş bir askerde bir protez yerleştirmek ve göz yuvasını yeniden yapılandırmak için lokal flepler ve kıkırdak grefti ile birlikte yağ dokusunu kullanmıştır.

Başlangıçta, cerrahlar tek başına veya cilt flepleri ile kombinasyon halinde en-blok yağ grefti tekniğini coşkuyla tercih etmişlerdir, çünkü bu genellikle büyük sorunları basit bir şekilde çözenin tek yolunu temsil ediyordu. Romberg hastalığında yüze, mastektominin sekellerini düzeltmek için memeye veya yarı damak ameliyatında burundan hava kaçışını azaltmak için farinkse yağ yerleştirilmiştir. Bununla birlikte, 1930'larda, artan deneyimle birlikte, klinisyenler, yüz güldürücü erken sonuçların öngörülemeyen bir yeniden emilim oranı ve yağlı kistler oluşturma eğilimi nedeniyle uzun vadede kötüleştiğini fark etmişlerdir. Esnek yağ grefti yavaş yavaş değişime uğrayarak edilerek sertleşip fibrotik hale gelmekteydi.¹⁷

Erken dönem iyi sonuçlarına karşılık uzun dönem sonuçları değişken ve öngörülemez olan yağ doku nakli uzun dönem tercih dışında kalmıştır. Fakat, 1950'li yıllarda *Lyndon Peer*'in

nakledilmiş yağ dokusunun makro ve mikro özelliklerini araştırarak, adipoz greftlerin ağırlığının işlem sonrası 1. yıl sonunda yaklaşık %45'ini kaybettiğini raporlamasıyla yağ doku transferinde geliştirme ve öngörülebilir sonuçlar için umutlar yeniden doğmuştur. *Peer*'in değerlendirmelerine göre yağ dokusu alınırken ve nakledilirken uygunsuz saklanma koşulları yağ dokusu yaşayabilirliğini azaltmaktadır. Bunun dışında büyük volümlü yağ greftlerinin, küçük partikül şeklinde olanlara karşılık daha hızlı rezorbe olduğunu bildirmiştir. *Peer*'e göre mikroskopik olarak görülen revaskülarizasyon oranı greft yaşayabilirliği için önemlidir.¹⁸ Buna ek olarak 1980'lerde *liposuction* yönteminin *Fournier* ve *Illouz* tarafından tariflenmesi sonrasında yağ greftine ilgi yenilenmiştir.^{19,20}

Lipoaspiratın greftlenmesi erken dönemde yalnız kısmi olarak başarılı olmuştur; yaşayabilirliğin daha da artması için hazırlık sürecinin geliştirilmesi daha çok anlam kazanmıştır. *Coleman*'ın 1990'larda tarif ettiği standart tekniğe kadar bu alanda ciddi bir kafa karışıklığı mevcuttu. Bu, yapısal yağ greftlenmesi isimli teknik yağ greftinin nazik bir şekilde alınması, santrifüj edilmesi ve çoklu doku planlarına seri küçük hacimli enjeksiyonları tariflemektedir.²¹ *Coleman*'ın öncü çalışmasında kullanılan "rejeneratif protokoller" yağ greftinin 3000 rpm devirde santrifüj edilmesini önermekteydi. Bu uygulama, nakledilecek dokularda önemli bir hasara neden olmadan, yağ miktarını azaltmak ve mümkün olduğunca fazla yağ, kan ve suyu gidermek amacıyla deneysel olarak belirlenmişti.²² Santrifüj sonrası yağın ultrastrüktürel araştırılması, olgun adipositlerde sitoplazmik membranda bozulmalar ve hücresel nekroza kadar değişen çeşitli derecelerde hasarlar olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, minimal hasarla stromal vasküler fraksiyonun (SVF) korunduğu gözlemlenmiştir.²³ 2007'de *Gino Rigotti* ve ark.²³ Adiposit kaynaklı kök hücrelerin (ASC) rejeneratif özelliklerini kullanarak radyasyon doku hasarını başarıyla yönetmişlerdir. Bu rejeneratif terapilerin ilk örneği olarak kabul edilebilir.

Günümüzde yağ enjeksiyonu uygulamaları farkedilebilir şekilde evrimleşmiş ve en popüler prosedürler arasında yer almaktadır. Çünkü bu uygulamalar plastik cerrahlara dokular üzerinde şaşırtıcı rejeneratif etkileri olan inanılmaz bir estetik ve rekonstrüktif klinik uygulama yelpazesi sunmaktadırlar.

2.2. Yağ Dokusunun Genel Özellikleri

Adipoz doku öncelikli olarak lipid yüklü adipositlerden ve onu çevreleyen her birisi farklı fonksiyona sahip stromal vasküler hücrelerden oluşmaktadır. Stromal vasküler hücreleri

fibroblastlar, immün hücreler, perisitler ve endotelial hücreler oluşturmaktadır. Adipositleri bir arada tutan ekstrasellüler matriks adipoz doku için bir iskeletsel çatı sağlamaktadır. Adipoz dokunun kahverengi yağ dokusu ve beyaz yağ dokusu olmak üzere iki ana formu vardır. İnsanda kahverengi yağ dokusu neonatal dönemde mevcut olup ağırlıklı olarak termogenezin oluşumunda görev almaktadır. Bunun dışında kahverengi yağ dokusunun erişkin insan metabolizmasında bilinen önemli rolü yoktur.²⁴ Yağ doku greftlemede kullanılan yağ dokusu ise beyaz yağ dokusu olduğundan, bu tip yağ dokusu odak noktamız olacaktır.

Beyaz yağ dokusunun enerjiden zengin trigliseridleri içermek, yaşamsal yapı ve organların tamponlanması, metabolik homeostazın sürdürülmesinin sağlanması, immün regülasyon ve anjiogenezde farklı rol ve fonksiyonları mevcuttur.²⁵⁻²⁸ Adipoz dokunun imbalansı; fazla yağ dokusu şeklinde obezite, azalmış yağ dokusu şeklinde edinsel/konjenital lipodistrofiler veya yaşlanmanın kontur düzensizlikleri olarak ortaya çıkar. Adipoz doku ürettiği hormon türleri, sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer peptidler sayesinde metabolik homeostazı etkilemektedir. Adipoz dokudan salgılanan faktörler lipid ve steroid metabolizması, büyüme faktörünün uyarılması, protein bağlanması, sitokin sinyal iletimi, vazoaktivite, eikozanoid aktivitesi, alternatif kompleman sistemi aktivasyonu ve ekstrasellüler matriks depolanması gibi geniş spektrumlu fizyolojik olayları etkilemektedir. Adipokin olarak adlandırılan bu efektör moleküller etkilerini endokrin, parakrin ve otokrin yollarla gösterir.²⁵⁻²⁸

Adiposit türevi kök hücreler insan adipoz dokularında, kan damarlarının çevresinde ve bağ dokusu iskeletinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu hücrelerin hücre kültür ayırıştırması için bir çok teknikler tanımlanmıştır.²⁹⁻³¹ Ayırıştırılmış sonuç hücre kültürü yüksek heterojenite içeren stromal vasküler fraksiyondur(SVF). Taze ayırıştırılmış ve kültüre edilmiş adiposit türevi kök hücrelerin flow sitometrik analizlerinde CD34, CD90, CD31, CD146 şeklinde progenitor yüzey markerlerin bulunduğu görülmüştür.^{30,32-36}

Yağ transferindeki sonuçları iyileştirmek için otolog SVF hücrelerinin yağ greftine eklenmesiyle greft hacmini koruyan ve neovaskülarizasyonu teşvik eden bir klinik strateji geliştirilmiştir.³⁷⁻⁴⁰ Hücre destekli lipotransfer (CAL) olarak adlandırılan, lipoenjeksiyonda ASC katılımını, kök hücrelerin büyüme faktörü salınımı, özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü gibi anjiyojenik büyüme faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Yağ greftine

ASC eklenmesini destekleyen başka bir hipotez, ASC'lerin üzerinde ilave kök hücrelerin organize edebileceği ve farklılaşabileceği bir iskele sağladığı kavramını savunmaktadır.³⁵

2.3 Otolog Yağ Grefti Alınması, Hazırlanması ve Uygulama Teknikleri

Yaklaşık 30 yılı aşkın sürede literatürde çok sayıda otolog yağ dokusu greftleme teknikleri tanımlanmıştır. Bu tekniklerin hepsi kendiliğinde geliştirilmiş tutarlılık ve daha güvenilir sonuçlar vadetmiştir. Ancak bugüne kadar tüm otoriteler tarafından kabul edilmiş bir standart belirlenememiştir. Otolog yağ dokusu greftlemesinde 3 ana aşamada cevaplanması gereken birçok soru mevcudiyetini korumaktadır:(1) greftin donör sahadan alınması;(2) greftin ex vivo işlenmesi;(3) alıcı sahaya uygulanması. Bu teknikleri geliştiren araştırmacılar adipogenezin hem in vivo ve in vitro modellerinin yanı sıra klinik değerlendirmelerden de yararlanmışlardır. Şimdiye kadar bir fikir birliği olmaması, çeşitli metodolojiler karşılaştırıldığında belirsiz sonuçlar gösteren çok sayıda çalışmadan kaynaklanmaktadır. 2009 yılında, Amerikan Plastik Cerrahi Derneği Yağ Grefti Çalışma Grubu (*Fat Graft Task Force*) mevcut literatürün kapsamlı bir incelemesine dayanarak, otolog yağ grefti için kanıta dayalı kılavuz yayınlamıştır.⁴¹ Otolog yağ grefti alınmasında genel yaklaşım şırınga aspirasyonunu ve *liposuction* ı içermektedir.⁴²⁻⁴⁴ Alınma sırasında ana odak noktaları invazivlik düzeyinin azaltılması ve doku yaşayabilirliğinin yükseltilmesidir. Yağ Grefti Çalışma Grubu'nun 2009 yılı raporunda 3-4 mm künt kanüllerle minimum *suction* miktarına ulaşarak, greft alımı uygulaması önerilmiştir.⁴¹ Buna karşılık, 2013 raporunda *Lee* standart bir 4 mm kanül yoluyla -0.83atm 'ye kadar emme basınçları ile yağ grefti toplandığında, paket boyutunda veya histolojik mimaride istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir.⁴⁵ Ek olarak, ultrason destekli *liposuction* kullanımının hücresel canlılık ve genel greft sağkalım oranları üzerinde minimum etkiye sahip olduğu görülmektedir; kullanılan greft alım tekniğine bakılmaksızın, benzer miktarda SVF hücre popülasyonuna ulaşılmıştır.⁴⁶

Liposuction aspiratları, yağ dokusu greftlemesi ve rejenerasyonu için gereksiz olan bazı bileşenleri içerir; su, yağ (mekanik olarak hasarlanmış yağ hücreleri) ve kan hücreleri (eritrositler ve beyaz kan hücreleri). Bu tür bileşenlerin çıkarılması ve canlı adipositlerin ve ASC'lerin sayısını azaltmadan greft hacminin azaltılması önerilir; buna greft dokusunun yoğunlaştırılması denir. Doku yoğunlaştırılması, özellikle meme büyütme gibi greft hacminde maksimum bir limit olduğunda önemlidir. Greft dokusu yoğunlaştırma için 3 ana yöntem vardır: *dekantasyon* (yerçekimi çökeltme), vakumlu veya vakumsuz filtrasyon ve

santrifüjleme. Bu üç yöntem arasında su içeriğini izole etmek için en etkili yöntem santrifüjleme olup dezavantaj olarak, ASC'leri kaybetmekle birlikte, bazı adipositler mekanik kuvvete maruz kalabilir ve ortaya çıkan yoğunlaşmış yağ daha viskoz hale gelebilir. Bu yüksek viskoziteli yağı küçük bir kanül yoluyla enjekte etmek için daha yüksek basınç gerekebilir. Mekanik travmaya maruz kalmış adipositlerden salınan yağ yabancı madde benzeri inflamasyona neden olabilir, bu nedenle, greftleme sonrası daha iyi sonuç için tariflenen yağın uygulanan greft materyalinden ayrıştırılması gerektiği savunulmaktadır.⁴⁷ Kontaminasyonu azaltmak ve yaşayabilirliği arttırmak için açık hava maruziyeti ve mekanik travma minimize edilmelidir.

İşlendikten sonra yağ dokusu künt uçlu enjeksiyon iğneleri kullanılarak, farklı dağılım yöntemleriyle ciltaltı olarak uygulanır. Yağ grefti yaşayabilirliğinin optimizasyonu için, enjeksiyon aşamasında mekanik doku hasarının azaltılması gerekmektedir. Yağ Grefti Çalışma Grubu 2009 raporu 2-2.5 mm künt uçlu infüzyon kanülü ile enjeksiyon yapılmasını önerir; küçük yağ porsiyonları augmentasyon alanındaki çoklu doku planlarına çoklu enjeksiyonlarla uygulanmalıdır.⁴¹ Adipositlerin enjeksiyon sırasında akış hızı ile orantılı olarak, makaslama gerilimi etkisine oldukça duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.²⁴ Lee ve ark. hızlı enjeksiyonlara (3-5 cc/sn) oranla yavaş enjeksiyonların (0.5-1 cc/sn) yağ grefti yaşayabilirliği oranında %38 daha başarılı olduğunu göstermiştir.⁴⁸ Greft üzerindeki makaslama gerilimini arttıran faktörlerin minimize edilmesi özel ilgi odağı olmalıdır. Viskozite, konsantrasyon, kanül uzunluğu, kanül çapı ve akış hızı gibi değişkenler yağ grefti sağkalımı üzerinde önemli rol oynar ve uygun teknik kullanılmadığında bunu olumsuz yönde etkileyebilir.

Yağ greftlemesinin nihai sonucunu etkileyebilen bir diğer değişken ideal donör saha şartlarıdır. Bunun dışında, otörler uygun hasta seçimini önemli kılan bir faktörü, adiposit türevi kök hücre fonksiyonlarında yaşa bağlı değişiklikleri fark etmişlerdir. Ayrıca alınan dokulardaki adiposit türevi kök hücre miktarlarının da hastadan hastaya büyük ölçüde farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir.²⁴

Şimdiye kadar yayınlanan veriler başarılı, kalıcı ve dayanıklı yağ grefti nakli sonucuna ulaşan, herkes tarafından kabul edilen bir algoritma geliştirmek için yeterli olmamıştır. Yaklaşık 30 yıllık değişen yağ transferi uygulamalarının ardından, cerrahlar ve bilim adamları, hastalara optimize edilmiş klinik sonuçlar sağlamak için yağ dokusu greftleri tekniklerindeki kavram farklılıklarını iyileştirmeye çalışıyorlar. Ancak söz konusu

değişkenlerin sayısının çokluğu ve uygun şekilde körlemenin zorluğu göz önüne alındığında büyük iyi tasarlanmış prospektif randomize klinik ve deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır.

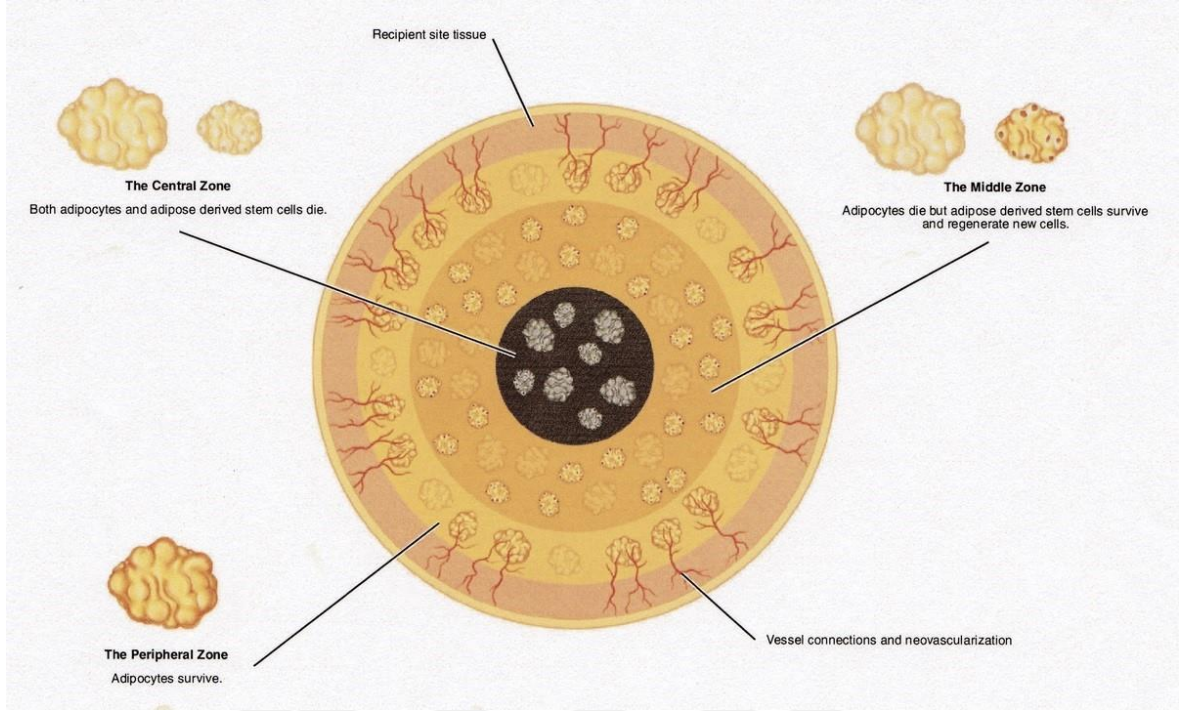
2.4. Yağ Greftinin Tutma Mekanizmaları

Yağ greftinin tutma mekanizması, greft ve alıcı saha damarlarının anastomozu yoluyla oluşan erken kan dolaşımına dayanır. Halihazırda bazı araştırmacılar yağ grefti tutma mekanizmalarıyla ilgili yeni görüşler sunmuşlardır. Bunlardan biri Peer'in tariflediği eski hücre hayatta kalma teorisinden gelişmiş olan ,diğeri ise adipoz türevi kök hücrelerin ortaya çıkması ve anlaşılmasıyla ortaya atılmış olan greft yerine koyma teorileridir.⁴⁹

Peer'ın hücre hayatta kalma teorisi,⁵⁰ in vivo transplantasyondan sonra yağ greftinin nasıl hayatta kaldığına dair temel anlayışımızı oluşturmuştur. Yağ greftleri içindeki adipositlerin, yağ greftleri toplandıktan ve işlendikten sonra canlı kalması gerekmektedir. Genel olarak, yağ greftleri daha az travmatik bir teknikle alınmalı ve yağ greftlerinin nispeten konsantre ve birleşik kalması için diğer hücrelerinden arındırılmalıdır. *Carpaneda* ve *Ribeiro*'nun⁵¹ çalışmasına dayanarak, vaskülarize dokunun kenarından sadece 2 mm içerisindeki yağ greftleri, plazmatik imbibisyon yoluyla yağ aşılmasından sonra hayatta kalabilir. Bu nedenle, yağ grefti enjeksiyonu tekniği de daha az travmatik olmalı ve her enjeksiyon sırasında az miktarda yağ grefti belirlenmiş alana çoklu girişlerle multiple plana yerleştirilmelidir. Böylelikle yağ greftleri, greftlere dolaşımın yeniden kurulmasını sağlamak için alıcı bölge ile maksimum temas alanına sahip olacaktır.⁵²

Yoshimura ve ark.⁵³ araştırmasında gözlemlenen bulgular greft yerine koyma teorisi ile açıklanabilir. Yağ yastığı içindeki adipositler iskemik koşullar altında kolayca ölürken, adiposit türevi kök veya progenitör hücreler iskemik koşullar altında hayatta kalabilir ve aktive olarak, daha sonra yağ dokusu onarımına katkıda bulunmaktadır. Böylelikle araştırmacılar yağ grefti dokusunda adipoz kaynaklı kök hücrelerin iskemi altındaki dokudaki onarım sürecini arttırabildiğini ve hızlandırabildiğini iddia etmişlerdir. Daha sonraki çalışmada aynı yazarlar erken dönemde greftte adipositlerin ölmesi ve adiposit türevi kök hücrelerin aktivasyonu ve rejenerasyonu yoluyla ölmüş hücrelerin yerine geçtiğini göstermişlerdir.⁵⁴

Greft yerine koyma teorisi ve greft sağkalım teorisi birlikte, yağ greftinin in vivo transplantasyondan sonra nasıl hayatta kaldığı hakkında bilinen mevcut anlayışı göstermektedir (Resim 1).



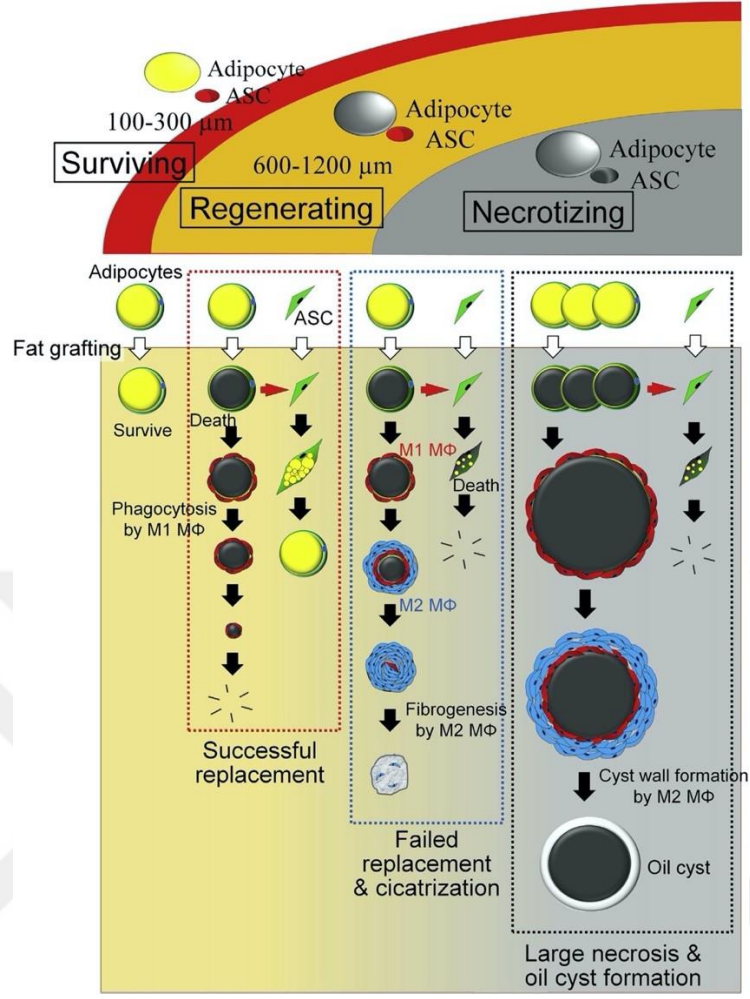
Resim 1: Greft sağ kalım ve greft yerine koyma teorilerinin kombinasyonunu tarif eden şematik diyagram. Yağ grefti periferik zonda greftin hayatta kalma teorisi ile tariflenen şekilde, aralık zonda ise greft yerine korma teorisi ile tariflenen şekilde hayatta kalıyor. Santral zondaki adiposit ve adiposit türevi kök hücreler ölüyor.⁴⁹

Greft olarak alınmış yağ vaskülarize olmayan bir dokudur ve deri greftinde olduğu gibi sadece yüzeysel hücreler yaşayabilir. Greftteki diğer hücrelerin çoğu ölmesine rağmen, dejenere olmuş doku, ASC'lerin ve diğer kök/progenitor hücrelerin katkısının bir sonucu olarak kısmen yenilenebilir. Rejenerasyon bölgesinde oluşan hipoksik durum greftlemeden sonraki 3 gün içinde revaskülarizasyon ile giderilmekte ve ASC'ler yeni adipositlere dönüşerek, sonunda ölü adipositlerin yerini almaktadır. Öte yandan, nekroz bölgesindeki mikroçevre 3 gün içinde düzelmemektedir ve böylece ASC'ler ölürek greft dokusunun santral nekrozuna yol açmaktadır. Alıcı bölgeye enjekte edildikten sonra, yağ dokusu iskemik durumdadır ve revaskülarizasyon gerçekleşene kadar birkaç gün çevredeki konak dokudan plazmatik difüzyonla beslenir. Bu durum, 24 saat içinde hem greft dokusunda birçok adipositin ölümüyle, hem de hasarlı konakçı dokudan çoklu hücre ölümü veya yaralanmayla ilişkili faktörlerin salınmasıyla sonuçlanır.^{54,55} Makrofajlar ve lenfositler gibi inflamatuvar hücreler alana göç eder ve interlökinler gibi inflamatuvar sitokinler salgılanır. Adipositlerin ölümüne rağmen, şiddetli iskemide bile 72 saate kadar işlevsel kalabilen ASC'ler aktive olur

ve kemik iliğinden alana göç eden kök/progenitör hücreler ile işbirliği içinde hasarlı dokuyu onarmaya çalışır.^{54,56}

Yağ greftlemesinden sonraki ilk 3 ay doku yenilenme dönemidir ve bu dönemden sonra adipogenez oluşmaz.⁵⁷ Greftlenmiş yağ periferden merkeze doğru üç bölgeye ayrılır: (1) yüzeysel zon (yaşayan adipositler), (2) rejenerasyon zonu (orta) ve (3) nekroz zonu (santral).⁵⁴ Yaşayan bölgenin (100-300 µm kalınlığında) rejenerasyon bölgesinden sınırı 1 haftada netleşir. Rejenerasyon ve nekrotizan bölgeler arasındaki fark ise 2 ile 4 hafta arasında belirginleşir. Rejenerasyona paralel olarak rejenerasyon ve nekrotizan bölgelerde fagositoz ve fibrozis gibi stabilizasyon olayları meydana gelir. Rejenerasyon bölgesindeki adipogenez/rejenerasyon süreci 4. haftada zirveye ulaşır 12. haftada tamamlansa da, klinik gözlemlere göre, yağ greftleme sonrası hacim azalmasının ilk yılın sonuna kadar devam ettiği gibi, stabilizasyon süreci en az birkaç ay devam eder. Küçük boyutlu yağ damlacıkları emilir veya çok katmanlı M2 makrofajlarla geçici olarak kuşatılır, bu da lipid absorpsiyonuna paralel olarak fibrogenez ile ölü boşluk replasmanını indükler. Daha büyük yağ damlacıkları (>8 mm) birkaç ay içinde yağ kistleri oluşturur, kalıcı olarak kronik inflamasyon ve kalsifikasyonu tetikler. Bu durum yağ greftlemenin en olası kötü sonucu olarak kabul edilir.⁵⁶⁻⁵⁸

Olgun adipositler çoğunlukla greftteki ASC'lerden türetilir. Vasküler duvar bileşenleri (düz kas hücreleri) esas olarak greftten türetilmiş olsa da; kapillerler (VEC'ler) eşit olarak greftten ve konakçı kemik iliğinden kaynaklanır. Rejenerasyonun yağın ASC'leri, greftlenmiş, konakçı kemik iliği dışı ve konakçı kemik iliği hücrelerinin bir karışımıdır. Bu bulgular adipositlerin rejenerasyonu için greftlenmiş yağda bulunan ASC'lerin önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, alıcı kemik iliği kökenli hücreler ve yerel dokular, kılcal ağlara ve gelecekteki yeniden şekillenmeye katkıda bulunabilecek yeni ASC'lerin sağlanmasına önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Bu nedenle ASC'ler adiposit nekrozu sürecinde adiposit rejenerasyonuna katkıda bulunmak için adipositlere bitişik kalarak hazır şekilde beklerler.⁵⁹ Yağ dokusunun yeniden şekillenmesinin ilk 3 ayı boyunca, nakledilen adipositlerin mikro ortamlarına bağlı olarak farklı kaderleri vardır. Yukarıda gösterildiği gibi, karmaşık hücresel olaylar basitleştirilmiştir ve adiposit kaderi dört modele ayrılmıştır: hayatta kalma, başarılı rejenerasyon, başarısız rejenerasyon (skatrizasyon) ve yağ kisti oluşumu (Resim 2).



Resim 2: Yağ dokusunun yeniden şekillenmesinin ilk 3 ayı boyunca, nakledilen adipositlerin mikro ortamlarına bağlı olarak farklı kaderleri vardır. Bu şemada adiposit kaderi dört modele ayrılmıştır: hayatta kalma, başarılı rejenerasyon, başarısız rejenerasyon (skatrizasyon) ve yağ kisti oluşumu. Skatrizasyon ve yağ kisti oluşumu genellikle 3 ayda tamamlanamamaktadır.⁵⁶

Adipoz dokunun hücresel bileşenleri arasında adipositler, 15 mm Hg PtO_2 gibi iskemik koşullar altında ölüme en duyarlı olanlardır. Şiddetli iskemi uzadığında, ilk olarak 24 saat içinde adipositler ölür ve ardından vasküler endotel hücreleri ve kandan türetilen hücreler ölmeye başlar. Aksine, ASC'ler şiddetli iskemi altında bile 3 güne kadar canlı kalabilir; 3 gün boyunca ASC'ler ölmekte olan hücrelerden salınan sinyaller tarafından aktive edilir. Genellikle kemik iliğinden salgılanan diğer kök / progenitor hücreler ile işbirliği yaparak, adipogenez ve anjiyogenez gibi adaptif onarım sürecine katkıda bulunur.^{54,56}

Mekanik kuvvetler, harici (kesme, germe, gerilim, distraksiyon ve sıkıştırma) veya endojen (aktif hücre iskeleti içinde üretilen) olarak, yağ dokusu büyümesini ve hücrel fonksiyonları etkiler. Ayrıca, ASC'ler ve hücre dışı matris arasındaki fiziksel etkileşimler yağ hücre davranışlarını etkiler.^{60,61} Bir çok çalışma yağ greftinin alıcı alanda temas ettiği zeminin stabil olmasının dokuyu mobilizasyonun mekanik etkilerinden koruduğunu belirtmiştir.⁶²⁻⁶⁴

Cilt altı yağ dokusu, organlar arasında en yüksek doku parsiyel oksijen basıncına (ptO₂; 40-60 mm Hg) sahiptir. Yağ dokusunun yüksek ptO₂'si muhtemelen kapiller ağının kılcal damarların sıklığı ve dokunun düşük oksijen tüketim oranını yansıtır.⁶⁵ Yağ dokusu adipositlerinin hücrel bileşenleri arasında, 15 mm Hg ptO₂ gibi iskemik koşullar altında, ölüme en yatkındır. Şiddetli iskemi uzadığında VEC'ler ve kandan türetilen hücreler ölmeye başlar. Buna karşılık, ASC'ler şiddetli iskemik koşullar altında bile 3 güne kadar canlı kalabilirler. ASC'ler 72 saat boyunca, ölmekte olan hücrelerden gelen sinyallerle aktive edilebilirler. Adipogenez ve anjiyogenez gibi adaptif onarım sürecine katkıda bulunabilirler. Greftlenmiş non-vaskülarize yağ dokusu yukarıda anlatıldığı gibi, iskemiye maruz kalır ve çevre dokudan revaskülarizasyon gerçekleşene kadar birkaç gün boyunca sadece konak dokudan plazmatik difüzyonla beslenir. Bu süreçte, 24 saat içinde birçok adipositin ölümüyle birlikte, hasarlı konakçı dokudan çoklu hücre ölümü ve yaralanmayla ilişkili faktörlerin salınmasıyla sonuçlanır. Makrofajlar ve lenfositler gibi inflamatuvar hücreler alana infiltre olur, interlökinler gibi inflamatuvar sitokinler salgılanır. Adipositlerin ölümüne rağmen, şiddetli iskemi altında bile 72 saate kadar işlevsel olabilen ASC'ler aktive olur ve kemik iliğinden infiltre kök ve progenitör hücreler ile iş birliği içinde hasarlı dokuyu onarmaya çalışır. Son yayınlara göre, yağ greftlemesinden sonraki ilk 3 ay yağ dokusu için remodeling dönemi olup bu süreden sonra adipogenez oluşmaz.⁵⁴⁻⁵⁶

Yağ greftleme sonrası nihai hacmi belirleyen nekroz ve hayatta kalan/rejenerasyon zonları arasındaki oran vaskülarite, greftlenen yağın boyutu, greftleme tekniği ve postoperatif bakım gibi faktörlere bağlı olarak alıcının mikro ortamına bağlı olarak değişir. Hayatta kalan bölgenin boyutu ve kalınlığının çevredeki alıcı dokudan etkilendiği düşünülmektedir. Alıcı dokunun daha iyi damarlanması ve daha yüksek oksijen gerilimi, hayatta kalan bölgeyi artırır. Alıcı dokunun ön koşullandırılması, negatif basınç ve/veya hiperoksijenasyon bu amaç için yardımcı olabilir. Aşırı yüksek internal basınç, alıcı dokuda iskemik şartlar oluşturur ve hayatta kalan bölgeyi azaltır. Deri greftlerinde olduğu gibi, immobilizasyon

kılcal damarın ilk hafta greft içine doğru büyümesine yardımcı olarak, rejenerasyon bölgesinin parsiyel oksijen basıncını iyileştirir ve ASC'leri iskemik ölümden kurtarır. Greftlenmiş yağın boyutu ve yüzey alanı, merkezi nekrotizan bölgeyi en aza indirmek için kritik bir faktördür; greftlenmiş yağ parçacıklarının çapının 2 mm kadar küçük olması tavsiye edilir. Yağ greftlemesinden sonra adipogenez için, greftte hem canlı adipositlerin hem de ASC'lerin çok sayıda olması çok önemlidir. Adipositler, bitişik ASC'leri aktive etmek için önemli faktörleri serbest bırakabilir ve onları adipositlere farklılaşmaya yönlendirebilir. Bu bulgu greftlemeden önce doku işleme sırasında daha iyi oranda adiposit ve ASC hazırlamanın önemini vurgular.⁶⁶

2.5. Tiyokolşikosid Grubu Kas Gevşetici İlaçlar

2.5.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

N-((7S)-3-(beta-D-glucopiranosiloksi)-1,2-dimetoksi-10-(metilsülfanil)-9-okso-5,6,7,9-tetrahidrobenzo(a)heptalen-7-il)asetamid olarak adlandırılan, C₂₇H₃₃NO₁₀S kapalı formülünde sahip bir maddedir. Molekül ağırlığı 563,618 g/mol'dür.⁶⁷

2.5.2. Farmakolojik özellikleri

Tiyokolşikosid Colchicum Autumnale'nin naturel bir glikozit olan kolşikosidden yarı sentetik bir sülfür derivesidir. Bu doğal glikosid kas gevşetici, antiinflamatuvar, analjezik özelliklere sahiptir. Tiyokolşikosid, GABA ve Glisin reseptörlerine spinal seviyede aktive ederek miyorelaksan etkisini gösterir. Bunun yanında tiyokolşikosidin glisinomimetik etkileri sinir sisteminin değişik seviyelerinde görülür. Motor plak paralizisine neden olmaz, solunumla ilgili problem görülmez. Ayrıca kardiyovasküler sistem üzerine etkisi de yoktur. Ek olarak, bu ilaç hayvan modellerinde gözlemlenen analjezik ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir ve iyi etkinliğinin yanı sıra ,güvenlik profili birçok çalışmada klinik olarak gösterilmiştir.⁶⁸ Bir çalışma tiyokolşikosidin meme kanseri ve multipl miyelom hücreleri tarafından indüklenen RANKL yolaklı osteoklastojenezi baskıladığını öne sürmüştür.⁶⁹ Biyokimyasal çalışmalar, hem [³H] γ-aminobütirik asidin, hem de [³H] strikninin sırasıyla sıçan serebrokortikal ve omurilik membranlarına in vitro ve in vivo olarak bağlanmasını engelleyebildiği göz önüne alındığında, tiyokolşikosidin γ-aminobütirik asit reseptörleri ile etkileşime girebileceğini göstermiştir.⁷⁰⁻⁷² Bu bulgular ay-aminobütirik asit agonisti olan tiyokolşikosidin merkezi sinir sisteminde depresyona ve buna bağlı olarak

miyorelaksasyona neden olduğunu düşündürse de , antiinflamatuvar etkisinin mekanizması hala bilinmemektedir.^{73,74}

Tiyokolşikosid oral yoldan uygulandığında hızla emilir, yaklaşık 1 saat içinde plazma doruk konsantrasyonuna ulaşır. Tiyokolşikosid intramusküler yoldan uygulandığında hızla kana geçer, 15-45 dakika içinde plazmada doruk konsantrasyona ulaşır. Plazma yarılanma ömrü 2.5-5 saat arasındadır. Verilen ilaç ve veriliş yolu ne olursa olsun, bir ilacın yarı ömür süresinin 10 katı kadar bir süre geçtikten sonra yaklaşık olarak ilacın tümüne yakın kısmı organizmadan elimine olur. Tiyokolşikosidin metabolizasyonu kanda gerçekleşir ve karaciğer enzimlerine gerek duymaz. Uygulanan dozun %20'si değişmemiş ya da metabolitleri halinde idrarla, %75-81'i ise safra feçes yoluyla atılır.

Tiyokolşikosid, sıçanlarda 2 mg/kg/gün'e eşit veya daha düşük tekrarlanan dozlarda uygulandığında, oral uygulamayı takiben iyi tolere edilmiştir. Hayvanlarda parenteral yoldan 0,5 mg/kg/gün'e eşit dozlar kullanıldığına dair prelinik veriler mevcuttur.⁷⁵

Yan etkileri, deride kızarıklık, şişme, alerjik reaksiyonlar (allerjik vaskülit) nadiren bildirilmiştir. Kas içi uygulama sonrasında nadiren hipotansiyon, geçici bilinç bulanıklığı veya eksitasyon bildirilmiştir.⁷⁶

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (KOÜ HADYEK) onayı ile (Proje No: 2021/10, tarih 29.04.2021), Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde (KOÜ-DETAB) yapıldı (Resim 3a). Araştırma için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nden (Proje No: TTU-2021-2670) bütçe desteği alındı.

3.1. Deneysel Hayvanları ve Bakım-Barınma Koşulları

Çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde (KOÜ-DETAB) üretilen, ortalama yaşı 12 hafta olan, ağırlıkları 250-350 g arasında değişen toplam otuz adet Wistar Albino cinsi genç erişkin sıçan kullanıldı. Hayvanlar ışıkların sabah saat 08.00'da açıldığı 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamın ve 22 ± 2 °C sıcaklığın sağlandığı, nemi %60-70 oranında korunan uygun kafeslerde tek tek barındırıldı (Resim 11). Sıçanlara herhangi su kısıtlaması veya özel diyet yapılmadı, %1820 protein içeren pellet sıçan yemi ve musluk suyuyla beslendi. Hayvanlar laboratuvar sorumlusu veteriner hekim tarafından günlük gözlemlendi. Deneklerin kafeslerine grup numaraları yazılarak karışmaları engellendi. Yapılan araştırmada prelinik hayvan çalışma ve araştırmaları ile ilgili kurallara uyuldu.⁷⁷

3.2. Sıçanlara Anestezi Uygulanması

Anestezi için *xysilazine HCl* (Rompun®-Bayer İlaç San. Türkiye) 5-10 mg/kg intraperitoneal ve ketamin 50 mg/kg (Ketalar®- Pfizer İlaçları Ltd. Şti. Türkiye) intraperitoneal kullanıldı. Bu uygulamada ratlarda yaklaşık 30 dakika süre ile anestezi sağlanması planlanmakta olup, cerrahi işlemin 30 dakikayı aştığı durumlarda ketamin enjeksiyonu 5 mg/kg intraperitoneal olarak tekrarlandı.



Resim 3: Deneyleerin gerçekleştirdiği Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi (a); operasyonların yapıldığı standartlara uygun ameliyathane odası (b).



Resim 4: Denekler postoperatif bakım ünitesinde ayrı kafeslerde barındırıldı ve günlük bakımları yapıldı.

3.3. Deney Grupları

Hayvanlar her grupta on hayvan olacak şekilde rasgele üç gruba ayrıldı. İlk operasyon sonrasında 12 haftalık takip süresinin ardından tüm gruplardaki deneyler sakrifiye edilerek ense bölgesine yerleştirilmiş olan yağ greftleri alınarak makroskopik değerlendirme sonrasında histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeye gönderildi.

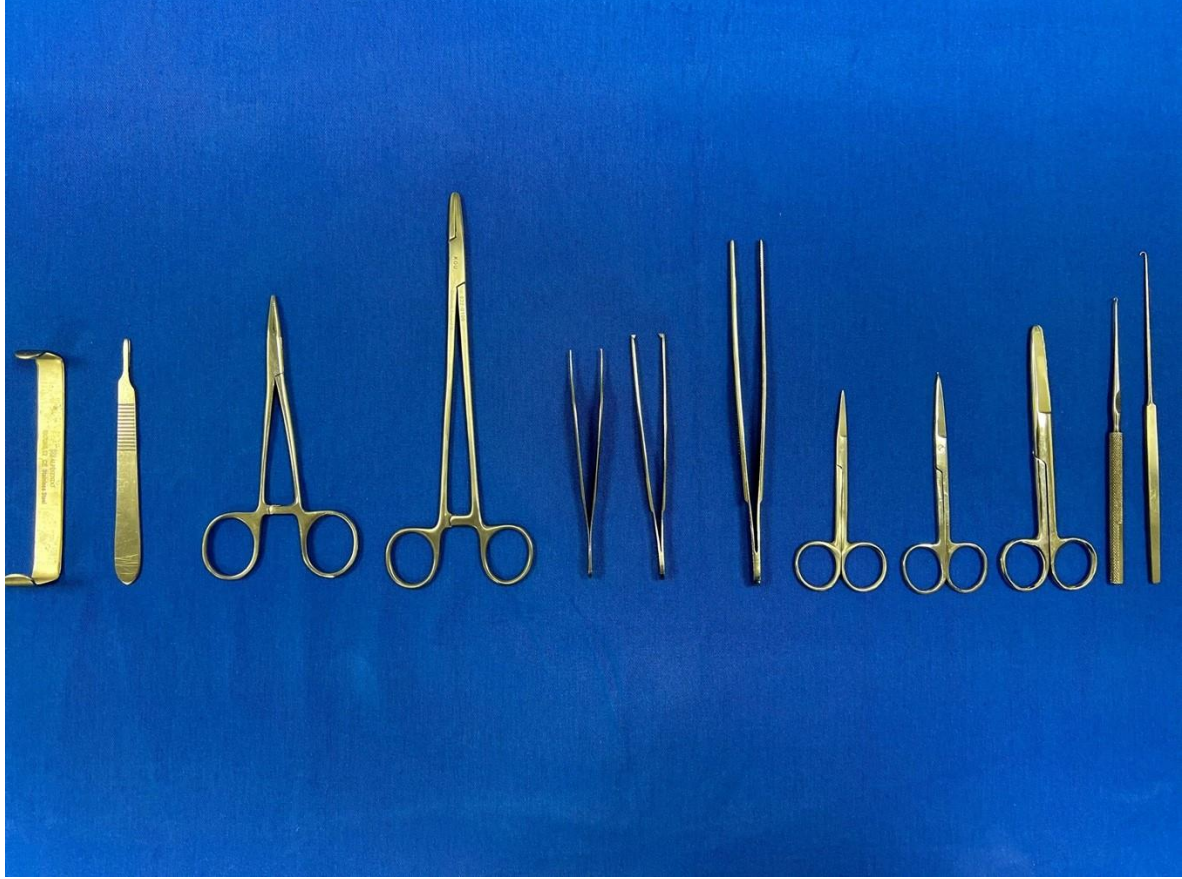
3.4. Deney Cerrahisi Akış Planı

Deney çalışması boyunca bütün hayvanlarda cerrahi sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmuştur. Tüm cerrahi aletler ve cerrahi alan steril olarak kullanıldı. Bütün gruplarda tüm işlemleri aynı cerrah gerçekleştirmiştir. Anestezi indüksiyonu sonrası sıçanların sağ kasık ve ense-sırt bölgesi traşlanmıştır ve povidon iyodür ile temizlendi. Operasyon sırasında hem pron hem de supin pozisyonda çalışıldı.

3.4.1 Kullanılan Cerrahi Araç ve Gereçler

Operasyonlar sırasında 15 numara bistüri, portegüler, diseksiyon makasları, pensetler, bistüri sapı, ekartörler, cerrahi suture malzemesi olarak 4.0 ipek kullanıldı. (Resim 5) Yağ

greftlerinin volümetrik değerlendirilmesi için 5cc lik enjektörler kullanıldı. Greft hacmi sıvı taşıma yöntemi ile hesaplandı. Greftlerin ağırlık ölçümleri SCALTEC SPB31 marka dijital hassas terazi yardımıyla yapıldı. Deneyin tüm cerrahi ve makroskopik değerlendirme aşamaları Canon 450D marka SLR fotoğraf makinesiyle dokümente edildi.



Resim 5: Operasyon sırasında kullanılan cerrahi aletler.

3.4.2 Deney

Tüm gruplara standart cerrahi prosedür uygulandı.

Anestezi altında ağırlık ölçümünü takiben pron pozisyonda interskapuler bölge orta hattan yapılan 1 cm'lik horizontal insizyonla girildi ve panniculus karnozus tabakasının altından oksipital bölgeye doğru cilt altı tünel oluşturuldu. Oksipital bölgede kas üstü planda standart poş oluşturularak, alıcı yatak hazırlandı. Ardından supin pozisyona geçildi, sağ kasık bölgesinden yapılan 1 cm'lik standart insizyon ardından sağ inguinal yağ yastıkçığı üzerine düşüldü. Yağ yastıkçığı çevre dokulardan keskin ve künt diseksiyonla ayrılmış ve greft şeklinde alındı. Elde edilen yağ grefti dijital hassas terazide ölçüldü, yüzdürme yöntemiyle

hacim ölçümü yapıldı. Makroskopik değerlendirme sonrasında greft alıcı sahaya transfer edildi. İnsizyonlar non-absorbable sütürle onarıldı.

Grup 1 (n:10): Kontrol grubu

Bu gruptaki denekler iki cerrahi işlem arasında herhangi ek işlem ve ilaç uygulaması yapılmadı.




Grup 2 (n:10): Oral uygulanan tiyokolşikosid deney grubu

Bu gruptaki deneklere ilk cerrahi müdahalenin ardından, postoperatif 0. günde ilk doz olmak üzere, toplamda 5 gün, 12 saat aralıklarla, günde 2 kere orogastrik gavaj yoluyla uygulanacak şekilde, günlük 2 mg/kg olmak üzere tiyokolşikosid grubu kas gevşetici (Muscoril 8 mg kapsül, Sanofi) uygulandı.

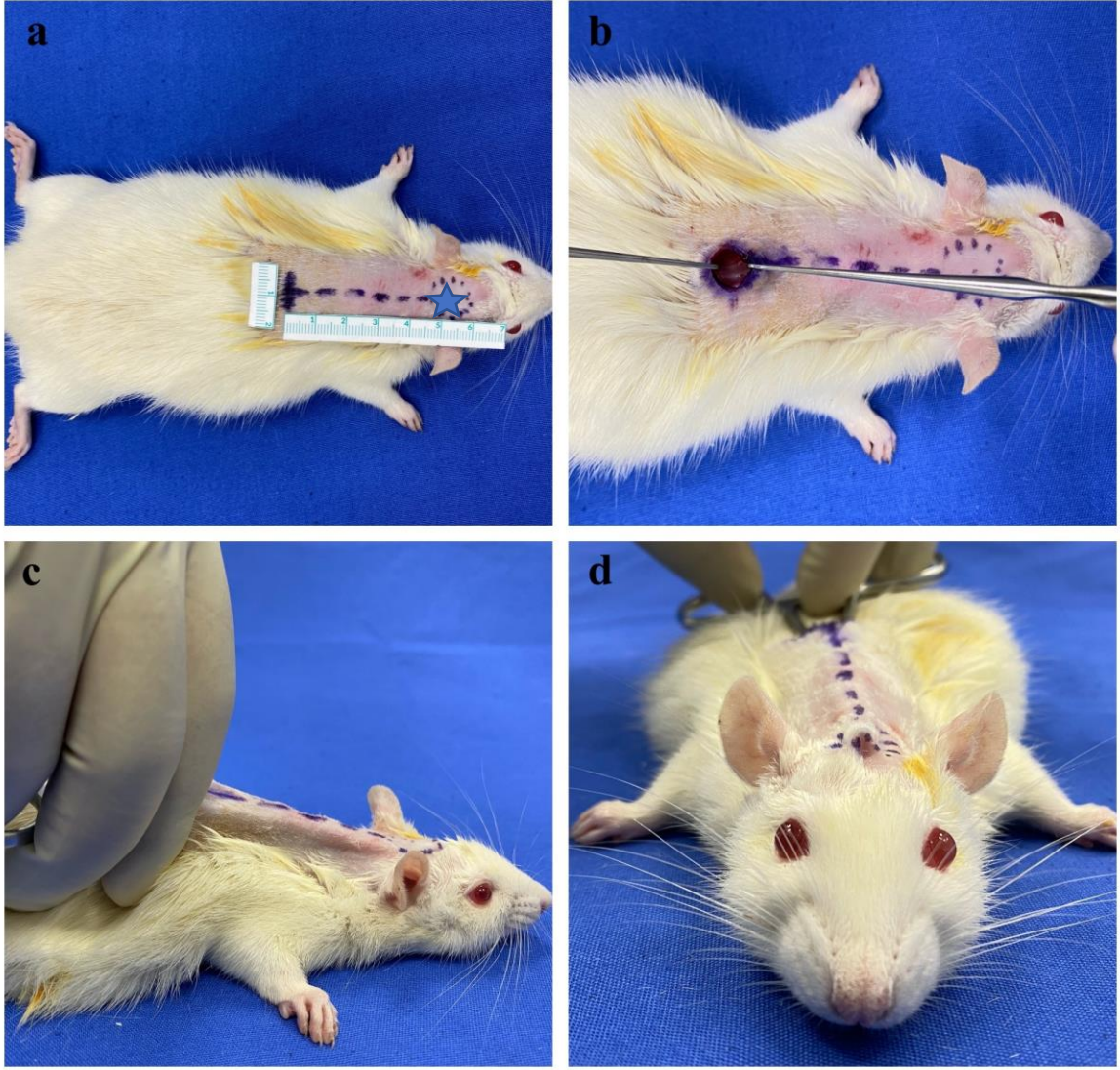
Grup 3 (n:10): Parenteral uygulanan tiyokolşikosid deney grubu

Bu gruptaki deneklere ilk cerrahi müdahalenin ardından, postoperatif 0. günde ilk dozu olmak üzere, toplamda 5 gün, 12 saat aralıklarla, günde 2 kere intramusküler yoldan uygulanacak şekilde günlük 0,5 mg/kg olmak üzere tiyokolşikosid grubu kas gevşetici (Muscoril 4 mg/2ml, IM, Enjeksiyonluk çözelti, Sanofi) uygulandı.

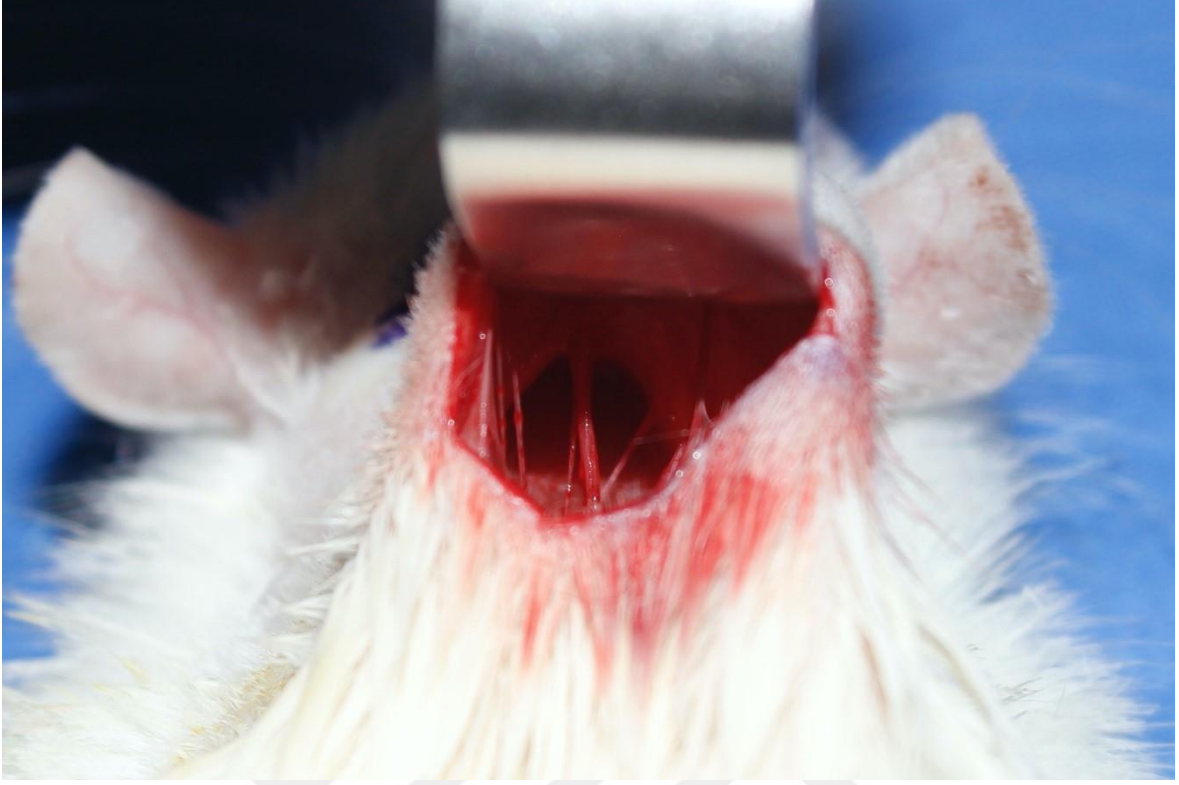
On iki hafta takip sonrasında tekrar genel anesteziye alınan sıçanların oksipital bölgesine adapte edilen yağ greftleri alınarak ağırlık ve hacim ölçümleri yukarıda tarif edildiği şekilde yapıldı ve kaydedildi. Yağ greftleri formaldehitli solüsyona alındı, sonrasında ışık mikroskobu, immunohistokimya değerlendirmeleri için patoloji laboratuvarına gönderildi.

GRUPLAR	İLK OPERASYON	İLAÇ UYGULAMASI	İKİNCİ OPERASYON	DEĞERLENDİRME
1. GRUP KONTROL 		YOK		MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME GREFTLERİN PREOP VE POSTOP HACİM VE KİTLESEL ÖLÇÜMLERİ YAPILDI
2. GRUP ORAL GAVAJ 	İLK OPERASYONDA RATLARIN SAĞ KASIK BÖLGESİNDEN ALINAN YAĞ GREFTİ MAKROSKOPİK ÖLÇÜMLER SONRASINDA SIRTAN GİRİLEN İNSİZYONLA OKSİPİTAL BÖLGEDE OLUŞTURULAN POŞA KASÜSTÜ PLANDA YERLEŞTİRİLDİ	POSTOPERATİF 0. GÜNDEN BAŞLAYARAK ORAL GAVAJ YÖNTEMİYLE 5 GÜN SÜREYLE, GÜNDE 2 KERE TİYOKOLŞİKOSİD UYGULANDI	POSTOPERATİF 12 HAFTA TAKİP SONRASINDA OKSİPİTAL BÖLGEYE KASÜSTÜ PLANDA YERLEŞTİRİLMİŞ YAĞ GREFTLERİ 2. OPERASYONLA ALINDI VE MAKROSKOPİK ÖLÇÜMLER SONRASINDA PATOLOJİ LABARATUARINA YOLLANDI	PATOLOJİ DEĞERLENDİRME ◆ HİSTOLOJİK (H&E ve OİL RED) • Kist-vakuol oluşumu • Fibrozis • İnflamasyon • Adipositlerde şekil bozukluğu • Vaskülarizasyon • Miyelin figür oluşumu
3. GRUP İM ENJEKSİYON (PARENTERAL) 		POSTOPERATİF 0. GÜNDEN BAŞLAYARAK İNTRAMUSKÜLER ENJEKSİYON YÖNTEMİYLE 5 GÜN SÜREYLE, GÜNDE 2 KERE TİYOKOLŞİKOSİD UYGULANDI		◆ İMMUNOHİSTOKİMYA • Perilipin-Galectin 3 • CD 31 • VEGF İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

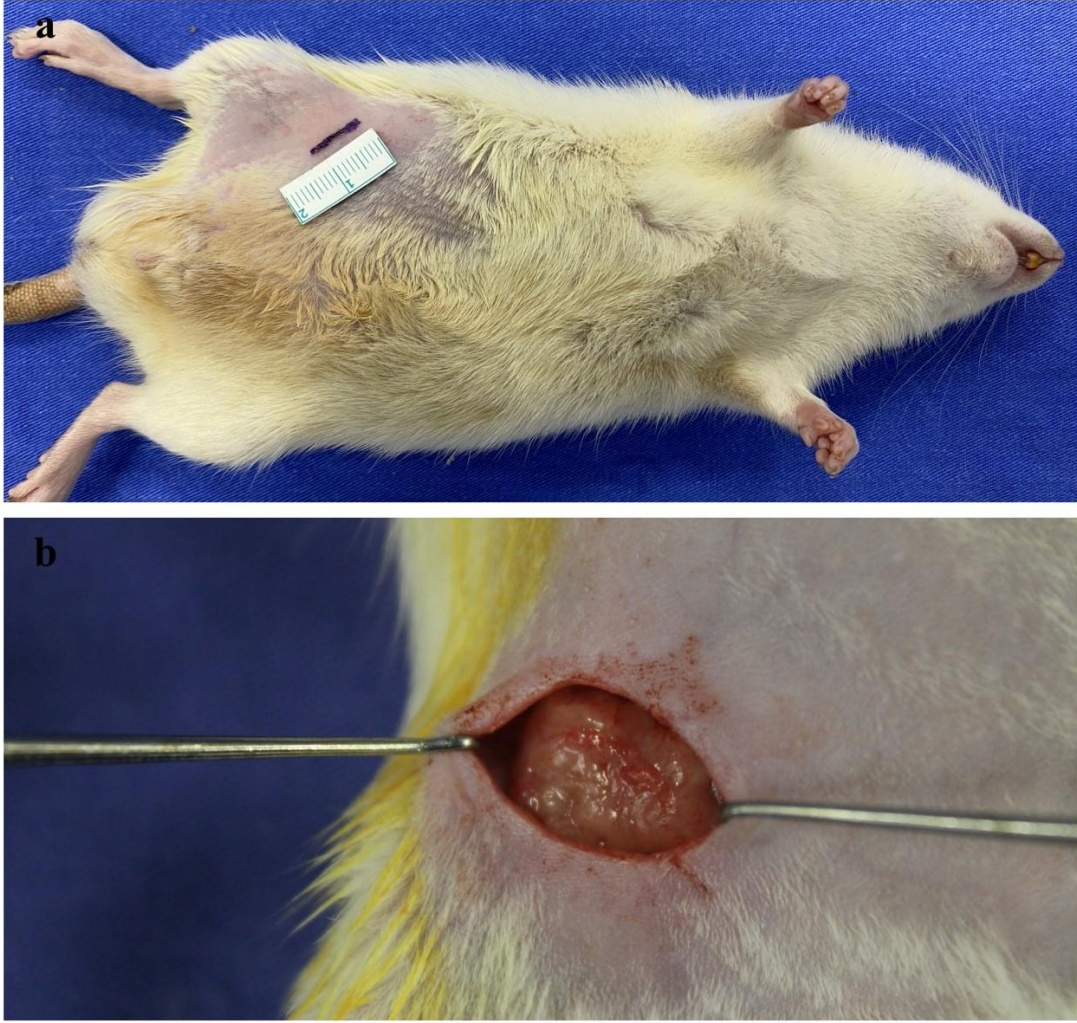
Tablo 1: Deneysel sıralamasının şematize tablosu.



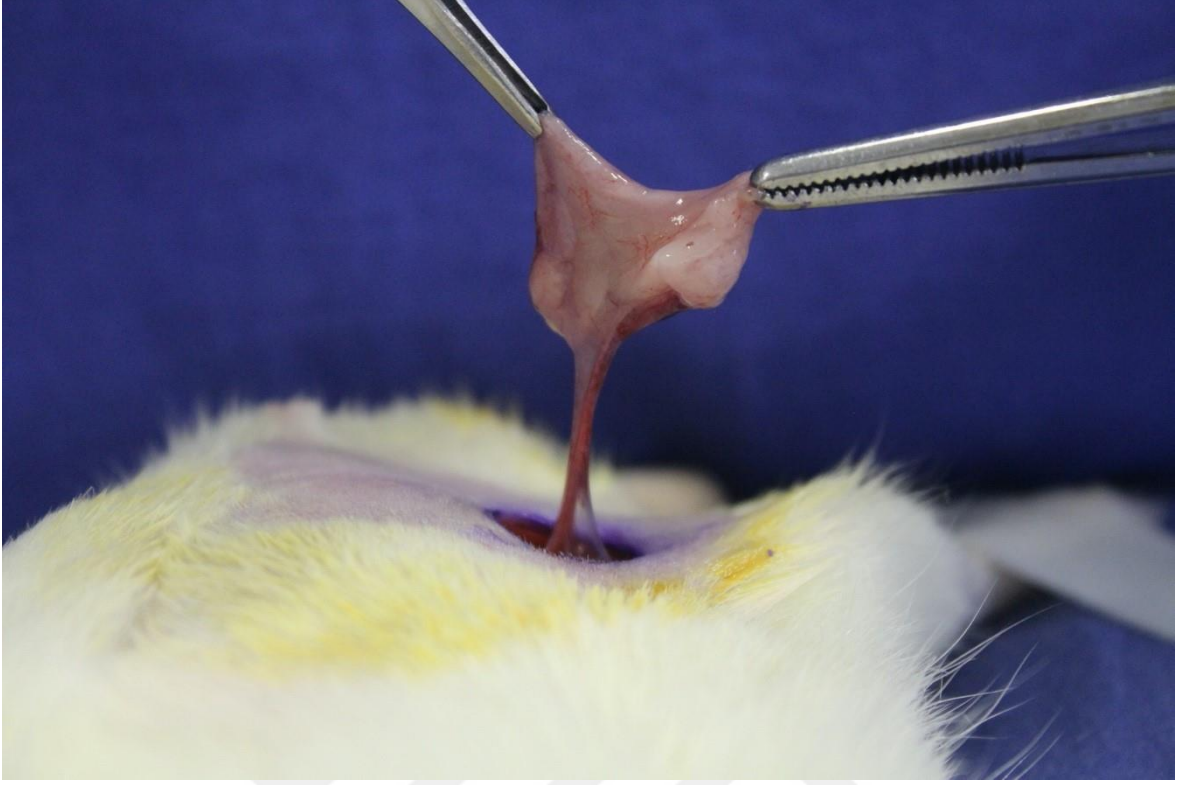
Resim 6: Alıcı sahanın hazırlanması. a) preoperatif olarak ciltte işaretlemeler yapıldı (alıcı alanın ciltteki iz düşümü mavi yıldızla işaretlenmiştir); b) İnterskapuler bölge orta hattan yapılan 1 cm'lik horizontal insizyonla girildi; c) Panniculus karnozus tabakasının altından oksipital bölgeye ciltaltı tünel oluşturuldu; d) oksipital bölgede kasüstü planda standart poş oluşturuldu.



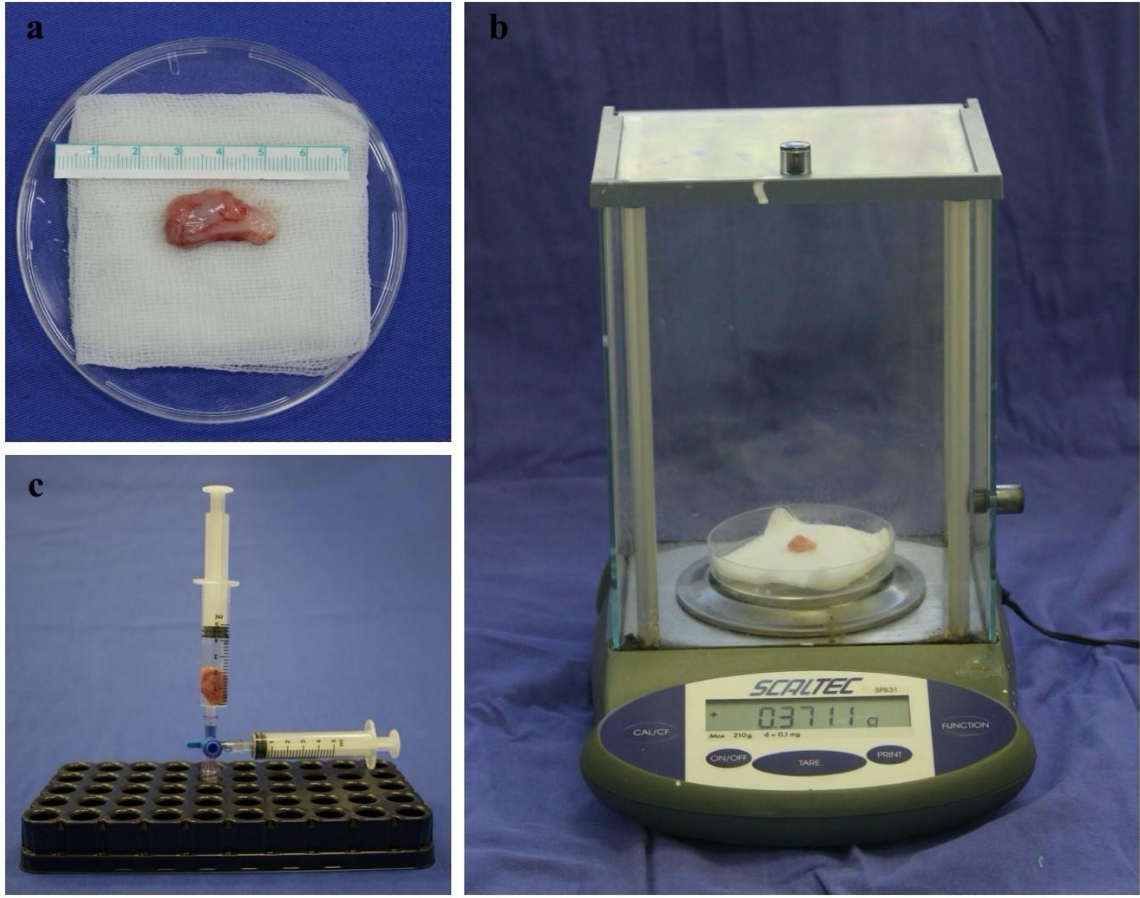
Resim 7: Oksipital bölgeye doğru oluşturulan cilt altı poşun giriş insizyonundan görünümü. Diseksiyonda zeminden cilde doğru giden perforatörler korunmuştur.



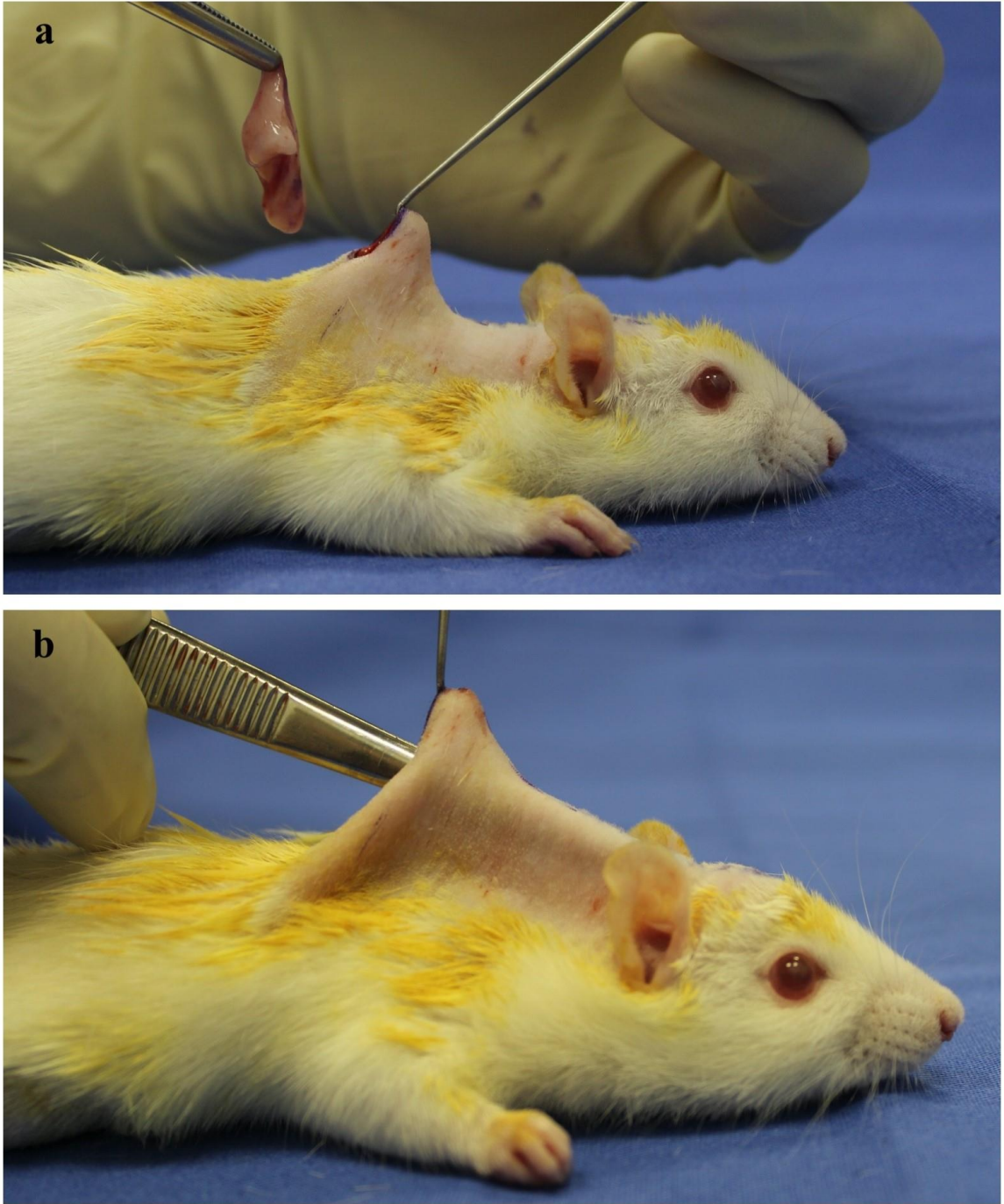
Resim 8: a) Sağ inguinal bölgede 1 cm'lik standart insizyon planlandı; b) İnsizyonun ardından sağ inguinal yağ yastıkçığı görünür hale geldi.



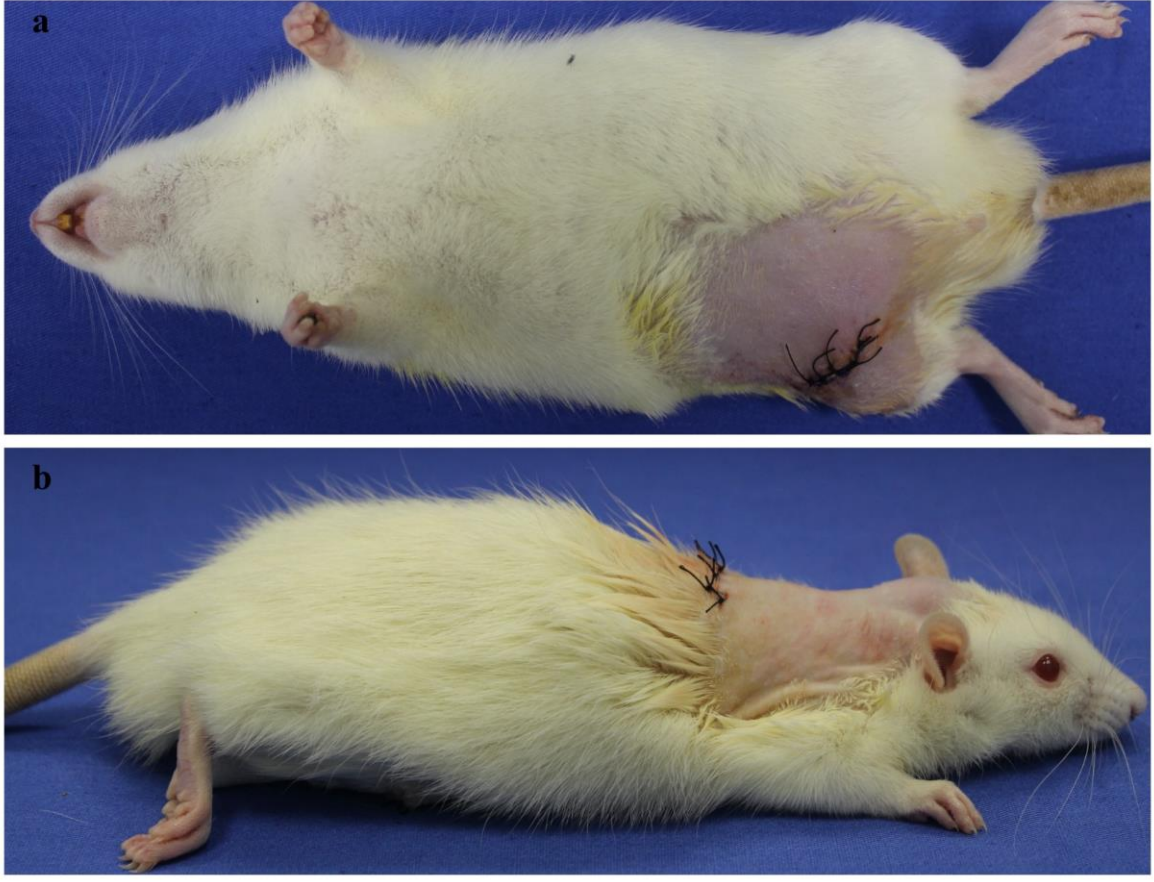
Resim 9: Yağ yastıkçığı çevre dokulardan keskin ve künt diseksiyonla ayrıldı ve greft şeklinde alındı.



Resim 10: a) Elde edilen yağ greftinin makroskopik görünümü; b) Doku örneği dijital hassas terazide ölçüldü; c) Yüzdürme yöntemiyle hacim ölçümü yapıldı.



Resim 11: Greft ölçüm işlemleri sonrasında; a) interskapuler bölgedeki insizyondan girilerek; b) cilt altından tünelize şekilde oksipital bölgedeki alıcı alana transfer edildi.



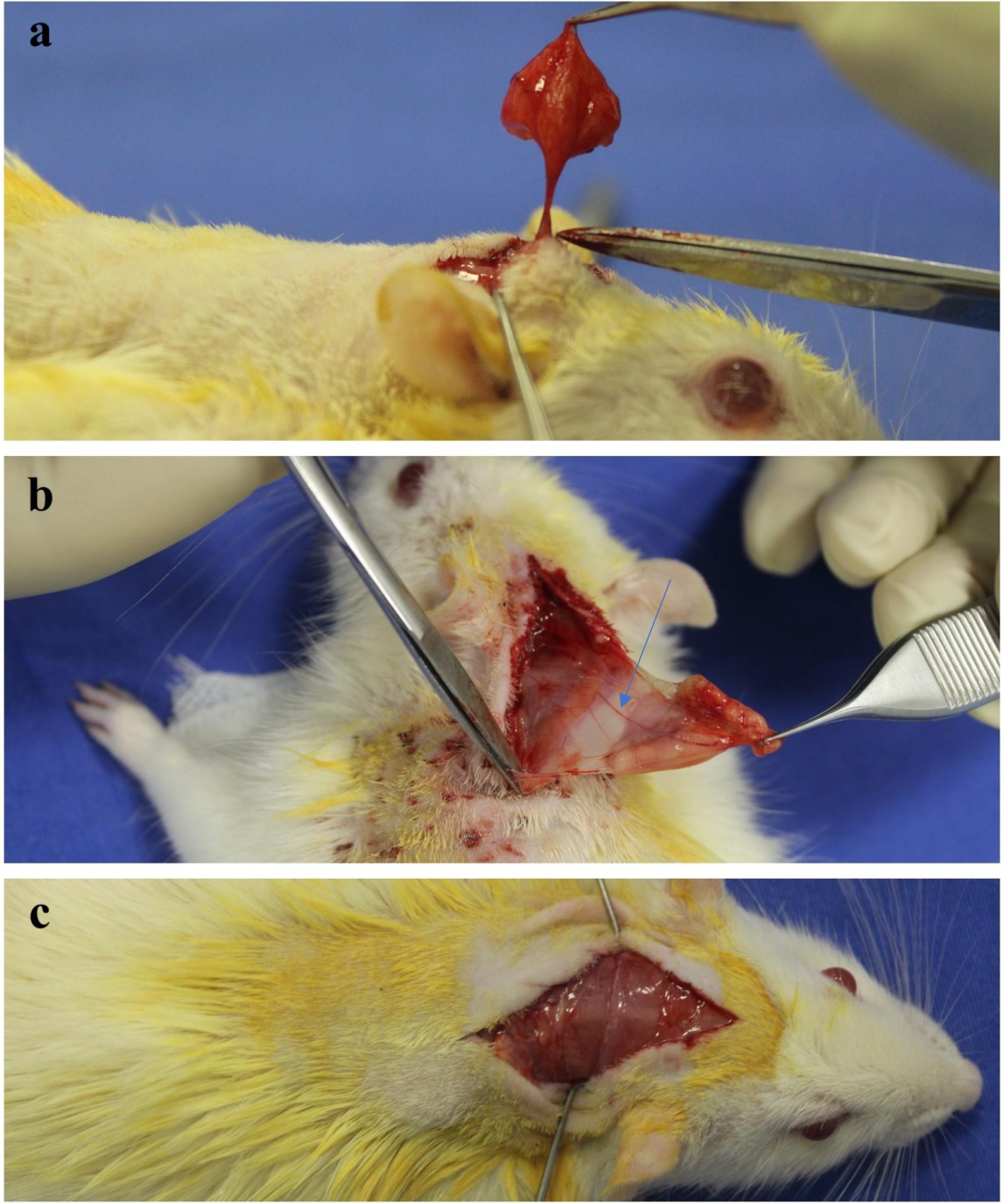
Resim 12: a) inguinal bölgedeki donor saha; b) sırt bölgesindeki alıcı saha insizyonları nonabsorbable sütürlerle primer onarıldı.

3.4.3. Deneyin sonlandırılması: Yağ grefti örneklerinin alınması ve histopatolojik inceleme

Bütün çalışma gruplarındaki ratlar işlemden 1 saat sonra ketamin anestezisi altında yüksek doz anestezi madde uygulanarak kurban edilmiştir. Yağ grefti örnekleri makroskopik olarak yapılan değerlendirme (Resim17) ve fotoğraflama sonrası %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilmiştir ve histopatolojik inceleme amacıyla patoloji laboratuvarına gönderilmiştir.



Resim 13: On iki haftalık takip süresi sonrasında oksipital bölgeden yapılan insizyonla yağ greftlerine ulaşıldı.



Resim 14: On iki haftalık takip sonrasında; a) Oksipital bölgeye uygulanmış olan yağ greftinin alıcı sahadan alınmasından hemen önceki makroskopik görünümü; b) Zeminden grefte doğru giden vasküler yapılar makroskopik olarak görülmekte (mavi ok); c) Greftin alıcı sahadan alınmasından hemen sonra zeminde clavotrapezius kaslarının görünümü.

Histopatolojik inceleme KOÜ Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Değerlendirme, her bir parametre için belirlenmiş olan derecelendirme ölçeklerine göre uygulanmıştır.⁷⁸

Bütün gruplardan alınan yağ dokusu örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Tespit işlemi sonrası formalin solüsyonu içinden alınan doku örnekleri çeşme suyu altında yıkandı ve sırasıyla %75, %96 ve %100 etanol serisinden geçirilerek suyunu giderme işlemi uygulandı. Bundan sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular sıvı parafinle 60°C'lik etüvde 3 saat inkübe edilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Doku kesitlerine Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Oil red O boyası uygulandı.

Histopatolojik olarak yağ nekrozu, kist-vakuol oluşumu, fibrozis, inflamasyon, yağ dokusu hücresinde şekil bozukluğu, miyelin figür oluşumu değerlendirilip skorlama yapıldı. Skorlama için kullanılan değerler; %0; (-) Yok, %1-20; (+1) az, %21-40; (+2) azdan ortaya, %41-60; (+3) orta, %61-80; (+4) ortadan kuvvetliye ve %81-100; (+5) kuvvetli olarak belirlendi.

Uygulanan H&E boyama protokolü aşağıdaki gibidir: ✓

- Ksilen ile deparafinizasyon ✓ %100, %96 ve %75
- etanol serisi ile hidratasyon ✓ Yıkama (çeşme
- suyunda) ✓ Hematoksilen solüsyonu, 1 dakika
- ✓ Yıkama (çeşme suyunda) ✓ Eozin
- solüsyonu, 1 dakika ✓ Yıkama (çeşme suyunda) ✓
- %75, %96 ve %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- ✓ Ksilen ile şeffaflandırma ✓ Entellan kullanarak
- lamelle kapama

Boyanan preparatlar, Olympus BX50 marka ışık mikroskopuyla incelendi ve fotoğraflandı. Histokimyasal olarak nötral lipitleri gösteren Oil red O boyandı. Oil red O boyama protokolü aşağıdaki gibidir:

- 1- Örnekler %70'lik alkole 1 saniye daldırılıp çıkarıldı.
- 2- Daha sonra Oil Red O boyası içerisinde 5 dakika inkübe edildi.
- 3- Tekrar %70'lik alkolde hızlıca yıkandı.
- 4- Suda yıkama yapıldı.
- 5- Harris Hematoksilen boyasıyla 1 dakika zıt boyama yapıldı.
- 6- Suda yıkanan örnekler havada kurutuldu ve lamel ile kapatıldı.

Daha sonra parafinize dokulara CD31, VEGF, Galectin-3 ve Perilipin boyaları ile immünohistokimyasal analiz yapıldı.

CD31, çoğunlukla vasküler endotel hücre yüzey belirteci olarak bilinir. Çalışmamızda CD31 antikoru ile boyalı preparatlarda gruplar arasındaki yeniden damarlanma oranlarına bakılmıştır. Yağ dokusu greftinden alınan örneklerde vaskülarizasyonun değerlendirilmesi kantitatif olarak her preparat üzerinde 10 tane büyük büyütme alanında damar sayıları sayılarak yapıldı. CD31 ile immünohistokimyasal boyama protokolü aşağıdaki gibidir:

Poly-L-lysin kaplı lama alınan kesitler bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi.

Ardından 30 dakika (dk) 56°C'lik etüvde bulunan ksilolde ve 15 dk oda sıcaklığındaki ksilolde deparafinize edilen kesitler azalan oranlarda alkol serilerinde rehidrate edildi.

Kesitler bu işlemten sonra önceden hazırlanmış olan pH: 7.2 olan phosphate buffered saline (PBS) solüsyonunda 5 dk bekletildi.

Ardından 5 dk boyunca endojen peroksidaz aktivitesini bloke eden %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak bekletildi ve 5 dk boyunca PBS solüsyonunda yıkandı.

CD31 ile işaretlenecek olan kesitler ise EDTA (pH: 8.0) solüsyonu dolu kaplara yerleştirilerek mikrodalga fırında 750 watt'da 5 dk, 500 watt'da 2x5 dk süre ile inkübasyon işlemi uygulandı. Böylece antijenin açığa çıkması sağlandı.

Bu işlemten sonra uygulanan kaynatmanın ardından kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı.

Tüm kesitler soğumayı takiben 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.

Her bir kesitin üzerine primer antikor solüsyonu dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatılarak 1 saat bekletildi.

Bağlanmamış antikorlar 5 dk PBS solüsyonunda yıkanarak uzaklaştırıldı ve biotine bağlayıcı sekonder antikor eklenerek 10 dk bekletildi.

Takiben kesitler 5 dk PBS solüsyonunda yıkanarak kurulandı.

Kesitlere Streptavidin Peroksidaz solüsyonu (Spring Bioscience) damlatılarak 10 dk beklendi ve ardından tekrar 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı.

Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid (DAB, Spring Bioscience) damlatıldı ve kahverengi gözlenene kadar beklendi.

Renk oluşunca çeşme suyunda 5 dk yıkandı ve zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyanma yapılarak ardından yine çeşme suyunda 5 dk yıkandı.

Yıkama sonrası dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balzam ile kapatıldı.

VEGF boyanması gösterip kahverengi boyanan hücreler her bir örnek için x400 büyütmede üç farklı alanda sayıldı. VEGF ile immünohistokimyasal boyama protokolü aşağıdaki gibidir:

- 4 mikrometrelilik parafin kesitler 70°C'lik etüvde 1,5 saat bekletildi.

Deparafinizasyon yapıldı.

- İlk xylende 5 dakika bekletildi,
- İkinci xylende 5 dakika bekletildi,
- Kurutma işlemi yapıldı,
- %100'lük alkolde 5 dakika,
- %90'lık alkolde 5 dakika,
- %80'lik alkolde 5 dakika bekletildi.
- Distile suda 5 dakika yıkama yapıldı.
- VEGF için; 1mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), pH8 olan solüsyonda düdüklü tencerede basınçla 1,5 dakika kaynatılan kesitlere boyama aşamaları uygulandı.
- PBS (Fosfat buffer solüsyonu)'de 5 dakika yıkama,
- %3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübasyon (endojen peroksidaz aktivitesinin ortadan kaldırılması), • PBS'de 5 dakika yıkama,
- Ultra V Blok solüsyon (5 dakika inkübasyon)
- Primer antikör (VEGF, Thermo Fisher Scientific, Fremont CA, USA, 1/100, endostatin, Hycult Biotechnology, Netherlands, 1/15) (1.5 saat inkübasyon)
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Value Primary Antikör Enhacer (20 dakika inkübasyon),
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Value HRP Polymer (ışığa hassas olduğu için karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon),
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Kromojen (3,3'Diaminobenzidine) (5 dakika inkübasyon),
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Mayer's Hematoksilen'de 1 dakika bekletme
- Akan su altında 5 dakika yıkama,

- %100'lük alkolde 1 dakika bekletme,
- %90'lık alkolde 1 dakika bekletme,
- %80'lik alkolde 1 dakika bekletme,
- Kesitler kuruduktan sonra xylende 2 dakika bekletme
- Kapama (Aqueous mounting medium).

Galectin-3 ile hücre ölümü ve apoptozisin yoğun olduğu alanlarda; Perilipin ile canlı adipositlerde pozitif reaksiyon izlenmiştir. Perilipin ve Galectin ile immünohistokimyasal boyama protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Polilizinli ve pozitif şarjlı lamalar üzerine 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.
2. 56°C etüvde 1 gece bekletilerek deparafinizasyon işlemine başlandı.
3. Deparafinizasyona ksilen ile devam edildi. Bu işlem 60°C etüvde 3 kez 10'ar dakika ksilende bekletme ve her 10 dakikanın ardından 5'er dakika solüsyon yenilenerek dışarıda soğumaya bırakma şeklinde uygulandı.
4. Ksilenin giderilmesi için %96'lık alkol muamelesine geçildi. Kesitler alkolde 60°C etüvde her seferinde solüsyon yenilenerek 4 defa 10'ar dakika tutuldu.
5. Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.
6. Dokularda bulunan endojen peroksiti bloke etmek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'de 37 °C etüvde 15 dakika bekletildi.
7. Distile suda 5 dakika bekletildi.
8. Lamlar pH 7.4 olarak hazırlanmış PBS solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
9. "EDTA buffer" %10'luk solüsyonda maksimum devirde 20 dakika, 600 devirde 10 dakika muamele edildi.
10. Oda ısısında yarım saat bekletildi.
11. Distile sudan geçirildi.
12. Lamlar pH 7.4 olarak hazırlanmış PBS solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
13. Reaktiflerin kesit dışına taşmasını engellemek için lamlardaki kesitlerin etrafı Pap pen ile çizildi.
14. Her lama Large Volume Ultra V Blok damlatıldı ve 10 dakika tutuldu
15. Distile suda 3 dakika bekletildi.
16. PBS ile 5 dakika muamele edildi.
17. Primer antikor solüsyonu damlatıldı ve 60 dakika oda ısısında bekletildi.
18. Lamlar üzerindeki antikorlar distile su ile uzaklaştırılıp PBS solüsyonu ile 5 dakika muamele edildi.

19. Biotinylated Goat Anti-Polyvalent solüsyonunda 15 dakika, oda ısısında bekletildi.
20. PBS ile 5 dakika muamele edildi.
21. Streptavidin Peroxidase solüsyonunda 15 dk oda ısısında bekletildi.
22. PBS ile 5 dakika muamele edildi.
23. Oda ısısında AEC kromojen ile 10 dakika inkübe edildi.
24. Çeşme suyunda 5 dakika bekletildi.
25. Hematoksilen zıt boya 2 dakika süre ile uygulandı.
26. Çeşme suyunda 3 dakika bekletildi.
27. %1'lik amonyakta 20 sn bekletildi.
28. Çeşme suyundan geçirildi.
29. Su bazlı balzam ile kapatıldı.

3.4.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapıldı. Nümerik değişkenler medyan (25.-75. persentil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn testi kullanıldı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı. İki yönlü hipotezlerin testinde $p < 0,05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma esnasında denek kaybı yaşanmadı. Deneklerde cerrahi işleme bağlı olarak meydana gelebilecek cerrahi alan enfeksiyonu, cilt nekrozu, detaşman gibi komplikasyonlar görülmedi.

4.1. Makroskopik Değerlendirme

Yağ transferi öncesi ve yağ transferi sonrası 12. haftada deneklerin ağırlık ölçümleri kaydedildi. Deneklerin ağırlık yüzde değişim oranları hesaplandı ve gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. (Tablo 2). Grupların istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile

karşılaştırmasında deneklerin ağırlık yüzde değişim oranları arasında anlamlı farklılık saptanmadı, $p > 0,05$ bulundu.

	Kontrol (n=10)	Oral (n=10)	Parenteral (n=10)	*	P
medyan (Q1-Q3)	medyan (Q1-Q3)	medyan (Q1-Q3)			
Denek ağırlığı yüzde değişimi	4,35 (3,28-5,02)	4,92 (3,57-6,79)	4,05 (3,73-5,35)		0,428

Tablo 2: Grupların istatistiksel olarak karşılaştırmasında denek ağırlık yüzde değişim oranları arasında anlamlı farklılık saptanmadı, $p > 0,05$ bulundu. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil)

Tüm deneklerde ilk operasyonda uygulanan ve ikinci operasyonda elde sonuç yağ greftlerinin ağırlık ve hacim değerleri ölçülerek kaydedildi (Tablo 3).

GRUP	DENEK NO	PREOP YAĞ GREFTİ AĞIRLIĞI MG	POSTOP YAĞ GREFTİ AĞIRLIĞI MG	PREOP YAĞ GREFTİ HACMI ML	POSTOP YAĞ GREFTİ HACMI ML
KONTROL GRUBU	1.NO DENEK	909,3	371,1	0,6	0,45
	2.NO DENEK	820,5	409,8	0,45	0,2
	3.NO DENEK	986,5	669,9	0,6	0,4
	4.NO DENEK	730,3	268,9	0,45	0,2
	5.NO DENEK	920,6	391,2	0,8	0,4
	6.NO DENEK	792,5	340,1	0,65	0,25
	7.NO DENEK	671,2	498,8	0,55	0,4
	8.NO DENEK	498,6	437,2	0,45	0,25
	9.NO DENEK	570,3	356,7	0,55	0,3
	10.NO DENEK	877,3	596,6	0,6	0,4
ORAL UYGULAMA GRUBU	1.NO DENEK	573,1	469,7	0,35	0,3

	2.NO DENEK	600,9	384,4	0,4	0,35
	3.NO DENEK	587,5	419,6	0,4	0,3
	4.NO DENEK	813,8	573,7	0,6	0,5
	5.NO DENEK	481,3	316,8	0,4	0,3
	6.NO DENEK	552	370,8	0,25	0,2
	7.NO DENEK	670,3	608,2	0,45	0,35
	8.NO DENEK	987,5	884,8	0,45	0,4
	9.NO DENEK	701,5	600,2	0,4	0,35
	10.NO DENEK	708,2	587,5	0,45	0,4
	PARENTERAL UYGULAMA GRUBU	1.NO DENEK	1164,3	1038,5	0,7
2.NO DENEK		818,3	804,3	0,6	0,55
3.NO DENEK		895,8	864,2	0,6	0,55
4.NO DENEK		686,5	672,3	0,45	0,4
5.NO DENEK		822,5	685,6	0,8	0,7
6.NO DENEK		878,7	757,2	0,8	0,65
7.NO DENEK		558,5	225,3	0,5	0,35
8.NO DENEK		817,4	482,8	0,6	0,45
9.NO DENEK		807,1	697,6	0,6	0,55
10.NO DENEK		635,1	608,6	0,55	0,5

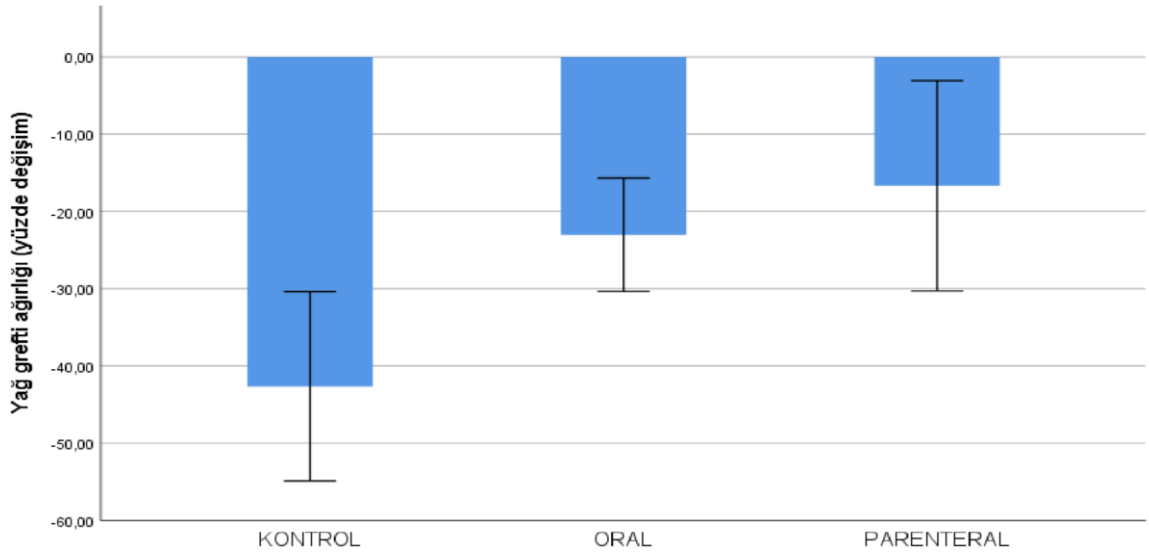
Tablo 3: Deneklerde ilk operasyonda uygulanan ve ikinci operasyonda elde edilen sonuç yağ greftlerinin ağırlık ve hacim değerleri ölçülerek kaydedildi. (mg:miligram, ml:millitre)

Greftlerin ağırlık ve hacimsel yüzde değişim oranları hesaplandı ve gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 4). Grupların istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırmasında greft ağırlık yüzde değişim oranları ve greft hacim yüzde değişim oranları arasında anlamlı farklılık saptandı, $p < 0,05$ bulundu.

	Kontrol (n=10) Medyan (Q1-Q3)	Oral (n=10) Medyan (Q1-Q3)	Parenteral (n=10) medyan (Q1-Q3)	P*
Greft ağırlığı yüzde değişimi	-43,75 ((-57,93) – (-30,41))	-23,31 ((-33,16) – (-13,43))	-12,18 ((-22,71) – (-3,16))	0,010
Greft hacmi yüzde değişimi	-44,94((-55,55) – (-31,81))	-15,47 ((-22,91) – (-12,15))	-11,80 ((-22,32) – (-8,33))	<0,050

Tablo 4: Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında greft ağırlık ve hacim yüzde değişim oranları arasında anlamlı farklılık saptandı, $p < 0,05$ bulundu. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil)

Üç grubun ikili karşılaştırılmasında (Grafik 1 ve Tablo 5) parenteral uygulama grubundaki greft ağırlık yüzde değişimi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,008$).

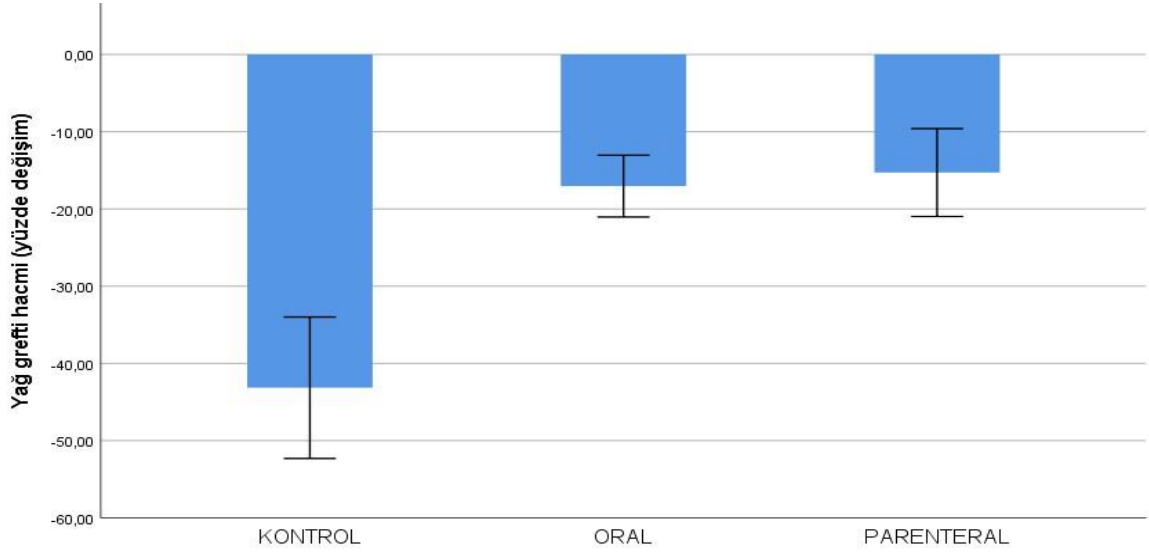


Grafik 1: Grafik her 3 gruba ait yağ grefti ağırlık yüzde değişim oranlarının medyan, 25. ve 75. yüzdelerdeki değerler karşılaştırılması.

Greft Ağırlık Yüzde Değişim Oranları	<i>p</i>
KONTROL - ORAL	0,180
KONTROL - PARENTERAL	0,008
ORAL - PARENTERAL	0,791

Tablo 5: Üç grubun ikili karşılaştırılmasında parenteral uygulama grubundaki greft ağırlık yüzde değişim oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü.

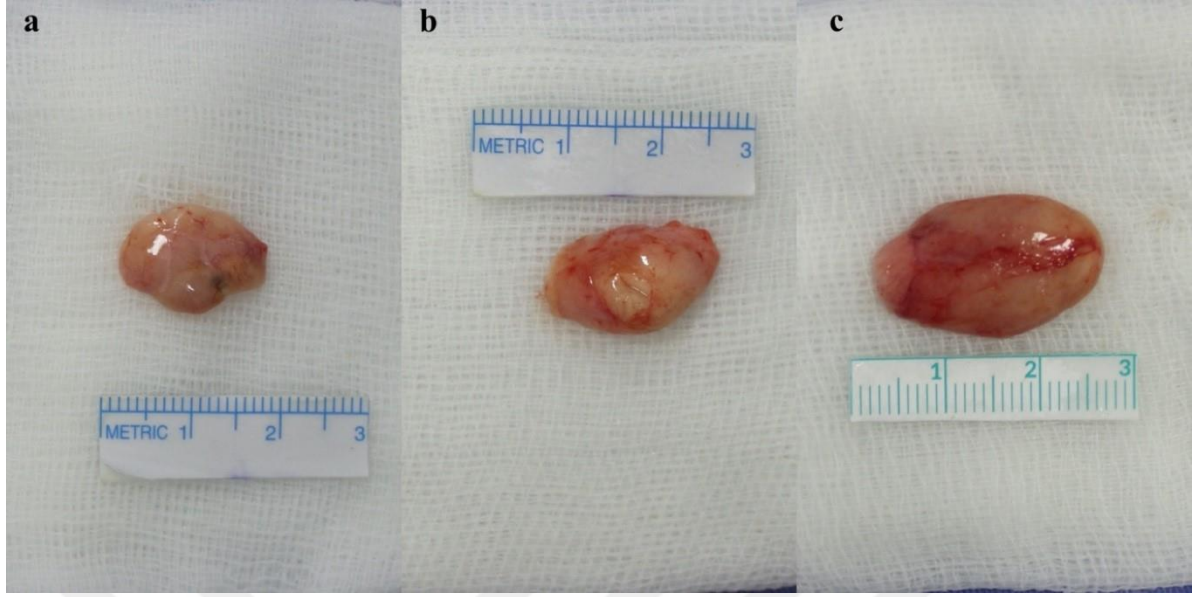
Üç grubun ikili karşılaştırmasında (Grafik 2 ve Tablo 6) oral ve parenteral uygulama grubundaki greft hacim yüzde değişimi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü.



Grafik 2: Gruplar arasında yağ grefti hacim yüzde değişim oranlarınının medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerler karşılaştırılması.

Greft Hacmi Yüzde Değişim Oranları	<i>p</i>
KONTROL - ORAL	0,003
KONTROL - PARENTERAL	<0,05
ORAL - PARENTERAL	1,000

Tablo 6: Üç grubun ikili karşılaştırmasında oral ve parenteral uygulama grubundaki greft hacim yüzde değişim oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü.



Resim 15: Gruplara ait sonuç greft örnekleri a) kontrol grubu greft örneği; b) oral uygulama grubu greft örneği; c) parenteral uygulama grubu greft örneği.

4.2. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik olarak yağ nekrozu, kist-vakuol oluşumu, fibrozis, inflamasyon, yağ dokusu hücresinde şekil bozukluğu, miyelin figür oluşumu değerlendirilip skorlama yapıldı. Skorlama için kullanılan değerler; %0; (-) Yok, % 1-20; (+1) az, %21-40; (+2) azdan ortaya, %41-60; (+3) orta, %61-80; (+4) ortadan kuvvetliye ve %81-100; (+5) kuvvetli olarak belirlendi (Tablo 7).

HİSTOLOJİK PARAMETRE	0%	% 1-20	%21-40	%41-60	%61-80	%81-100
	Yok	Az	Azdan Ortaya	Orta	Ortadan Şiddetliye	Şiddetli
Yağ nekrozu	0	1	2	3	4	5
Fibrozis	0	1	2	3	4	5
İnflamasyon	0	1	2	3	4	5
Kist-vakuol oluşumu	0	1	2	3	4	5
Vaskülarizasyon	0	1	2	3	4	5
Adipositlerde şekil bozukluğu	0	1	2	3	4	5

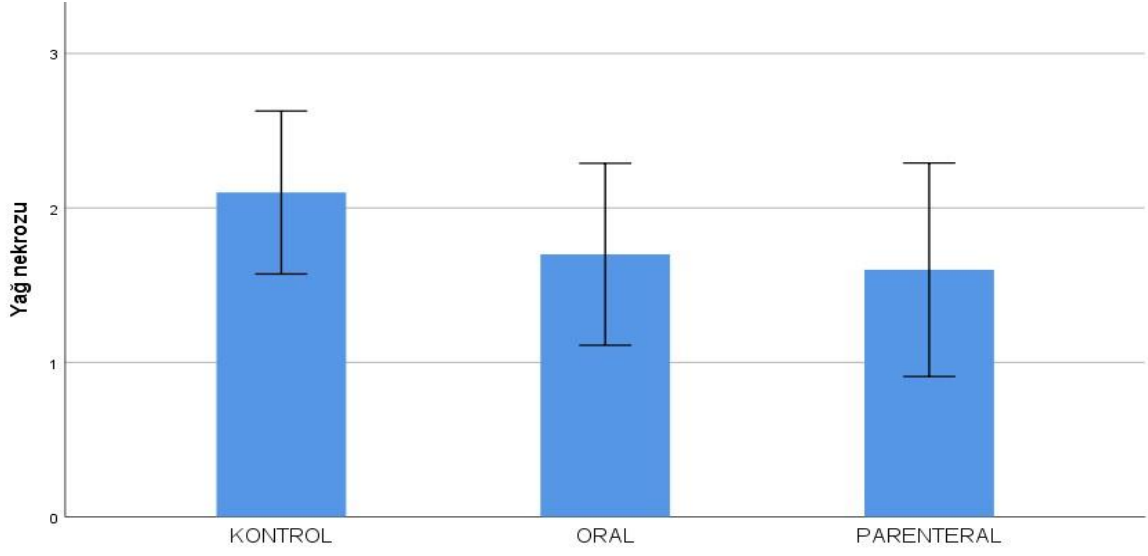
Miyelin figür oluşumu	0	1	2	3	4	5
-----------------------	---	---	---	---	---	---

Tablo 7: Histopatolojik parametrelerin puanlanması.

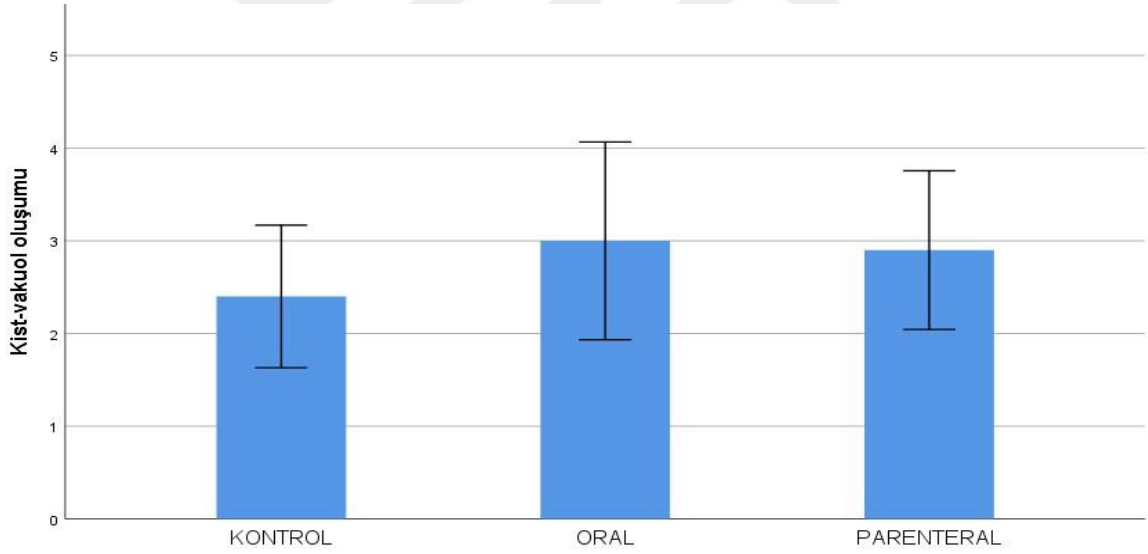
Kruskal-Wallis testi uygulanarak yapılan istatistik analizde (Tablo 8), yağ nekrozu (Grafik 3), kist-vakuol oluşumu (Grafik 4), vaskülarizasyon (Grafik 5), adipositlerde şekil bozukluğu (Grafik 6), miyelin figür oluşumu (Grafik 7) parametreleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Histopatolojik parametre	Kontrol (n=10) medyan (Q1-Q3)	Oral (n=10) medyan (Q1-Q3)	Parenteral (n=10) medyan (Q1-Q3)	P*
Yağ nekrozu	2,00 (1,75-3,00)	1,70 (1,00-2,25)	1,60 (0,75-2,00)	0,418
Fibrozis	0,50 (0-1,25)	1,40 (0,75-2,25)	1,80 (1,00-2,25)	0,050
İnflamasyon	2,50 (1,00-4,00)	1,10 (0,75-2,00)	0,60 (0-1,00)	0,002
Kist-vakuol oluşumu	2,00 (1,75-3,25)	3,00 (2,00-5,00)	2,90 (2,00-4,00)	0,577
Vaskülarizasyon	2,00 (2,00-3,00)	2,30 (2,00-3,00)	2,60 (2,00-3,00)	0,486
Adipositlerde şekil bozukluğu	2,00 (2,00-3,25)	1,80 (1,00-2,00)	2,00 (1,75-2,25)	0,196
Miyelin figür oluşumu	2,00 (2,00-3,25)	1,90 (1,00-2,25)	1,90 (1,75-2,25)	0,310

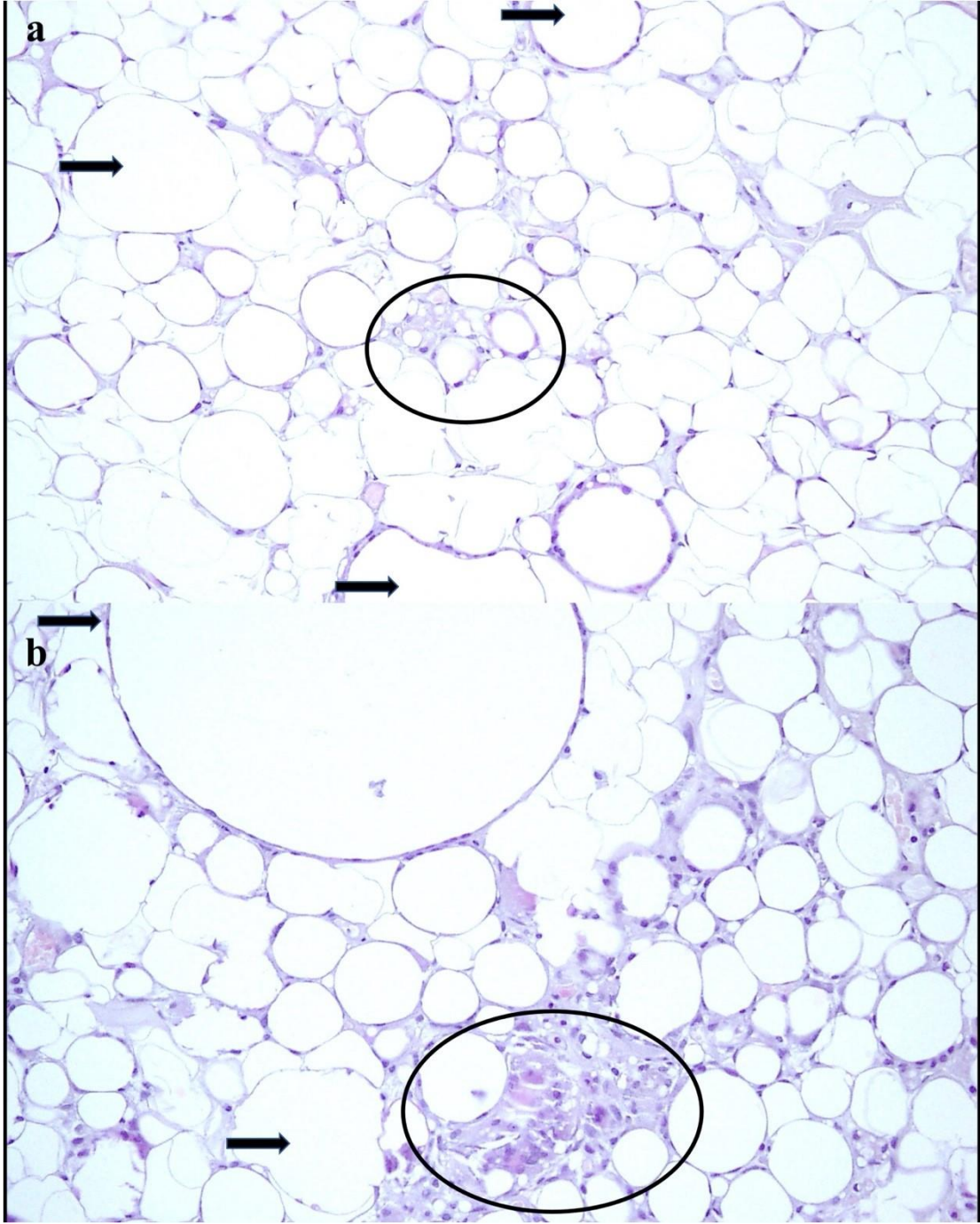
Tablo 8: Gruplar arasında histopatolojik parametrelerin değerlendirilmesi. (*:Kruskal-Wallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil)



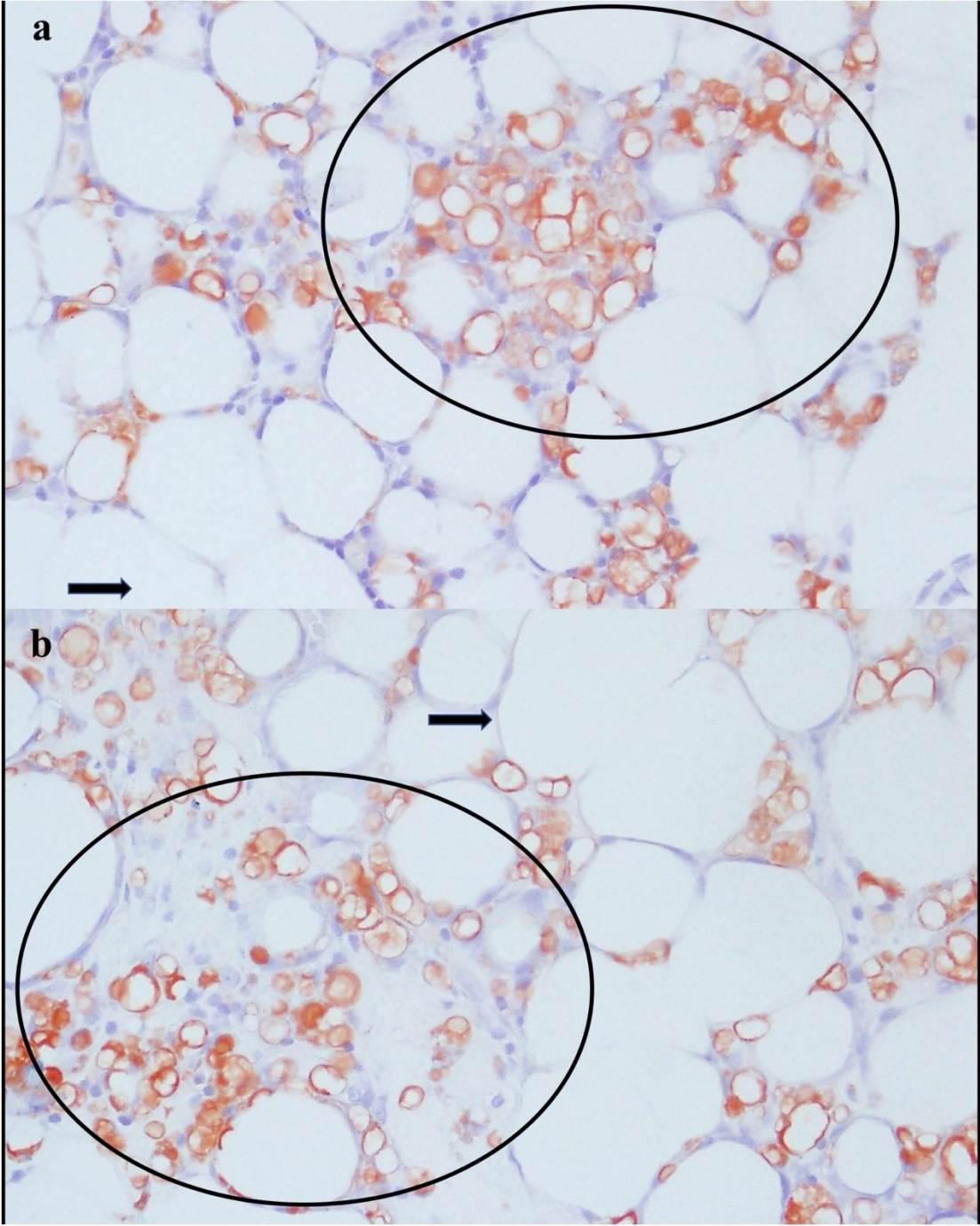
Grafik 3: Gruplar arasında yağ nekrozu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. perentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.



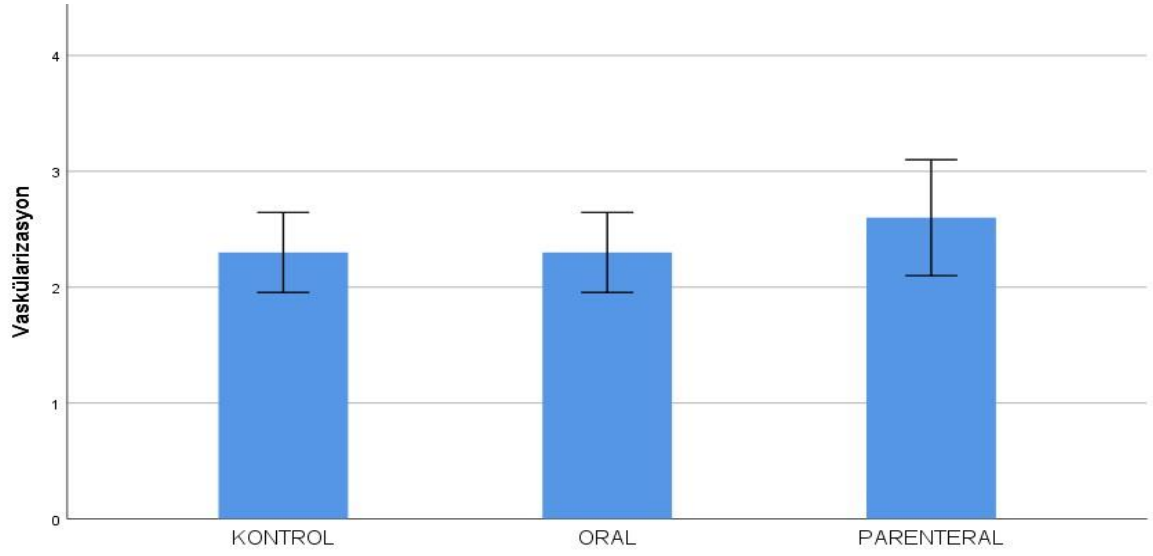
Grafik 4: Gruplar arasında kist-vakuol oluşumu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. perentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.



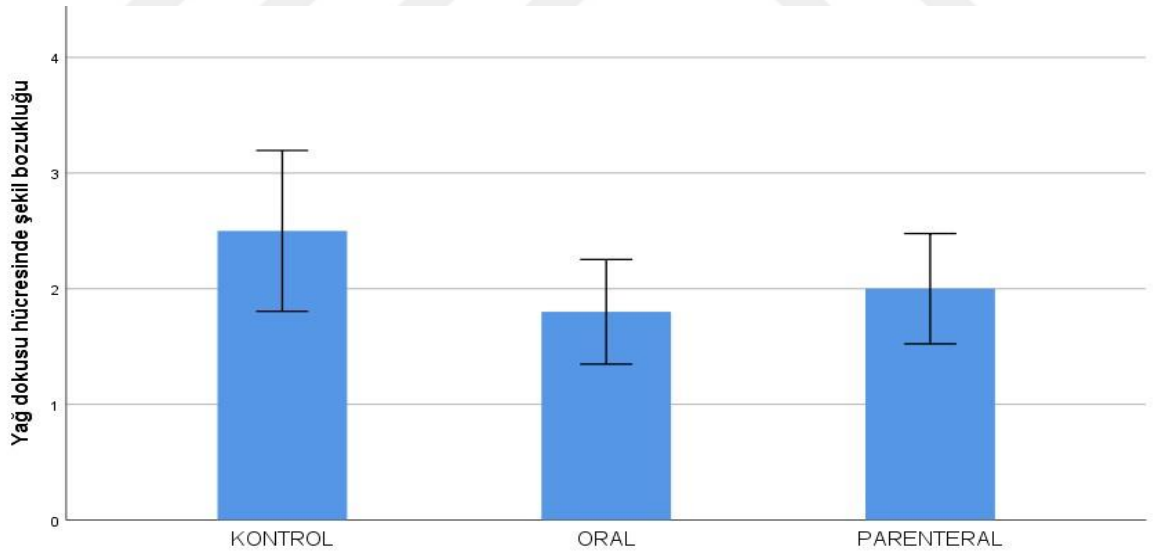
Resim 16: Kistik vakuol ve yağ nekrozu bulguları- H&E boyama. a) Kontrol grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (H&E, x200 büyütme)b) Parenteral uygulama grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (H&E, x400 büyütme).



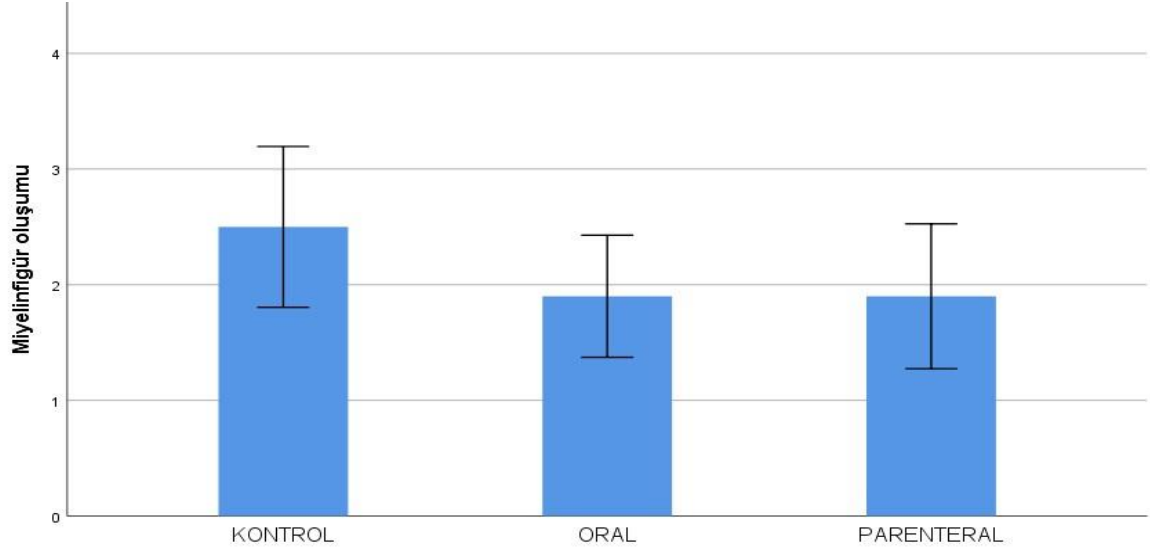
Resim 17: Kistik vakuol ve yağ nekrozu bulguları- Oil red boyama. a) Kontrol grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (Oil red, x400 büyütme); b) Parenteral uygulama grubunda kistik vakuol (kalın ok) ve yağ nekrozu (daire) (Oil red, x400 büyütme).



Grafik 5: Gruplar arasında vaskülarizasyon histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

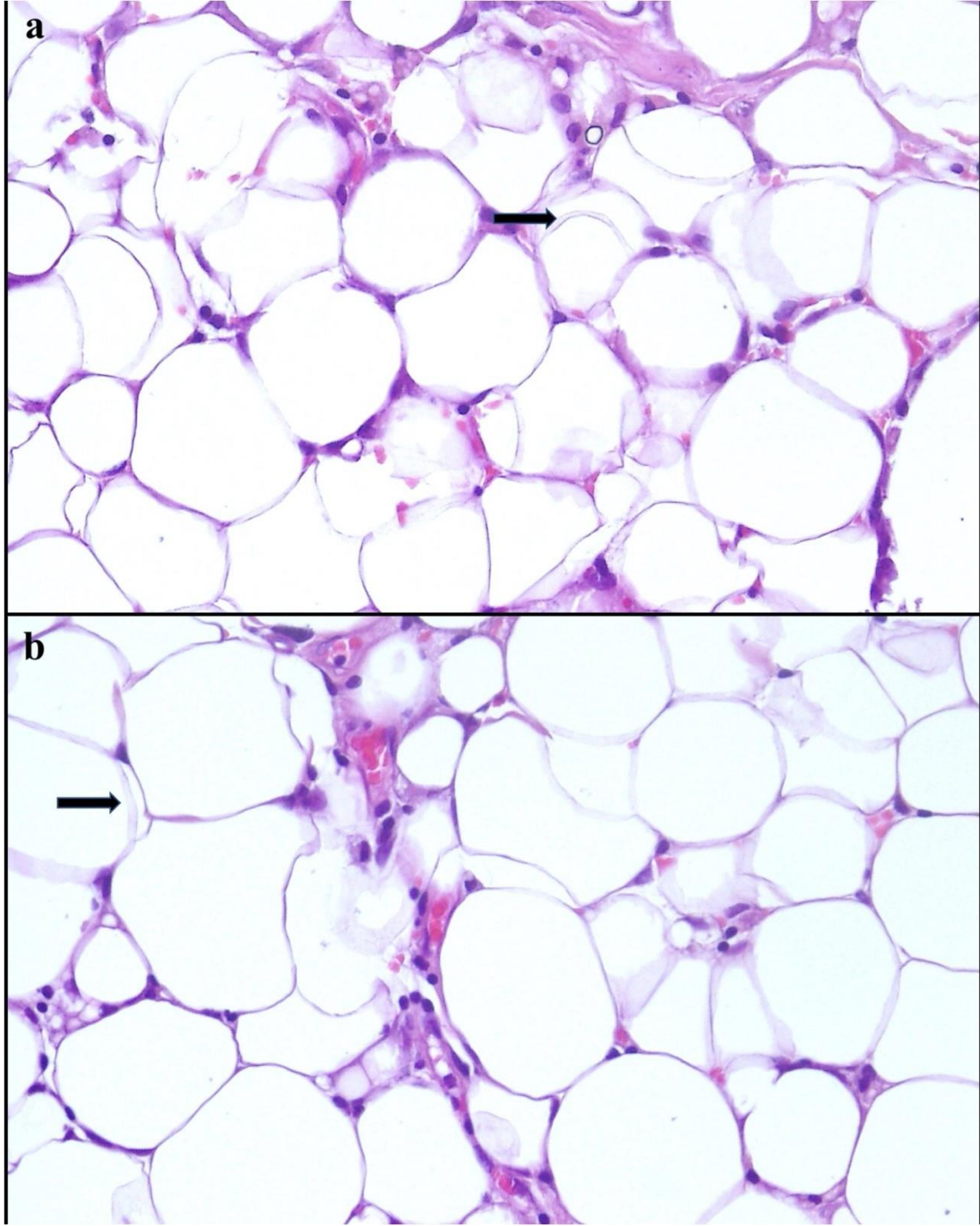


Grafik 6: Gruplar arasında adipositlerde şekil bozukluğu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

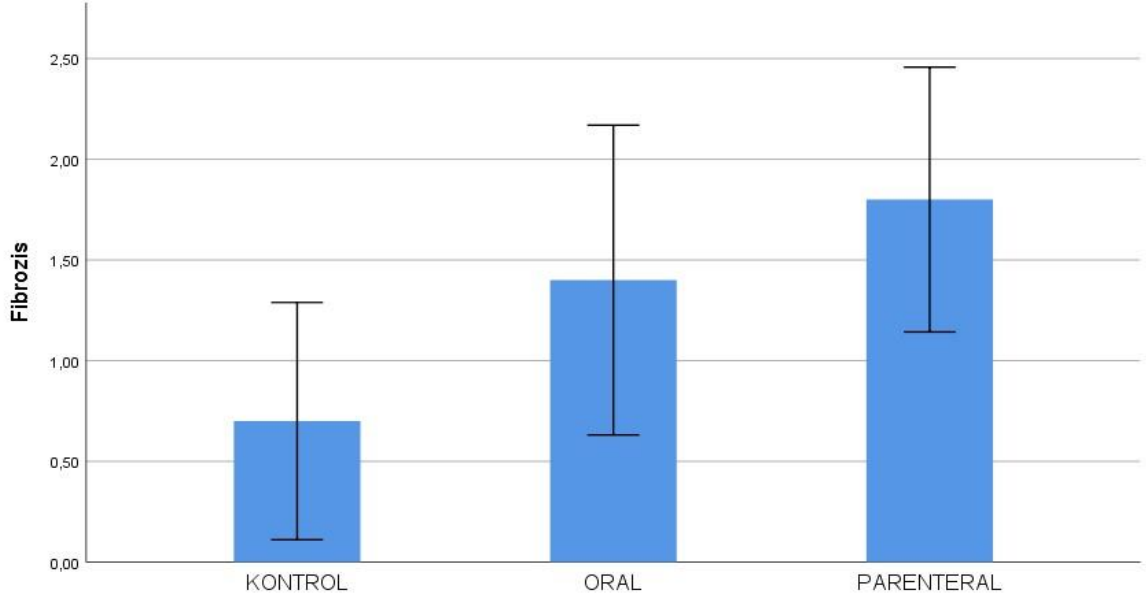


Grafik 7: Gruplar arasında miyelin figür oluşumu histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

Ancak fibrozis (Grafik 8 ve Tablo 9) ve inflamasyon (Grafik 9 ve Tablo 10) parametrelerinin değerlendirilmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü. Parenteral uygulama grubundaki fibrozis oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti, $p < 0,05$ olarak hesaplandı (Tablo 9).



Resim 18:Yağ dokusunda şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu- H&E boyama. a) Kontrol grubunda düşük derece adipositlerde şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu (kalın ok) b) Parenteral uygulama grubunda düşük derece adipositlerde şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu (kalın ok) (H&E, x200 büyütme).

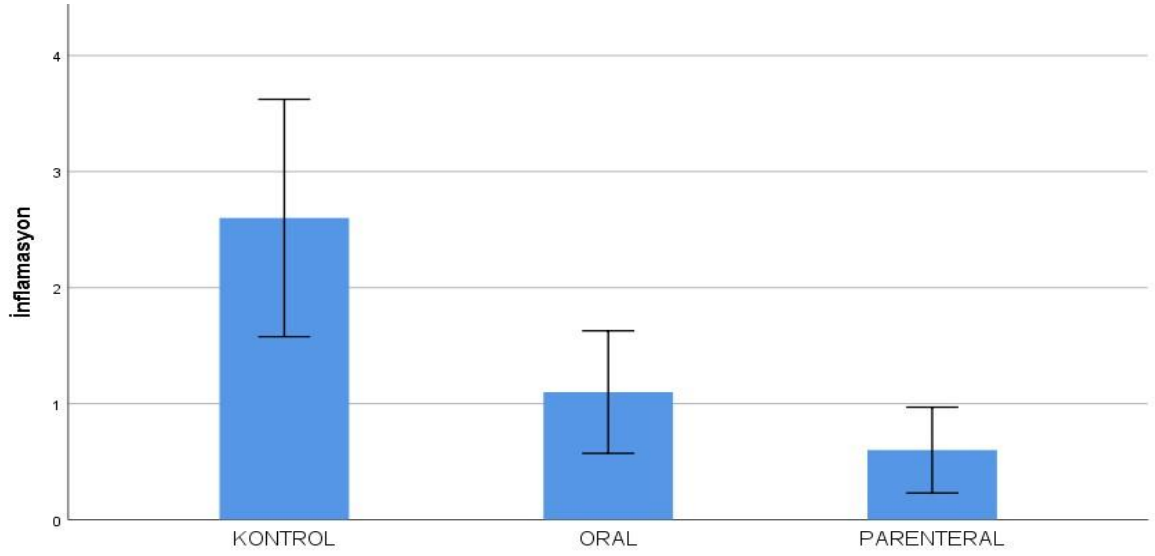


Grafik 8: Gruplar arasında fibrozis histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

FİBROZİS	<i>p</i>
KONTROL - ORAL	0,407
KONTROL - PARENTERAL	0,045
ORAL - PARENTERAL	1,000

Tablo 9: Üç grubun ikili karşılaştırmasında parenteral uygulama grubundaki fibrozis oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti.

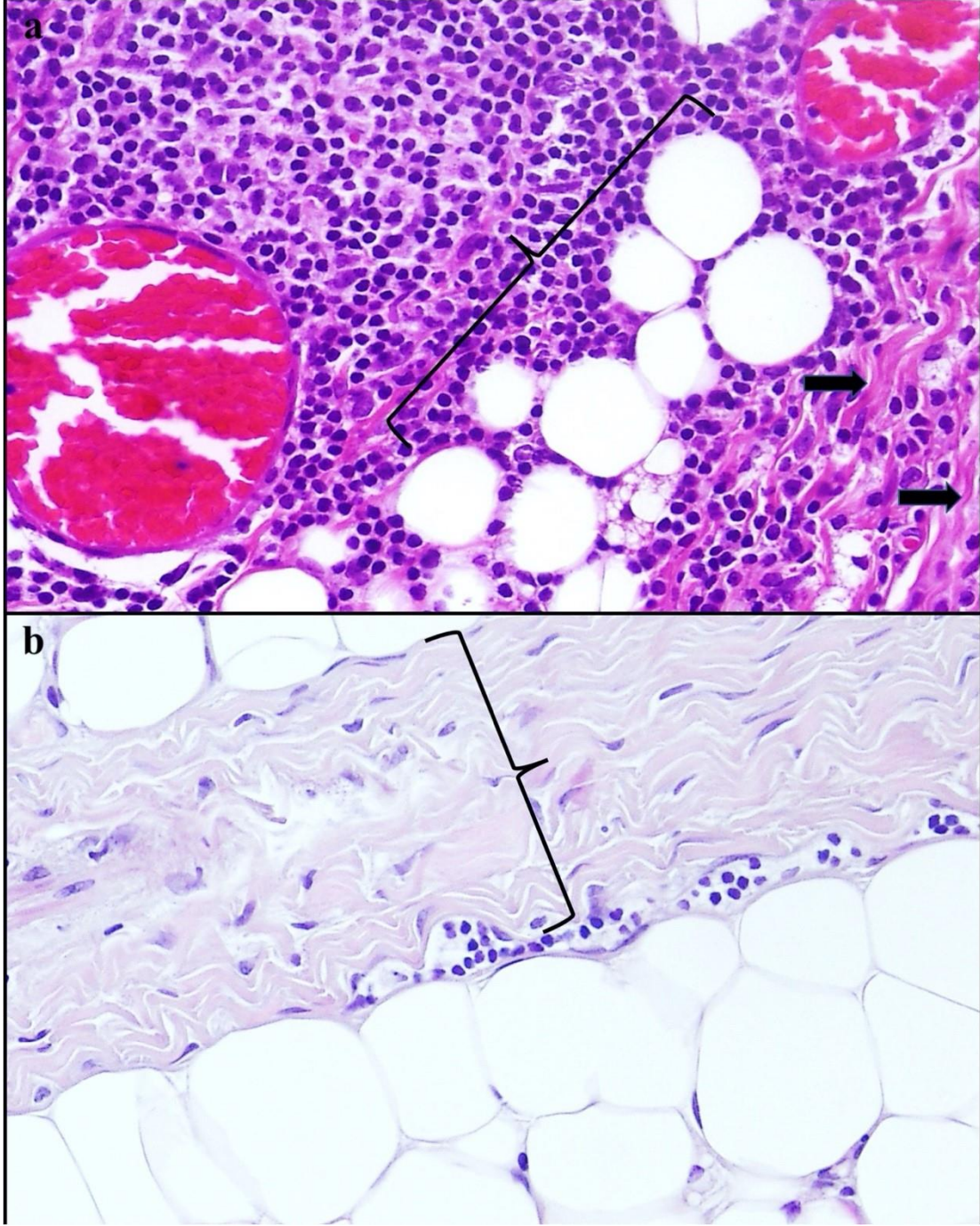
Parenteral uygulama grubundaki inflamasyon oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşük saptandı, $p < 0,05$ olarak hesaplandı (Tablo 10).



Grafik 9: Gruplar arasında inflamasyon histopatolojik parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

İNFLAMASYON	<i>p</i>
KONTROL - ORAL	0,542
KONTROL - PARENTERAL	0,001
ORAL - PARENTERAL	0,075

Tablo 10: Üç grubun ikili karşılaştırmasında parenteral uygulama grubundaki inflamasyon oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü.



Resim 19: Fibrozis ve inflamasyon bulguları- H&E boyama. a) Kontrol grubunda düşük derece fibrozis (kalın ok), yüksek derece inflamasyon (işaretli alan) (H&E, x400 büyütme); b) Parenteral uygulama grubunda grubunda yüksek derece düzeyde fibrozis (işaretli alan), düşük derece inflamasyon görünümü (H&E, x400 büyütme).

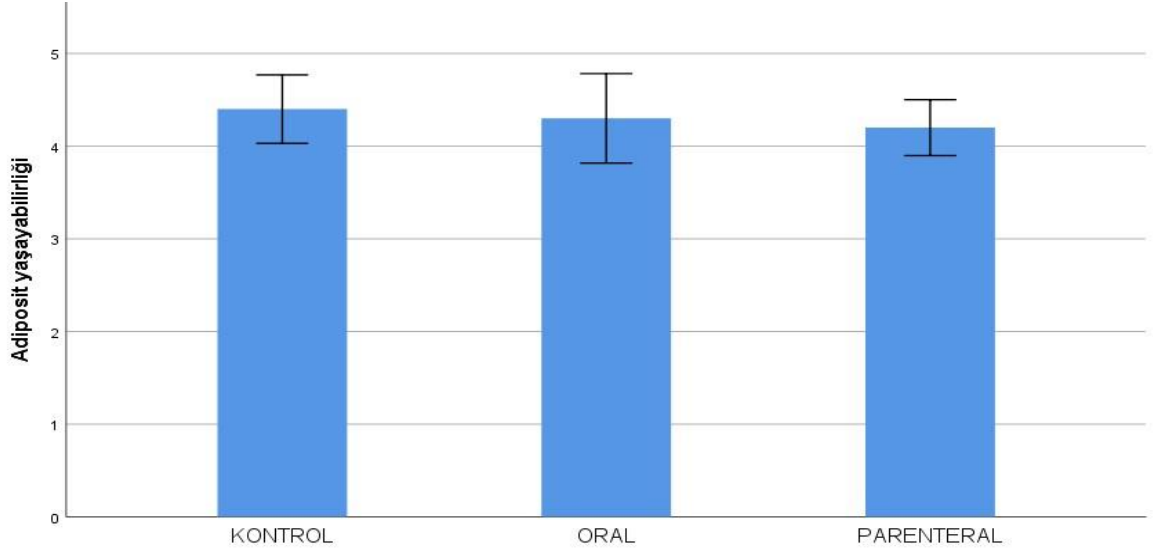
4.3. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal olarak perilipin ve galectin boyaması ile yaşayan adiposit yaşayabilirliği, CD31 boyama ile yağ greftinin tamamlanmış vaskülarizasyon oranı, VEGF boyama ile dokunun devam etmekte olan neovaskülarizasyon oranı değerlendirildi. CD31 boyama için 10 büyük büyütme alanında (BBA) sayım yapıldı. Perilipin ve galectin 3 boyaması ile yapılan immunohistokimyasal incelemede yaşayan adipositlerin sayılması 6 puanlık değerlendirilme ile kaydedildi. Puanlama 0-5 arası olarak, 0 (0%, yok), 1 (%1-20, az), 2 (%21-40, azdan ortaya), 3 (%41-60, orta), 4 (%61-80, ortadan şiddetliye), 5 (%81-100, şiddetli) olarak belirlendi.

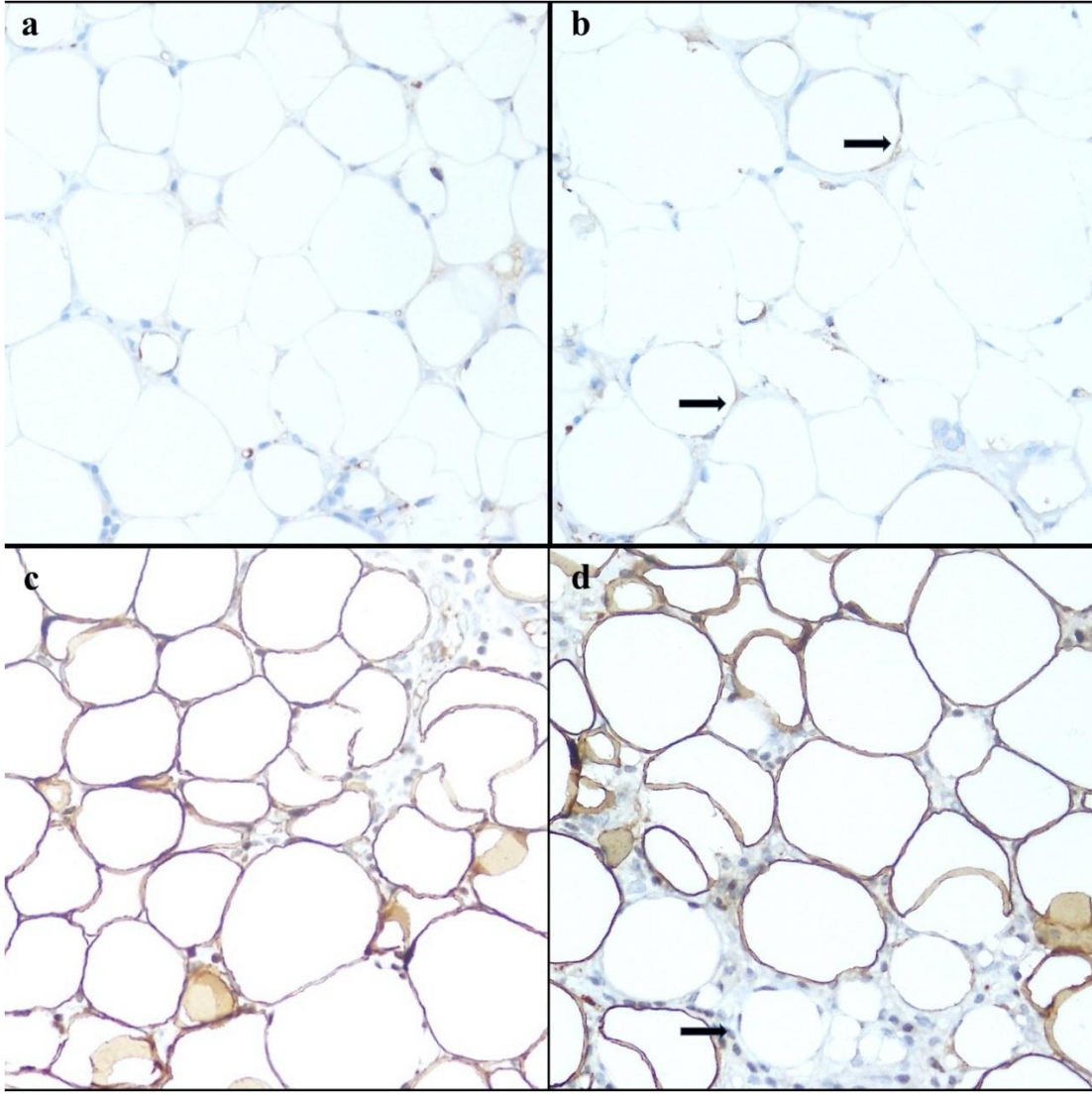
Kruskal-Wallis testi uygulanarak yapılan istatistik analizde perilipin-galectin boyaması ile değerlendirilen adiposit yaşayabilirliği (Grafik 10 ve Tablo 11) parametresi değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

İmmunohistokimyasal parametre	Kontrol (n=10)	Oral (n=10)	Parenteral (n=10)	p*
	medyan (Q1-Q3)	medyan (Q1-Q3)	medyan (Q1-Q3)	
Adiposit yaşayabilirliği (Perilipin ve Galectin)	4,00 (4,00-5,00)	4,30 (4,00-5,00)	4,20 (4,00-4,25)	0,674
VEGF	27,50 (24,75-32,50)	22,50 (18,25-28,25)	19,50 (17,00-22,00)	0,003
CD31	70,00 (59,50-81,00)	78,00 (75,75-96,25)	76,00 (67,50-88,50)	0,044

Tablo 11: Gruplar arasında immunohistokimya parametrelerinin değerlendirilmesi. (*:KruskalWallis testi, Q1-Q3: 25.-75. persentil)

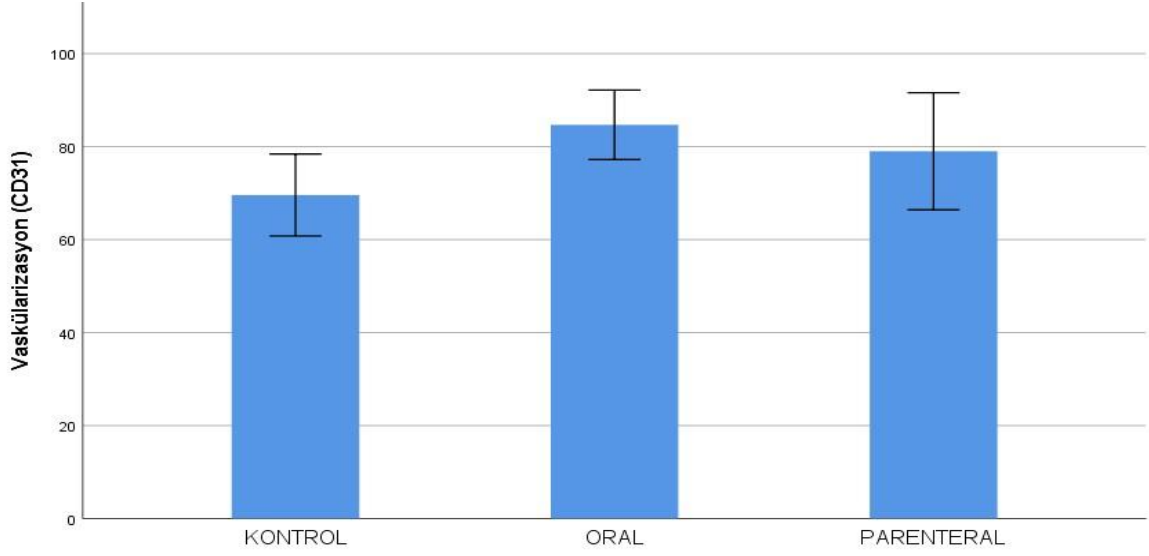


Grafik 10: Gruplar arasında perilipin ve galectin ile immunohistokimyasal boyama ile değerlendirilen adiposit yaşayabilirliği parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.



Resim 20: Viable-non viable adiposit sayımı a) Kontrol grubunda galectin 3 ile boyama paterni; b) Oral uygulama grubunda galectin 3 ile boyama paterni (kalın ok) (Galectin 3, x400 büyütme); c) Kontrol grubunda perilipin ile boyama paterni; d) Oral uygulama grubunda perilipin ile boyama paterni (kalın ok) (Perilipin, x400 büyütme).

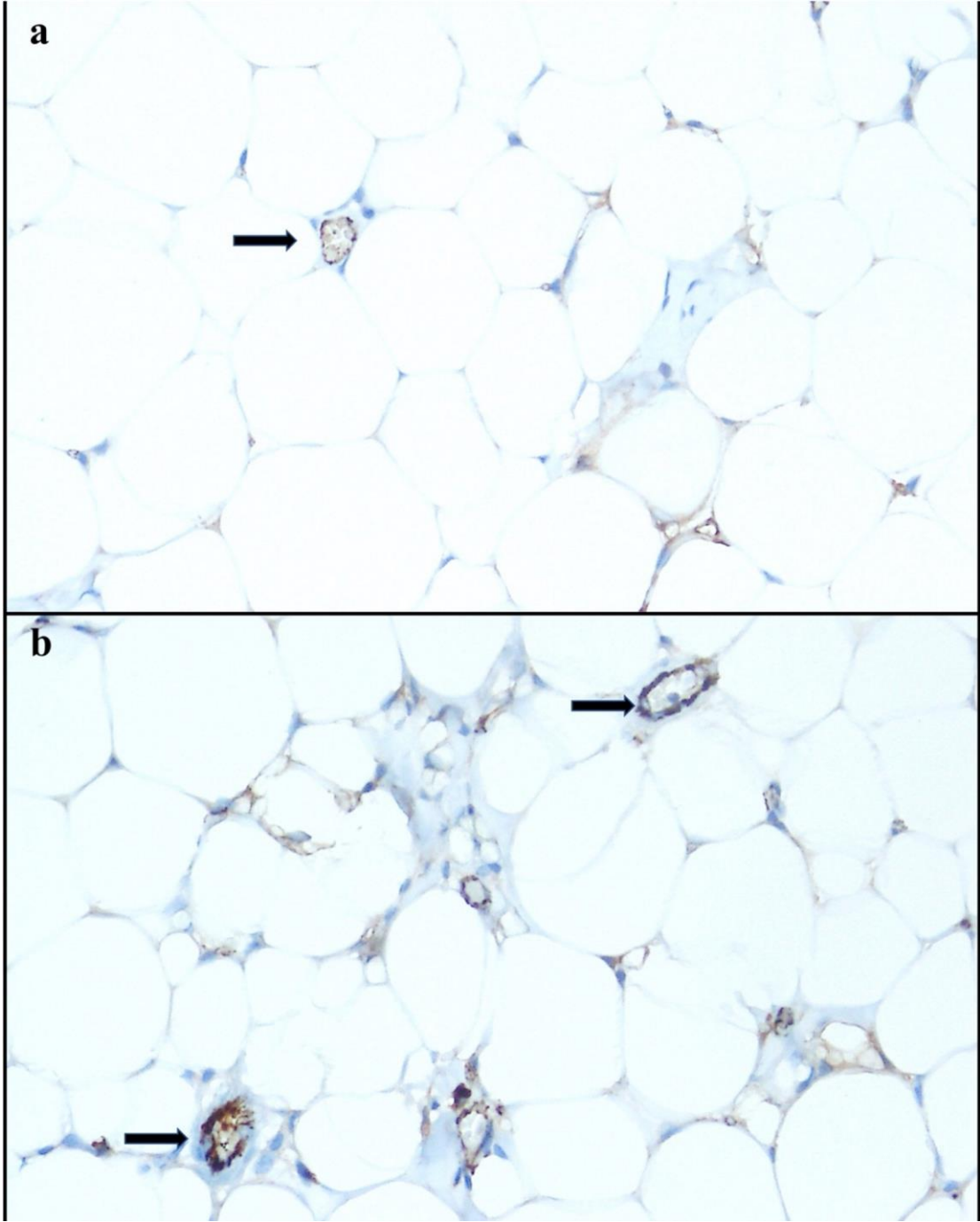
CD31 (Grafik 11 ve Tablo 12) ve VEGF (Grafik 12 ve Tablo 13) boyama ile yapılan immunohistokimyasal incelemenin Kruskal -Wallis testi ile değerlendirildiği istatistik analizde gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu. CD31 ile immunohistokimyasal boyama sonrası değerlendirmede grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında oral uygulama grubunun boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı. (Grafik 11 ve Tablo 12).



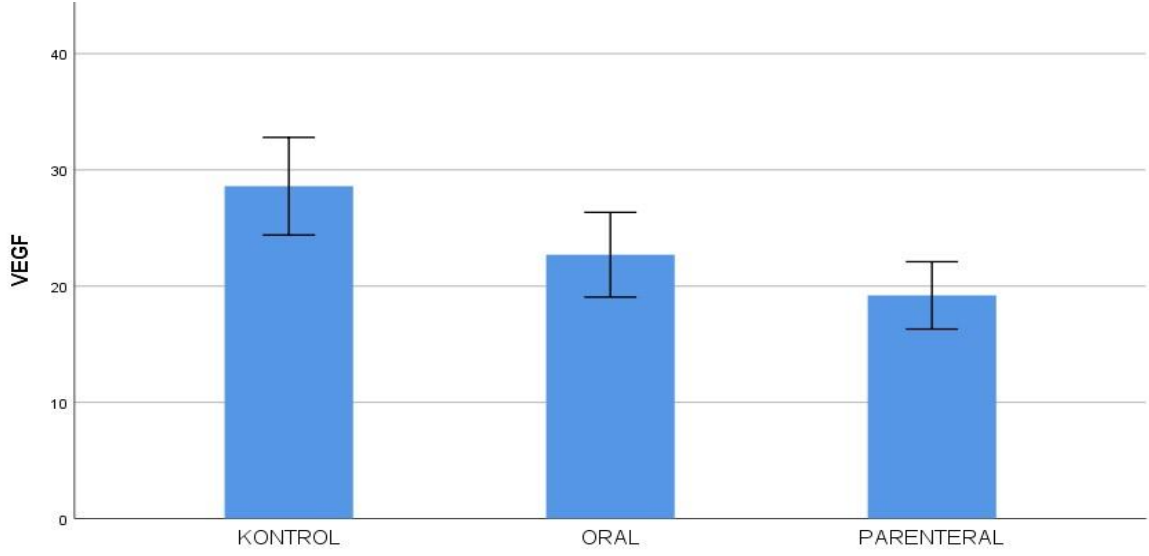
Grafik 11: Gruplar arasında CD31 ile immunohistokimyasal boyamayla değerlendirilen vaskülarizasyon parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

CD 31	<i>p</i>
KONTROL - ORAL	0,037
KONTROL - PARENTERAL	0,723
ORAL - PARENTERAL	0,555

Tablo 12: Üç grubun ikili karşılaştırmasında oral uygulama grubundaki CD31 ile immunohistokimyasal boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti.



Resim 21: Gelişimini tamamlamış vasküler yapıların değerlendirilmesi a) Kontrol grubunda damar duvarı (kalın ok); b) Oral uygulama grubunda boyanan damar duvarları (kalın oklar), (CD31, x400).

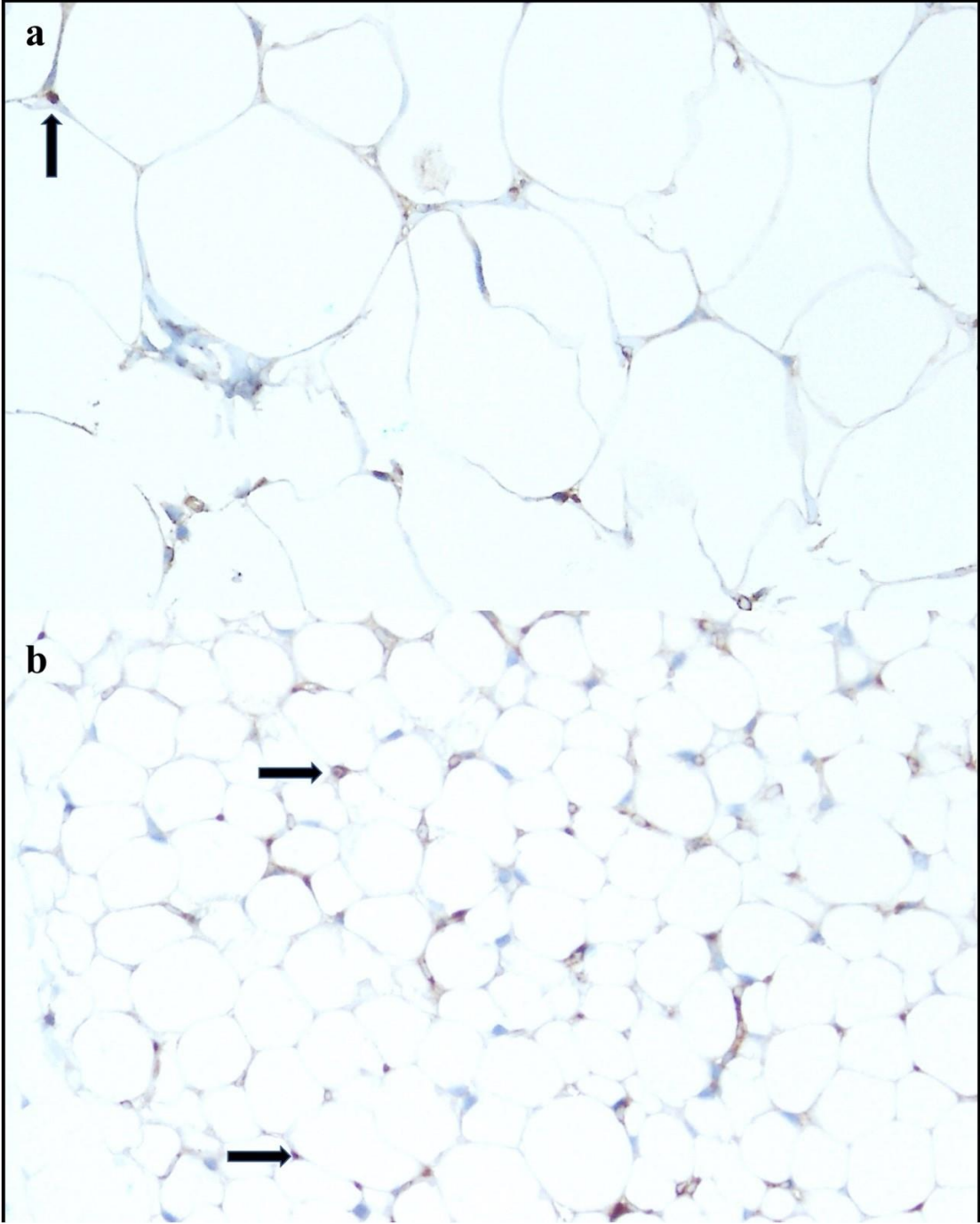


Grafik 12: Gruplar arasında VEGF ile immunohistokimyasal boyamayla değerlendirilen vaskülarizasyon parametresinin medyan, 25. ve 75. persentil dilimlerdeki değerlerinin karşılaştırılması.

VEGF ile immunohistokimyasal boyama sonrası değerlendirmede grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında parenteral uygulama grubunun boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı. (Tablo 13).

VEGF	<i>p</i>
KONTROL - ORAL	0,137
KONTROL - PARENTERAL	0,002
ORAL - PARENTERAL	0,497

Tablo 13: Üç grubun ikili karşılaştırmasında kontrol grubundaki VEGF ile immunohistokimyasal boyanma oranları parenteral uygulama grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti.



Resim 22: Neovaskülojeninin değerlendirilmesi a) Kontrol grubunda boyanan damar duvarı (kalın ok) VEGF, x200); b) Parenteral uygulama grubunda boyanan damar duvarları (kalın oklar), (VEGF, x400).

5. TARTIŞMA

Otolog yağ dokusu geniş depoları, erişim kolaylığı ve doğal görünümü göz önüne alındığında mükemmel bir yumuşak doku dolgu maddesidir. Bununla birlikte, yağ dokusunun greft şeklinde nakli sonrasında uzun dönem takiplerde yaşayabilirliği belirsizliğini korumaktadır. Bu belirsizlik yağ greftlerinin en büyük eksikliklerinden biri olarak görülmektedir. Literatürde yağ grefti ile ilişkili çalışmalarda uzun dönem takiplerde %20 ile 90 arasında değişen emilim oranları göstermiştir.^{43,79-83} Ancak greft kaybından sorumlu mekanizmalar halen tam olarak anlaşılacak ile birlikte, en çok kabul gören teori, transplantasyon sırasında canlı adipositlerin sayısının nihai yağ grefti hayatta kalma hacmi ile ilişkili olduğunu belirten *Peer*'in hücre hayatta kalma teorisidir.⁵⁰ Teoriye göre, serbest bir greftteki hücreler, farklı doku ile temas halinde, transplantasyonun ardından hayatta kaldığında, greftin hücreler arası matris ve hücre içi yapıları da hayatta kalma eğilimi gösterir, greft karakteristik görünümünü ve fiziksel özelliklerini korur. Böylece bir kırıkta grefti kırıkta olarak, bir kemik grefti kemik olarak, bir yağ grefti yağ olarak evrilir. Greftteki hücreler nakil sonrası yaşamını sürdüremediğinde, hücreler arası ve hücre içi materyal, greft farklı doku ile temas halinde ise dejenere olma eğilimi gösterir. Ölü hücrelere sahip bu tür dejenere greftler karakteristik yapılarını kaybederler ve kemik spiküller veya fibröz doku gibi bağ dokusu türevleri ile değiştirilirler. Çözülmemiş sorun, özellikle hacim oranlarının en kritik olduğu meme rekonstrüksiyonu ve fasiyal konturun düzeltilmesinden sonra greftlenmiş yağ dokusu hacminin korunmasıdır. Bu yüksek emilim oranı, yağ elde etmek için tekrarlanan aspirasyon yardımcı lippektomi operasyonlarının yanı sıra, daha yüksek maliyet, olumsuz görünüm, artan hasta morbiditesi ve rahatsızlığı ile ilişkili istenen bölgede over-korreksiyon ve yeniden enjeksiyon prosedürlerini gerektirir.

Alıcı sahaya transfer edilen yağ greftinin yaşayabilirliğini etkileyen önemli faktörelreden birisi alıcı sahada oluşan mikroçevre şartlarıdır. Literatürde alıcı saha şartlarının iyileştirilerek yağ grefti için daha stabil ve vasküler yatak oluşturmayı amaçlayan çalışmalar mevcuttur.^{62-64,84-86}

Sezgin ve ark.^{84,86} alıcı sahanın mikroigneleme tekniğiyle önkoşullanmasının yağ grefti sağkalımında etkisini deneysel ve klinik olarak araştırmış ve başarılı sonuçlar bildirmişler.

Alıcı sahanın mikroçevre şartlarının iyileştirilmesinde farklı yollardan biri de alanın mobilizasyon açısından stabilizasyonudur. Stabil, travmatik ve hiper mobil olmayan çevre şartlarının oluşturulmasının yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırabileceği düşünülebilir. Araştırmacılar genel olarak bu amaçla botulinum toksinini

değerlendirmişlerdir.⁶²⁻⁶⁴ Ancak bu çalışmalar greft ağırlık ve hacim retansiyonu açısından çelişkili sonuçlar sunmuştur. Alıcı alana botulinum toksin-A (Btx-A) enjeksiyonu yapılarak yağ grefti ağırlık ve hacim kaybı oranlarını azaltmayı amaçlayan bir deneysel çalışmada toksinin alıcı alanda vasküler yapıların ve matür adipositlerin arttığını raporlanmıştır. Bunun, dokuların kan perfüzyonunu artırma ve immobilizasyona ek olarak ASC'lerin işlevini iyileştirme gibi doğrudan etkiye sahip olan Btx-A'dan kaynaklandığını öne sürülmüştür. Ancak çalışmada ağırlık ve hacim kaybı Btx-A yapılmayan kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir.⁶³ Salin enjekte edilen gruba karşı botulinum nörotoksini enjeksiyonu yapılan deney grubunu karşılaştıran bir başka fare çalışmasında ise Btx-A yapılan grupta ağırlık ,hacim ve histolojik parametreler açısından daha iyi sonuçlar bildirilmiştir.⁶² Çıplak farelerde kas üstü planda insan yağ grefti uygulanması modeli oluşturan bir başka çalışmada botulinum toksini ile ön koşullandırılmış alıcı saha, eş zamanlı Btx-A enjeksiyonu ve enjeksiyon yapılmayan gruplar karşılaştırılmış ve nörotoksin yapılan gruplarda daha iyi vaskülarizasyon, adiposit yaşayabilirliği ve sonuç greft hacmi raporlanmıştır.⁶⁴ Yağ grefti alıcı sahasının nörotoksinle immobilize edilmesinin yağ grefti uygulamalarında her zaman klinik olarak kullanışlı olmayabilir. Orta ve alt yüz bölgesine, gluteal bölgeye yağ grefti uygulamalarında zemindeki musküler yapıların Btx-A nörotoksini ile felç edilmesinin özellikle estetik kaygıyla başvuran sağlıklı bireylerde güvenli ve pratik klinik karşılığı yoktur. Çalışmamızda alıcı alanın fizyodinamisini etkilemeden (kas felci yapılmadan) yatakta greft için travmatik olan myospazmların engelleyerek, yağ greftinin sahaya tutunması için en kritik dönemde hareketliliğe bağlı adiposit kaybını azaltma ve ilişkili olarak, uzun dönemde başarılı yağ grefti sonuç hacim ve ağırlığına ulaşmak hedeflenmiştir. Literatürde alıcı sahanın mobilizasyonunu kısıtlama amaçlı tiyokolşikosid grubu ilaçların kullanımı ile ilgili herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Otolog yağ greftleri, canlılıklarını artırmak ve kök hücre tedavileri dahil olmak üzere emilim oranını azaltmak için son yıllarda trombositten türetilen büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri, trombositten zengin plazma (PRP), aktive M2 makrofajlar ve matris metalloproteinaz -2 gibi çok sayıda farklı ajanla kombine edilmiştir.⁸⁷⁻⁹³ Bir diğer klinik çalışmada otörler membran kapama özelliğine sahip polaksomerlerin yağ grefti yaşayabilirliğini arttırdığını belirtilmiştir.⁹⁴ Demir şelatörü olan desferrioksaminin antioksidan, neoanjiogenezi stimüle edici ve kök hücre aktivasyon

özelliklerinden yola çıkarak, yağ grefti yaşayabilirliğine etkisinin değerlendirildiği çalışmada olumlu sonuçlar bildirilmiştir.⁹⁵

Yağ grefti sağ kalımı üzerine bildirilmiş olan birçok çalışma olmasına karşılık, deneysel çalışmalarda metodolojik farklılıklar nedeniyle objektif kıyaslamalar yapmak zordur. Yapılan çalışmalardaki başlıca metodolojik farklılıklar; deney hayvanının tür, cinsiyet, verici-alıcı alan seçimi, deneysel model haritalaması (grupların oluşturulması), takip süresi değerlendirme parametre ve kriterleridir. 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 yansıtabileceği düşünülmüş olsa da, artan finansal maliyet ve tesis kapasiteleri araştırmacıları daha çok kemirgen modeller kullanmaya yöneltmiştir. Sıçan ve fareler barınma, beslenme, bakım, dayanıklılık, ulaşılabilirlik ve cerrahi işleme uyum gibi faktörler bir arada göz önüne alındığında diğer modellere göre üstünlük kazanmaktadır.⁹⁶⁻⁹⁹

Çalışmamızda bakım, besleme, dayanıklılık ve maliyet faktörleri değerlendirilerek, Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır.

Sıçanlarda inguinal yağ yastığı donör saha olarak ulaşılması kolay ve düşük komplikasyon olasılığı nedeniyle otolog yağ greftinin model oluşturduğu deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilmiştir.^{52,56,84,90,100-104} Bu özellikler değerlendirilerek, çalışmamızda greft donör sahası olarak sağ inguinal yağ yastığı tercih edilmiştir.

Matürasyon fazında olan skar dokusunun yağ grefti yaşayabilirliğine etkisiyle ilgili literatürde yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Ancak matürasyon fazında olan skar dokusunun fibrozisi indüklediği bilinen bir gerçektir.¹⁰⁵ Çalışmamızda donör sahaya uygulanan yağ greftini insizyonun matürasyon fazında oluşacak fibrotik etkilerinden izole etmek için sırt bölgesinden yapılan standart boyutlu kesiyle girilerek cilt altından tünelize edilmiştir ve deneklerin oksipital bölgesinde kas üstü planda oluşturulmuş poşa yerleştirilmiştir.

Cinsiyet hormonları (özellikle östrojen) ve onların ko-reseptörleri adiposit farklılaşması ve işlevinde kritik bir rol oynar. Östrojen yükleme dozu yapılmış fare modellerini kullanan çalışmalarda, östrojenin, ağırlıklı olarak ER- α (Östrojen Reseptör- α) aracılığıyla yağ gelişimi üzerindeki inhibitör etkisi gösterilmiştir.^{106,107} Östrojenin adipoz gelişiminin negatif düzenleyicisi olarak işlev gördüğünü gösteren verilere rağmen, 17 β -estradiol'un adiposit proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyardığı da öne sürülmüştür.¹⁰⁸

Deneysel çalışmalarda, dişi cinsiyet kullanılması östrojen ilişkili olarak yağ grefti sağ kalımı üzerinde değişken etkilere neden olabilir.¹⁰⁹⁻¹¹² Sonuçların cinsiyet kaynaklı lipojenik etkilerden arındırılabilmesi amacıyla çalışmamızda Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Literatürdeki birçok çalışma deney sonlandırma süresi olarak adipogenezin sonlandığı belirtilen 12 haftayı baz almıştır.^{53,56,57,98,109,110} Çalışmalara göre, bu dönemden sonra adipoz greftler ağırlık veya hacimsel olarak değişime uğramaktan ziyade, histolojik olarak olgunlaşma gösterir.⁹⁷ 1968-2015 yılları arasında yağ greftleri üzerinde yapılmış olan tüm çalışmalar birlikte incelendiğinde; yağ grefti olgunlaşma döneminin sonu olarak 12 haftalık süreyi deney sonlandırma noktası kabul eden çalışmaların en yüksek orana sahip olduğu görülmüştür.⁹⁸ Kato ve ark.⁵⁶ adipogenezin 12 haftaya kadar tamamlandığını öne sürmüşlerdir. Nekroze adipositlerden türetilen lipid damlacıkların bu sürede konak tarafından yavaş yavaş absorbe edildiği ve böylece bu süreçte adiposit rejenerasyonuna kadar boşluğu koruyarak adipoz remodelinge yardımcı olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda adipogenezin tamamlanma süresi esas alınarak, deney sonlandırma 12. haftada gerçekleştirilmiştir.

Greftleme sonrası adipoz dokunun sitolojik değişimini değerlendirildiği deneysel çalışmada canlı adipositlerin 1. gün gibi erken bir süre zarfında dramatik bir şekilde azaldığı ve nakledilen greftin sadece periferinde (yüzeyden yaklaşık 300 µm derinlikteki alanda) tespit edilmiştir.⁵⁴ Araştırmacılara göre alıcı alanın vaskülarize canlı yüzey ile temas eden bu alanın daha derinindeki adipositler beslenemediği için yaşayabilirliklerini sürdürememektir. Ancak adipoz dokunun ilerleyen süreçte rejenerasyonunu sağlayacak olan multipotent ASC'ler mikroçevredeki şiddetli stresli koşullar altında bile 3 güne kadar canlı kalabilir. Muhtemelen çevre sağlam dokudan plazma difüzyonuyla beslenemediğinden dolayı 2. günden 5. güne kadar canlı adipositlerin sayısının giderek azaldığını ve ölmekte olan adipositlerin perilipin ekspresyonunu tamamen kaybettiğini, sonuçta 5. günde periferik alanda perilipin ile zayıf pozitif boyanan sayısal olarak daha az adiposit görülmesine neden olmuştur. Ancak 7. günden sonra, canlı adiposit alanının tüm adipoz doku alanına oranında yeniden artış gözlemlenmiştir, bu artan sayı ve yeni adiposit boyutu gibi rejeneratif adipojenik değişikliklerin başladığını ortaya koymuştur. Gerçekten de 5. ve 7. günlerde canlı adiposit alanı ile ölü adiposit alanı arasındaki bağlantı çevresinde Ki67 pozitif proliferatif hücreler saptanmış, bu da öncü hücrelerin proliferasyonunu teyit etmiştir. Özetle bir yağ greftini sagittal kesitte incelersek en yüzeysel bölge, 300 µm'den daha az kalınlıkta olan

hayatta kalan bölgedir. Hayatta kalan bölgede hem adipositler hem de ASC'ler görülür. İkinci bölge ise çevre dokuların damarlanma ve tutunma gibi mikroçevresel koşullara bağlı olarak kalınlığı değişen rejenerasyon bölgesidir. Bu bölgede, adipositler 1. gün gibi erken bir tarihte ölür, ancak ASC'ler hayatta kalır ve nekroze gitmiş hücrelerin yerine yeni adipositlerin oluşmasını sağlar. En merkezi bölge hem adipositlerin hem de ASC'lerin nekroze gittiği, rejenerasyonun beklenmediği ve ölü boşluğun emileceği veya skar oluşumuyla kaplanmış olan nekroz bölgesidir.^{54,56}

Çalışmamızın amacı deney gruplarına postoperatif 5 gün oral ve parenteral yoldan tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaç verilerek erken dönemde metabolik olarak hassas olan greftin temas ettiği zeminde kasların travmatik myospazmına bağlı yıkıcı etkilerden izole edilmesi ve 5. günden sonra başlayan rejenerasyon süreci için stabil bir mikroçevre sağlanarak greftte ağırlık ve hacim kaybının azaltılması olarak belirlenmiştir. Ayrıca tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların antiinflamatuvar etkisinin erken dönemde dengeli kullanılarak, ilk 5 günde 300 µm'den daha derinde yerleşen adipositlerin nekroz sonrası alanda oluşan inflamasyonu minimuma indirerek, 5. günden sonra adipoz rejenerasyon ve vaskülogenez için gerekli olan inflamatuvar sürecin aktif baskılanmaması da hesaba katılarak, ilaç uygulanma süresi tiyokolşikosid grubu ilaçlar için önerilen güvenli aralık olan 5 gün olarak belirlenmiştir.

Bugüne kadar yapılan tüm yağ grefti ile dolgu-augmentasyon klinik uygulamalarında, yine bu bağlamda klinik ve deneysel çalışmaların büyük çoğunluğunda ana amaç ve sonuç yağ greftindeki ağırlık ve hacimsel rezorpsiyonu azaltarak, uygulama aşamasındaki greftin miktarının maksimum olarak korunması olmuştur. Çalışmamızda nakledilen yağ greftlerinin ağırlığı ve hacmi bütün deneklerde azalmıştır. 12 haftalık takip sonucunda elde edilen bu bulgular literatür ile uyumlu bulunmuştur.¹¹³ Ancak parenteral tiyokolşikosid uygulama grubunda gözlemlenen ağırlık azalması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olarak bulunmuştur. Yine yağ grefti hacim değişimi değerlendirildiğinde, hem oral tiyokolşikosid uygulama grubunda, hem de parenteral tiyokolşikosid uygulama grubundaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha düşük olarak gözlemlenmiştir. Bununla da çalışmanın amacı olan tiyokolşikosid uygulaması sonrası donör saha myospazmlarının engellenerek greft için daha stabil mikroçevre oluşturulması ile sonuçta daha az ağırlık ve hacim kaybı hedeflerine ulaşılmıştır.

Yağ grefti sağ kalım hacminin değerlendirilmesinde kullanılan bugüne kadar bildirilmiştir. Temel parametreler ağırlık ölçümü, hacim ölçümü, histolojik inceleme ve

immunohistokimyasal yöntemleridir. Bunlar arasında en sık değerlendirilen parametre ağırlık ölçümü olmasına karşın çalışmaların birçoğunda bu yöntem tek başına yeterli bulunmayarak hücresel yapının da incelenebilmesi için histolojik incelemeler ve immunohistokimya çalışmalara dahil edilmiştir .Boyama teknikleri arasında en sık kullanılan H&E olmasına rağmen, metabolik etkileşimden bağımsız olarak tüm yapıları eşit düzeyde boyadığı için kanıt değeri düşüktür.^{98,114} İmmunohistokimyasal boyamalar daha ileri teknik gerektirmelerine karşılık, hedefe yönelik boyama yaptıkları için daha spesifiktirler.^{54,115-118} Yağ grefti viabilitesini değerlendirmek için en sık kullanılan immunohistokimyasal ajan perilipindir. Perilipin, parafinize kesitlerde metabolik olarak aktif adipositlerde yüzey belirteci olarak bulunur, ancak ölü adipositlerde boyanma göstermemektedir.^{53,54,56,98,113,117-120} Galectin 3 ise intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklarda etkin olan ve hücre ölümünü ortaya koymak için sıklıkla başvuru alan hücre belirteçidir.¹²¹ Bu nedenle çalışmamızda canlı-ölü adiposit oranları değerlendirilirken H&E boyama yöntemi yerine canlı yağ hücreleri varlığını göstermek için immunohistokimyasal belirteç olarak perilipin, ölü hücreleri göstermek için galectin 3 kullanılmıştır. CD31 vasküler endotelial hücreleri ve hematopoetik kök hücreleri yaygın olarak boyadığı için anjiyogenezin değerlendirilmesinde sık kullanılan hassas immunohistokimyasal belirteçtir.¹²² Bunu baz alarak çalışmamızda greft tamamlanmış vaskülarizasyonu immunohistokimyasal olarak CD31 ile değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yapılan histolojik değerlendirmede yağ nekrozu, fibrozis, inflamasyon, kist-vakuol oluşumu, vaskülarizasyon, adipositlerde şekil bozukluğu, miyelin figür oluşumu (geri dönüşümsüz hücre hasarı göstergesi) parametreleri değerlendirilmiştir. Üç grubun karşılaştırılmasında yağ nekrozu, kist-vakuol oluşumu, vaskülarizasyon, adipositlerde şekil bozukluğu ve miyelin figür oluşumu parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. Ancak parenteral tiyokolşikosid uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece az inflamasyon bulguları gözlemlenmiştir. Bu tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların anti inflamatuvar etkisi ile açıklanabilir.^{74,123,124} Yakın zamanlara kadar tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların anti inflamatuvar etkisinin mekanizması belirsizliğini korumuştur. Tiokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların anti kanser ve anti inflamatuvar etkisine odaklanan bir araştırmada ilacın anti inflamatuvar etkisini gösterebileceği olası bir mekanizmanın, yaygın olarak inflamasyon ve tümörigenezde yer alan NF-κB yolunu modüle etmesi ile ilişkilendirmiştir.⁷⁴

Çalışmamızın sonuçlarına göre parenteral uygulama grubunda fibrozis oranları kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek çıkmasına rağmen, çalışmadaki her üç grubun oranları literatürle karşılaştırıldığında, botulinum toksini, deferroksamin, aktive PRP (plateletten zengin plazma) uygulanan benzer çalışmalarda belirtilen oranlardan daha düşük ve ya benzer olarak gözlemlenmiştir.^{63,95,125} Yağ greftinin sonuçlarını immunohistokimyasal olarak incelemeye odaklanan deneysel çalışmaya göre greftleme sonrası ilk 3 ay bir doku onarımı dönemi ve bu dönemden sonra adipogenez olmamaktadır. Dokudaki ilk iskemik hasardan sonra, inflamatuvar hücreler grefte infiltre olur, önce rejenerasyon bölgesine ve ardından nekrotizan bölgeye dahil olur. Rejenerasyon bölgesinde adipogenez ve anjiyogenez ilerlemekte, muhtemelen dokuda yerleşik ASC'lerden kaynaklanan yeni nesil adipositler ölü adipositlerin yerini almaktadır. Rejenerasyon olaylarına paralel olarak lipid absorpsiyonu (fagositoz) ve skar dokusu ile lipid replasmanı (fibrozis) gibi stabilize edici olaylar ortaya çıkar. Hem rejenerasyon hem de stabilizasyon süreçleri, ilk 3 ay boyunca rejenerasyon bölgesinin yüzeysel katmanlarından daha derin katmanlara doğru ilerler. Rejenerasyon süreci 4 haftada pik yapmasına ve 3 ayda tamamlanmasına rağmen, stabilizasyon süreci 3 ayda bitmemektedir. Stabilizasyon süreci en az birkaç ay daha devam edebilir. Araştırmanın bulguları ayrıca, adiposit büyüklüğündeki yağ damlacıklarının emildiğini veya çok katmanlı M2 makrofajlarla geçici olarak doldurulduğunu, fibrotik doku ürettiğini, ancak önemli ölçüde daha büyük yağ damlacıklarının birkaç ay içinde yağ kistleri oluşturabileceğini ve kalıcı olabileceğini göstermiştir.⁵⁶ Gruplar ve çalışmalar arasındaki farklılıklar fibrozis sürecinin bu parametreler arasında daha uzun süre zarfında oluştuğu, yukarıda belirtildiği gibi gibi aslında yağ greftinin tutunmasında 3 aydan sonra başlayan stabilizasyon döneminde devam etmesi ve 6-12 aya kadar sürebilmesi ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızın süresi yağ grefti miktarının makroskopik olarak stabil kaldığı 12.hafta ile sınırlanmıştır. Bu sınırlanmanın başka bir nedeni uzun takip sürelerinde hayvan deneklerde yaşlanma, hastalık ve denek kaybı oranlarının yükselerek çalışma sonucunda istatistiksel biasa neden olabileceğidir.

İmmunohistokimyasal değerlendirmede perilipin-galectin 3 boyamayla adiposit yaşayabilirliği, CD31 yüzey belirteci boyamasıyla greft vaskülaritesi değerlendirilmiştir. Her 3 grupta yaşayan adiposit oranı yüksek olarak ölçülmüştür, ancak spesifik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. CD31 yüzey belirteci ile immunohistokimyasal boyamada oral tiyokolşikozid uygulama grubundaki vaskülarite oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu

tiyokolşikosid grubu miyorelaksan ilaçla alıcı sahanın travmatik miyospazmdan arındırılmasının alanda grefte doğru oluşan neovaskülarizasyonun sekteye uğramadan oluşması ile açıklanabilir. Greftin erken tutunma aşamasında oluşan bu vaskülogenez sonucunda gelişimini tamamlamış damarlar olarak görülmüştür.

VEGF ile immunohistokimyasal boyama sonrası devam etmekte olan neovaskülarizasyon sürecini değerlendirmede, grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında parenteral uygulama grubunun boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Bir çok çalışmada VEGF'in gelişmekte olan neovaskülarizasyon sürecini göstermede etkili bir parametre olduğu belirtilmiştir.^{126,127} Çalışmamızda da vasküler yapısını tamamlamamış yapılar ve endotelyal hücreler VEGF boyama ile değerlendirilmiştir. Parenteral uygulama grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük inflamasyon ve yüksek fibrozis oranları ile eşzamanlı değerlendirildiğinde inflamasyon sürecinin tiyokolşikosid tarafından baskılanmasının greftin uzun süreli takibinde tamamlanmamış olan neovaskülarizasyon sürecini de negatif etkilediğini açıklayabiliriz.

Tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların uygulanmasının uzun dönem takiplerde yağ grefti miktarının başarılı şekilde korunmasında etkili olan basit, güvenli ve başarılı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ

Yağ grefti uygulamaları rekonstrüktif ve estetik cerrahide en çok uygulanan tekniklerden birisidir. Klinikte genel olarak dokuya hacim kazandırmak için uygulansa da kronik ağrı, yüz ve el gençleştirme, kök hücre tedavileri, skar iyileştirilmesi gibi geniş alanlarda kullanımı yaygındır. Birçok üstünlüklerinin yanısıra yağ grefti uygulamalarının en büyük eksisi uzun dönemde yaşayabilirliğinin öngörülemediği olmasına bağlı hacim kaybıdır. Bu

konuda birçok çalışma yapılmasına rağmen, henüz klinik uygulamayla ilgili herhangi fikirbirliği oluşturulamamıştır. Bu konuda ana odaklardan biri de alıcı alanda erken dönemde metabolik olarak hassas olan yağ greftinin etrafında stabil bir mikroçevre sağlanarak bunun uzun dönem greft yaşayabilirliğine yansımalarının araştırılmasıdır. Alıcı alanın immobilizasyonu için önceki çalışmalarda botulinum toksini kullanılmıştır. Çalışmamızda donör saha mobilizasyonunu sınırlandırılması ve uzun dönemde yağ grefti viabilitesine etkisi amacıyla tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçlar araştırılmıştır.

Tüm deneysel hayvan çalışmaları gibi, bu çalışmanın sıçan yağ dokusu kullanılarak yapılması ve aynı sonuçların insanda da direkt olarak yansımaması¹²⁸, bu çalışmanın bir kısıtlaması olarak kabul edilebilir. Araştırmamız ileride insan yağ grefti üzerinde yapılacak klinik çalışmalar için temel oluşturabilir.

Çalışmanın adiposit gelişim tamamlanması baz alınarak 12. haftada sonlandırılmasına karşılık, ileride genel doku histolojik remodelinginin değerlendirilmesi için daha uzun süreli deneyler yapılabilir.

Parametreler birlikte ele alındığında tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların yağ grefti ağırlık ve hacminin korunmasında etkili olan kolay uygulanabilir, güvenli ve başarılı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

ÖZET Tiyokolşikosid Grubu Kas Gevşetici İlaçların Yağ Grefti Yaşayabilirliğine Etkisinin Deneysel Olarak Araştırılması

Giriş ve Amaç: Yağ grefti uygulamaları rekonstrüktif ve estetik cerrahide en çok uygulanan tekniklerden birisidir. Birçok üstünlüklerinin yanısıra yağ grefti uygulamalarının en büyük dezavantajı uygulanan alanda hacim kaybıdır. Bu konuda birçok çalışma yapılmasına rağmen, henüz klinik uygulamada herhangi bir konsensus oluşturulamamıştır. Çalışmamızın amacı tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların aracılığıyla alıcı alanda yağ greftinin temas ettiği yüzeyde myospazma bağlı yıkıcı etkilerin izole edilmesi ve sonrasında

rejenerasyon süreci için stabil bir mikroçevre sağlanmasının ağırlık ve hacim kaybına etkisinin değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada üç ayrı grupta 30 adet Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Birinci gruba iki cerrahi işlem arasında ek müdahale yapılmadı. İkinci gruba oral, üçüncü gruba parenteral yoldan 5 gün tiyokolşikosid grubu ilaç uygulandı. 12 haftalık takip süreci sonrasında yağ greftleri geri alındı. Greftler makroskopik, histolojik ve immünohistokimyasal parametreler açısından değerlendirildi. Ardından elde edilen veriler istatistiksel olarak incelendi.

Bulgular: Grupların istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırmasında deneklerin ağırlık yüzde değişim oranları benzerdi. Parenteral uygulama grubundaki greft ağırlık azalması ve inflamasyon oranı kontrol grubuna göre düşüktü. Oral ve parenteral uygulama grubundaki greft hacim azalması kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü. Parenteral uygulama grubundaki fibrozis oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti. Tamamlanmış vaskülogenezin değerlendirmesinde oral uygulama grubunun boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Gelişimi devam eden neovaskülarizasyonun değerlendirmesinde parenteral uygulama grubunun boyanma oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. Diğer parametreler değerlendirildiğinde gruplar arasında sonuçlar benzerdi.

Sonuç: Çalışmamızda tiyokolşikosid grubu kas gevşetici ilaçların yağ grefti ağırlık ve hacminin korunmasında etkili, kolay uygulanabilir ve başarılı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Yağ grefti, tiyokolşikosid, kas gevşetici, adiposit yaşayabilirliği.

ABSTRACT Experimental Investigation of the Effect of Thiocolchicoside Group Muscle Relaxing Drugs on Fat Graft Viability

Introduction and Aim: Fat graft applications are one of the most applied techniques in reconstructive and aesthetic surgery. In addition to many advantages, the biggest disadvantage of fat graft applications is the loss of volume in the applied area. Despite many studies on this subject, no consensus has yet been established in clinical practice. The aim of our study was to isolate the destructive effects of thiocolchicoside group muscle relaxants due to myospasm on the surface of the fat graft in the recipient area and to evaluate the effect of maintaining a stable microenvironment for the regeneration process on weight and volume loss.

Materials and Methods: In the study, 30 Wistar-Albino rats were used in three different groups. No additional intervention was made between the two surgical procedures in the first group. Thiocolchicoside group was administered orally to the second group and parenterally to the third group for 5 days. After a 12-week follow-up period, the fat grafts were taken back. Grafts were evaluated in terms of macroscopic, histological and immunohistochemical parameters. Then, the obtained data were analyzed statistically.

Results: When the groups were compared statistically with the Kruskal-Wallis test, the weight percent change rates of the subjects were similar. Graft weight reduction and inflammation rate in the parenteral administration group were lower than in the control group. Graft volume reduction in the oral and parenteral administration group was significantly lower than in the control group. Fibrosis rate in the parenteral administration group was statistically significantly higher than the control group. In the evaluation of completed vasculogenesis, the staining rates of the oral administration group were significantly higher than the control group. In the evaluation of the developing neovascularization, the staining rates of the parenteral administration group were significantly lower than the control group. Results were similar between groups when other parameters were evaluated.

Conclusion: In our study, it was concluded that thiocolchicoside group muscle relaxants are an effective, easily applicable and successful method in preserving fat graft weight and volume.

Key words: Fat graft, thiocolchicoside, muscle relaxant, adipocyte viability.

7. KAYNAKLAR

1. Boyce M, Radtke C, Vogt PM. The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(5). doi:10.1097/PRS.0b013e3182a4c3fb
2. Clauser LC, Tieghi R, Galiè M, Carinci F. Structural fat grafting: facial volumetric restoration in complex reconstructive surgery. *J Craniofac Surg.* 2011;22(5):1695-1701.
3. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg.* 2001;28(1):111-119.
4. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3S):108S-120S.
5. 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):249-258.
6. Kaufman MR, Miller TA, Huang C, et al. Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art? *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(7):2287-2296.
7. Wetterau M, Szpalski C, Hazen A, Warren SM. Autologous fat grafting and facial reconstruction. *J Craniofac Surg.* 2012;23(1):315-318.
8. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy.* 2013;15(6):641-648.
9. Condé-Green A, Wu I, Graham I, 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):713-721.
10. Philips BJ, Grahovac TL, Valentin JE, et al. Prevalence of endogenous CD34+ adipose stem cells predicts human fat graft retention in a xenograft model. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(4):845.
11. Reverdin JL, IVY RH. THE CLASSIC REPRINT GREFFE EPIDERMIQUE—EXPERIENCE FAITE DANS LE SERVICE DE M. LE DOCTEUR GUYON, A

- L'HÔPITAL NECKER. *Plast Reconstr Surg.* 1968;41(1):79-81.
12. F. N. Fettransplantation. *Verh Dtsch Ges Chir.* 1893;22:66.
 13. Czerny V. Plastischer ersatz der brustdruse durch ein lipom. *Zentralbl Chir.* 1895;27:72.
 14. Posner C KH. Berliner Klinische Wochenschrift. Vol. 45, No. 3. 1908. *Berliner Klin Wochenschrift.* 1908;45(3).
 15. Holländer E. Die kosmetische Chirurgie (S. 669-712, 45 Abb.). In: *Handbuch Der Kosmetik.* Verlag van Veit, Leipzig (Germany); 1912:690-691.
 16. Lexer E. *Die Freien Transplantationen.* Vol 1. Enke; 1919.
 17. Mazzola RF, Mazzola IC. History of fat grafting: From ram fat to stem cells. *Clin Plast Surg.* 2015;42(2):147-153. doi:10.1016/j.cps.2014.12.002
 18. Peer LA. The neglected "free fat graft," its behavior and clinical use. *Am J Surg.* 1956;92(1):40-47.
 19. Fournier PF. Reduction syringe liposculpturing. *Dermatol Clin.* 1990;8(3):539-551.
 20. Illouz Y-G. The fat cell "graft": a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg.* 1986;78(1):122.
 21. Chajchir A, Benzaquen I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(6):921-934.
 22. Coleman SR, Carraway JH. Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2002;110(7):1731-1744.
 23. Rigotti G, Marchi A, Galie M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(5):1409-1422.
 24. Sivak WN, Rubin JP. Reconstructive fat grafting. *Plast Surg E-b Vol 1 Princ.* 2017:326.
 25. Haque WA, Garg A. Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin Lab Med.* 2004;24(1):217-234.
 26. Niemelä S-M, Miettinen S, Konttinen Y, et al. Fat tissue: views on reconstruction and exploitation. *J Craniofac Surg.* 2007;18(2):325-335.
 27. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):847-853.

28. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 2007;48(6):1253-1262.
29. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, et al. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology.* 2005;146(12):5631-5636.
30. Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(3):663.
31. Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Mesenchymal stem cells-basics Clin Appl I.* 2012:59-71.
32. Rubin JP, Marra KG. Soft tissue reconstruction. In: *Adipose-Derived Stem Cells.* Springer; 2011:395-400.
33. Brayfield C, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells for soft tissue regeneration. *Handchirurgie· Mikrochirurgie· Plast Chir.* 2010;42(02):124-128.
34. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytom Part A J Int Soc Adv Cytom.* 2010;77(1):22-30.
35. Minteer DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clin Plast Surg.* 2015;42(2):169-179.
36. Bliley JM, Grybowski D. Nomenclature of the Stromal Vascular Fraction. In: Coleman SR, Mazzola RF, eds. *Fat Injection: From Filling to Regeneration.* second. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2017.
37. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic Surg.* 2008;34(9):1178-1185.
38. 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.* 2020;44(4):1258-1265.
39. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-3382.

40. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3S):121S-128S.
41. Gutowski KA, Force AFGT. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(1):272-280.
42. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 2020;44(4):1268-1272.
43. 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):378-386.
44. Shiffman MA, Mirrafati S. Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatologic Surg.* 2001;27(9):819-826.
45. Lee JH, Kirkham JC, McCormack MC, Nicholls AM, Randolph MA, Austen Jr WG. The effect of pressure and shear on autologous fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(5):1125-1136.
46. Fisher C, Grahovac TL, Schafer ME, Shippert RD, Marra KG, Rubin JP. Comparison of harvest and processing techniques for fat grafting and adipose stem cell isolation. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(2):351-361.
47. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, 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):1033-1041.
48. Özsoy Z, Kul Z, Bilir A. The role of cannula diameter in improved adipocyte viability: a quantitative analysis. *Aesthetic Surg J.* 2006;26(3):287-289.
49. Pu LLQ. Mechanisms of fat graft survival. *Ann Plast Surg.* 2016;77:S84-S86.
50. Peer LA. Cell survival theory versus replacement theory. *Plast Reconstr Surg.* 1955;16(3):161-168.
51. Carpaneda CA, Ribeiro MT. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic Plast Surg.* 1994;18(1):17-19.
52. Zhao J, Yi C, Li 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):398e-406e.

53. Suga H, Eto H, Aoi N, et al. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126(6):1911-1923.
54. Eto H, Kato H, Suga H, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(5):1081-1092.
55. Eto H, Suga H, Aoi N, et al. Adipose injury-associated factors activate adipose stem/stromal cells, induce neoangiogenesis, and mitigate hypoxia in ischemic tissues. *Am J Pathol.* 2011;178(5):2322.
56. Kato H, Mineda K, Eto H, et al. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3 months. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(3):303e-313e.
57. Yoshimura K, Eto H, Kato H, Doi K, Aoi N. In vivo manipulation of stem cells for adipose tissue repair/reconstruction. *Regen Med.* 2011;6(6s):33-41.
58. Mineda K, Kuno S, Kato H, et al. Chronic inflammation and progressive calcification as a result of fat necrosis: the worst outcome in fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(5):1064-1072.
59. Doi K, Ogata F, Eto H. Differential contributions of graft-and host-derived cells in tissue regeneration/remodeling after fat grafting. *Plast Reconstr Surg.*
60. Yoshimura K. THE PHYSIOLOGY OF INJURED, OBESE, GRAFTED, AND DYING FAT. In: SR Coleman RM, ed. *FAT INJECTION FROM FILLING TO REGENERATION.* second. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2017:167-176.
61. Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell.* 2009;5(1):17-26.
62. Baek RM, Park SO, Jeong EC, et al. The effect of botulinum toxin A on fat graft survival. *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36(3):680-686. doi:10.1007/s00266-011-9864-z
63. Shi N, Su Y, Guo S, Zhang Z, Qiu L, Yi C. Improving the retention rate of fat grafts in recipient areas via botulinum toxin a treatment. *Aesthetic Surg J.* 2019;39(12):1436-1444. doi:10.1093/asj/sjz073
64. Wu M, Li Y, Wang Z, et al. Botulinum Toxin A Improves Supramuscular Fat Graft Retention by Enhancing Angiogenesis and Adipogenesis. *Dermatologic Surg.* 2020;46(5):646-652. doi:10.1097/DSS.0000000000002106

65. Suga H, Eto H, Inoue K, et al. Cellular and molecular features of lipoma tissue: comparison with normal adipose tissue. *Br J Dermatol.* 2009;161(4):819-825.
66. Mashiko T, Yoshimura K. How does fat survive and remodel after grafting? *Clin Plast Surg.* 2015;42(2):181-190. doi:10.1016/j.cps.2014.12.008
67. Sutherland FCW, Smit MJ, Herbst L, et al. Highly specific and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 3desmethylthiocolchicine in human plasma as analyte for the assessment of bioequivalence after oral administration of thiocolchicoside. *J Chromatogr A.* 2002;949(1-2):71-77.
68. Trellu M, Filali-Ansary A, Françon D, et al. New metabolic and pharmacokinetic characteristics of thiocolchicoside and its active metabolite in healthy humans. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18(4):493-501.
69. Reuter S, Gupta SC, Phromnoi K, Aggarwal BB. Thiocolchicoside suppresses osteoclastogenesis induced by RANKL and cancer cells through inhibition of inflammatory pathways: a new use for an old drug. *Br J Pharmacol.* 2012;165(7):2127-2139.
70. Balduini W, Cimino M, Depoortere H, Cattabeni F. Characterization of [3H] thiocolchicoside binding sites in rat spinal cord and cerebral cortex. *Eur J Pharmacol.* 1999;376(1-2):149-157.
71. Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Depoortere H, Cattabeni F, Cimino M. Autoradiographic localization of [3H] thiocolchicoside binding sites in the rat brain and spinal cord. *Neuropharmacology.* 2001;40(8):1044-1049.
72. Cimino M, Marini P, Cattabeni F. Interaction of thiocolchicoside with [3H] strychnine binding sites in rat spinal cord and brainstem. *Eur J Pharmacol.* 1996;318(1):201204.
73. Biziere K. Affinity of thiocolchicoside and thiocolchicoside analogues for the postsynaptic GABA receptor site. 1981.
74. Reuter S, Prasad S, Phromnoi K, et al. Thiocolchicoside exhibits anticancer effects through downregulation of NF- κ B pathway and its regulated gene products linked to inflammation and cancer. *Cancer Prev Res.* 2010;3(11):1462-1472.
75. State M, State RM, Iii T. Annex III Amendments to relevant sections of the summary of product characteristics and package leaflets. 2001;(May):45-48.

76. Weinling E, Sandouk P, Debray M, Scherrmann JM. Single-and repeated-dose pharmacokinetics of intramuscular thiocolchicoside in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1999;37(10):503-509.
77. De Vries RBM, Hooijmans CR, Langendam MW, et al. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evidence-based Preclin Med.* 2015;2(1):1-9.
78. Klopfleisch R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology-a systematic review. *BMC Vet Res.* 2013;9(1):1-15.
79. Boyce RG, Nuss DW, Kluka EA. The use of autogenous fat, fascia, and nonvascularized muscle grafts in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(1):39-68.
80. Matsudo PKR, Toledo LS. Experience of injected fat grafting. *Aesthetic Plast Surg.* 1988;12(1):35-38.
81. 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):391-395.
82. Jackson IT, Simman R, Tholen R, DiNick VD. A successful long-term method of fat grafting: Recontouring of a large subcutaneous postradiation thigh defect with autologous fat transplantation. *Aesthetic Plast Surg.* 2001;25(3):165-169.
83. Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ. Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(2):761-765.
84. Sezgin B, Ozmen S, Bulam H, et al. Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2014;67(5):712-720.
85. Lee JW, Han YS, Kim SR, Kim HK, Kim H, Park JH. A rabbit model of fat graft recipient site preconditioning using external negative pressure. *Arch Plast Surg.* 2015;42(2):150.
86. Sezgin B, Özmen S. Fat grafting to the face with adjunctive microneedling: a simple technique with high patient satisfaction. *Turkish J Med Sci.* 2018;48(3):592-601.

87. Fontdevila J, Guisantes E, Martínez E, Prades E, Berenguer J. Double-blind clinical trial to compare autologous fat grafts versus autologous fat grafts with PDGF: no effect of PDGF. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134(2):219e-230e.
88. Seyhan N, Alhan D, Ural AU, Gunal A, Avunduk MC, Savaci N. The effect of combined use of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on fat graft survival. *Ann Plast Surg*. 2015;74(5):615-620.
89. Jiang A, Li M, Duan W, Dong Y, Wang Y. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF. *Sci World J*. 2015;2015.
90. 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):140-149.
91. Topcu A, Aydin OE, Ünlü M, Barutcu A, Atabey A. Increasing the viability of fat grafts by vascular endothelial growth factor. *Arch Facial Plast Surg*. 2012;14(4):270-276.
92. Park B, Kong JS, Kang S, Kim YW. The effect of epidermal growth factor on autogenous fat graft. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(5):738-744. doi:10.1007/s00266011-9679-y
93. Kuramochi D, Unoki H, Bujo H, et al. Matrix metalloproteinase 2 improves the transplanted adipocyte survival in mice. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(10):752-759.
94. Medina III MA, Nguyen JT, Kirkham JC, et al. Polymer therapy: a novel treatment to improve fat graft viability. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2270-2282.
95. Temiz G, Sirinoglu H, Yesiloglu N, Filinte D, Kaçmaz C. Effects of deferoxamine on fat graft survival. *Facial Plast Surg*. 2016;32(04):438-443.
96. Kakagia D, Pallua N. Autologous fat grafting: in search of the optimal technique. *Surg Innov*. 2014;21(3):327-336.
97. Okyay MF, Kömürcü H, Bağhaki S, Demiröz A, Aydın Ö, Arslan H. Effects of Insulin, Metoprolol and Deferoxamine on Fat Graft Survival. *Aesthetic Plast Surg*. 2019;43(3):845-852. doi:10.1007/s00266-019-01363-z
98. 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.

99. Yu N-Z, Huang J-Z, Zhang H, et al. A systemic review of autologous fat grafting survival rate and related severe complications. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(09):1245-1251.
100. Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, et al. Increased free fat-graft survival with the longterm, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-I, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(5):1712-1720.
101. 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):1202-1208.
102. Livaoglu M, Buruk CK, Uraloglu M, et al. Effects of lidocaine plus epinephrine and prilocaine on autologous fat graft survival. *J Craniofac Surg*. 2012;23(4):1015-1018.
103. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope*. 2000;110(8):1333-1338.
104. Soares MA, Ezeamuzie OC, Ham MJ, 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):488-499.
105. Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . *Expert Rev Mol Med*. 2003;5(8):1-22.
106. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(23):12729-12734.
107. Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, et al. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ER α): a potential role for estrogen receptor beta (ER β). *Horm Metab Res*. 2002;34(11/12):758-763.
108. Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr J*. 2014:EJ14-0262.
109. 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):1-15.
110. Luo S, Hao L, Li X, et al. Adipose tissue-derived stem cells treated with estradiol enhance survival of autologous fat transplants. *Tohoku J Exp Med*. 2013;231(2):101-110.

111. Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ. Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *J Diabetes Res.* 2015;2015.
112. Zhou J, Lu P, Ren 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):326-343.
113. Kato H, Araki J, Doi K, et al. Normobaric hyperoxygenation enhances initial survival, regeneration, and final retention in fat grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(5):951-959.
114. Okyay MF, Kömürçü H, Bağhaki S, Demiröz A, Aydın Ö, Arslan H. Effects of insulin, metoprolol and deferoxamine on fat graft survival. *Aesthetic Plast Surg.* 2019;43(3):845-852.
115. El Tal AK, Abrou AE, Stiff MA, Mehregan DA. Immunostaining in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatologic Surg.* 2010;36(3):275-290.
116. Schimming TT, Grabellus F, Roner M, et al. pHH3 immunostaining improves interobserver agreement of mitotic index in thin melanomas. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(3):266-269.
117. Hao X, Zhang T, Yang Y, et al. Morphological features of cell death and tissue remodeling of fat grafts. *Ann Plast Surg.* 2015;74(6):722-727.
118. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2347-2355.
119. Sunaga A, Sugawara Y, Katsuragi-Tomioka Y, Kobayashi E. The fate of nonvascularized fat grafts: Histological and bioluminescent study. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2013;1(6).
120. Zanata F, Bowles A, Frazier T, et al. Effect of cryopreservation on human adipose tissue and isolated stromal vascular fraction cells: in vitro and in vivo analyses. *Plast Reconstr Surg.* 2018;141(2):232e-243e.
121. Nangia-Makker P, Nakahara S, Hogan V, Raz A. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *J Bioenerg Biomembr.* 2007;39(1):79-84.
122. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2514-2523.

123. Umalkar AR, Bavaskar SR, Yewale PN. Thiocolchicoside as muscle relaxant: a review. *History*. 2011;8(9):11-12.
124. Ketenci A, Basat H, Esmaeilzadeh S. The efficacy of topical thiocolchicoside (Muscoril) in the treatment of acute cervical myofascial pain syndrome: a singleblind, randomized, prospective, phase IV clinical study. *Agri*. 2009;21(3):95-103.
125. Oh DS, Cheon YW, Jeon YR, Lew DH. Activated platelet-rich plasma improves fat graft survival in nude mice: a pilot study. *Dermatologic Surg*. 2011;37(5):619-625.
126. Yi X, Ogata N, Komada M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997;235(5):313-319.
127. Silvestre J-S, Théry C, Hamard G, et al. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med*. 2005;11(5):499-506.
128. Sinna R, Delay E, Garson S, Mojallal A. Scientific bases of fat transfer. Critical review of the literature. In: *Annales de Chirurgie Plastique et Esthétique*. Vol 51. ; 2005:223-230.