



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

**YUMUŞAK DOKU DEFEKTLERİNİN
REKONSTRÜKSİYONUNDA KÜLTÜRE
PREADİPOZİT VE ADİPOZİTLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI: İN VİVO ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

DR. H. BANU AKSOY

DANIŞMAN

Doç. Dr. Eray COPCU

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

**YUMUŞAK DOKU DEFEKTELERİNİN
REKONSTRÜKSİYONUNDA KÜLTÜRE
PREADİPOZİT VE ADİPOZİTLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI: İN VİVO ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

DR. H. BANU AKSOY

DANIŞMAN

Doç.Dr. Eray COPCU

AYDIN-2009

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF – 09007 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Plastik cerrahi eğitimim süresince bütün birikimini özveriyle aktaran ve gelişmemde büyük emeği olan, akademik kimliğini, bilimselliğini ve insan ilişkilerini örnek aldığım saygıdeğer hocam sayın Doç. Dr. Eray COPCU'ya,

Asistanlığım boyunca her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle eğitimime katkı sunan, daima sabır ve özveriyle bana yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nazan Şahin SİVRİOĞLU'na,

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç.Dr. Serhan SAKARYA ve sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU'na,

Altı yıl boyunca uyum içerisinde çalıştığım, sevgi, saygı ve anlayışın hakim olduğu bir çalışma ortamının oluşmasını sağlayan değerli dostum Dr Şule ÖZTAN'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım; Dr Bilkur BULUT'a, Dr A. Murat SONEL'e ve Dr Ender CEYLAN'a,

Bana her zaman destek olan aileme, eşim Faruk AKSOY ve biricik kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	S.I
İÇİNDEKİLER	S.II
TABLO	DİZİNİ
.....	S.V
ŞEKİL DİZİNİ	S.VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	S.VII
RESİMLER DİZİNİ	S.VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	S.1
2. GENEL BİLGİLER.....	S.3
2.1. Yağ Dokusu.....	S.3
2.1.1. Yağ dokusunun görevleri.....	S.4
2.1.2. Beyaz yağ dokusu.....	S.5
2.1.3. Kahverengi yağ dokusu.....	S.6
2.1.4. Adipositler.....	S.7
2.1.5. Preadipositler.....	S.8
2.2. Yumuşak Doku Defektleri ve Rekonstrüksiyonu.....	S.9
2.2.1. Dolgu Materyalleri.....	S.9
2.3. Otolog Yağ Grefti Uygulamaları.....	S.13
2.3.1. Yağ Grefti Uygulamalarının Tarihçesi.....	S.13
2.3.2. Yağ Grefti Kullanım Alanları.....	S.15
2.3.3. Yağ Greftlerinin Revaskülerizasyonu.....	S.16
2.3.4. Yağ Grefti Uygulamalarına Teknik Bakış	S.17
2.3.4.1. Donor Alan.....	S.17
2.3.4.2. Donor Alan Anestezisi.....	S.18
2.3.4.3. Yağın Alınması.....	S.18
2.3.4.4. Yağın Hazırlanması	S.18
2.3.4.5. Yağ Enjeksiyonu	S.19

2.3.4.6. Alıcı Saha.....	S.19
2.3.4.7. Yağın Dondurularak Saklanması.....	S.20
2.3.5. Yağ Grefti Uygulamalarının Komplikasyonları.....	S.20
2.4. Hücre Kültürü.....	S.21
2.4.1. Preadiposit ve Adiposit Hücre Kültürleri.....	S.23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	S.26
3.1. Birinci Aşama.....	S.26
3.1.1 Kültür Medyumlarının Hazırlanması.....	S.26
3.2. İkinci Aşama.....	S.28
3.3.1. Kültür Örneklerinin Elde Edilmesi.....	S.28
3.3. Üçüncü Aşama.....	S.29
3.3.1. Hücre İzolasyonu.....	S.29
3.3.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	S.30
3.3.3. Hücre İnokulasyonu.....	S.30
3.3.4. Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	S.30
3.4. Dördüncü Aşama.....	S.33
3.4.1. Hücre Süspansiyonlarının Enjeksiyonu.....	S.33
3.5. Beşinci Aşama.....	S.35
3.5.1. Enjeksiyon Bölgelerinin Değerlendirilmesi.....	S.35
3.6. Hacim Değerlendirmesi.....	S.36
3.7. Histopatolojik Değerlendirme.....	S.36
3.8. İstatistiksel Analizler.....	S.37
4. BULGULAR.....	S.38
4.1. Hacim Değerlendirmesi.....	S.38
4.1.1 Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarının Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması.....	S.38
4.1.2 Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması	S.40
4.1.3 Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Hacimlerinin Birbirleri ile Karşılaştırılması.....	S.42
4.2. Histopatolojik Değerlendirme.....	S.43

4.2.1. Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarının Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması.....	S.43
4.2.2. Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması.....	S.45
4.2.3. Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Birbirleri ile Karşılaştırılması.....	S.47
5. TARTIŞMA.....	S.51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	S.65
7. ÖZET	S.66
8. SUMMARY.....	S.68
9. KAYNAKLAR	S.70

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Histopatolojik Değerlendirme Skorlaması.....	S.36
Tablo II: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacimleri	S.38
Tablo III: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması.....	S.38
Tablo IV: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacimleri	S.40
Tablo V: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması.....	S.40
Tablo VI: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değerleri.....	S.42
Tablo VII: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değerlerinin Birbirleri ile Karşılaştırılması.....	S.42
Tablo VIII: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorları.....	S.44
Tablo IX: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması	S.44
Tablo X: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorları	S.46
Tablo XI: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması	S.46
Tablo XII: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorları	S.48

Tablo XIII: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması	S.48
---	-------------

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Yağ dokusu kan akımının düzenlenmesi ve yağ hücreleri arası etkileşim	S.4
Şekil 2: Adipoz doku gelişimi ve diferensiasyonu için anjiogenezis ve adipogenezis gelişiminin şematik gösterimi.....	S.6
Şekil 3: Beyaz ve kahverengi yağ dokusu hücreleri arasındaki ilişki.....	S.7
Şekil 4: Yağ dokusu hücreleri diferensiasyon basamakları.....	S.8
Şekil 5: Yağ grefti uygulamalarının tarihçesi.....	S.15
Şekil 6: İn vivo ortamdaki hücre tipleri ve in vitro ortamdaki hücre diferensiasyon basamakları arasındaki ilişki.....	S.25
Şekil 7: Kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ dokularının hacim değişikliklerinin grafikte gösterilmesi.....	S.39
Şekil 8: Kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ dokularının hacim değişikliklerinin grafikte gösterilmesi.....	S.41
Şekil 9: Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ doku hacim değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasının grafikte gösterilmesi	S.43
Şekil 10: Kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının grafikte karşılaştırılması.....	S.44
Şekil 11: Kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının grafikte karşılaştırılması.....	S.46
Şekil 12: Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ doku örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının karşılaştırılmasının grafikte gösterilmesi	S.49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HIV: Human Insufficieny Virus; İnsan İmmün Yetmezlik Virusu

FAMİ: Fat Autograft Muscle Injection Technique; Kas içerisine otolog yağ enjeksiyonu tekniği

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetikasit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Media; Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

MEM: Minimum Eagle's Medium; Minimum Eagle Medyumu

FBS: Fetal Bovine (Sığır) Serumu

PBS: Phosphate Buffered Saline; Fosfat ile Tamponlanmış Salin

DMSO: Dimetil Sülfoksit

HEPES: 4-(2-Hidroksi Etil)-1-Piperazin Etan Sülfonik Asit

BSA: Bovine (Sığır) Serum Albumini

IBMX: İsobutil-metilksantin

PLGA: Poli Laktik Glikolik Asit

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Epididimal yağ yastıkçığından yağ doku örneğinin alınması.....	S.28
Resim 2: Kollajenaz ile sindirim sonrası elde edilen stromal-vasküler tabaka	S.29
Resim 3: Preadipositlerin kültürün 3. günündeki mikroskopik görünümü (x4 büyütme).....	S.31
Resim 4: Preadipositlerin kültürün 5. gününde mikroskopik görünümü (x4 büyütme).....	S.32
Resim 5: Diferensiasyon medyumuna uygulanmış preadipositlerin adipositlere doğru diferensiasyonunu gösteren granüler görünümde artış (x4 büyütmeye).....	S.32
Resim 6: Sağ ve sol skapular bölgedeki enjeksiyon alanlarının işaretlenmesi....	S.34
Resim 7: Enjeksiyon sonrası negatif basınç uygulaması	S.34
Resim 8: Preadiposit enjeksiyon grubundan eksize edilen yağ örneği	S.35
Resim 9: Kültüre preadiposit enjeksiyon grubunda saptanan yağ dokusu	S.39
Resim 10: Kültüre adiposit enjeksiyon grubunda saptanan yağ dokusu.....	S.41
Resim 11: Kültüre preadiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen normal görünümde yağ dokusunun mikroskopik görünümü (Hemotoksilen-eosin boyama, x40 büyütmeye).....	S.45
Resim 12: Kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ doku örneğinin mikroskopik değerlendirmesi: Normal görünümde yağ hücreleri çevresinde fibrotik alanlar görülmemektedir (Hemotoksilen-eosin boyama x40 büyütmeye).....	S.47
Resim 13: Kültüre preadiposit enjeksiyon bölgesinden elde edilen yağ dokusunun mikroskopik değerlendirmesi: Artmış vaskülerite görülmektedir (Hemotoksilen-eosin boyama x40 büyütmeye).....	S.49
Resim 14: Kültüre preadiposit enjeksiyon bölgesinden elde edilen yağ dokusunun mikroskopik değerlendirmesi: Mast hücre sayısında belirgin artış görülmektedir (Hemotoksilen-eosin boyama x100 büyütmeye).	S.50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Travma, konjenital deformiteler, tümör cerrahisi veya yaşlanma sonucu oluşan yumuşak doku defektleri nedeniyle pek çok hasta sorun yaşamaktadır. Bu defektlerin rekonstrüksiyonu plastik cerrahi bölümünde sık karşılaşılan, uğraştırıcı problemlerden birisidir. Çoğu vakada memnuniyetsizliğin sebebi; subkutanöz adipoz doku azlığı veya kaybıdır. Rekonstrüktif cerrahinin temel prensiplerinden birisi; eksik olan dokunun benzer özellikler taşıyan dokularla yerine konulmasıdır. Yumuşak dokuyu onarmaya yönelik; lokal ve serbest flepler, dermal yağ greftleri, sentetik materyaller ve serbest yağ doku greftlerinin kullanımı gibi olası yaklaşımların çoğu belirgin dezavantajlara sahiptir (1). Otolog doku yerine kullanılan sentetik materyallerle elde edilen sonuçlar kalıcı değildir ve kullanılan materyallerin çoğu; fibröz kapsül kontraksiyonu, alerjik reaksiyonlar, belirsiz sonuçlar, distorsiyon, yer değiştirme ve uzun dönemde rezorbsiyon gibi sınırlamalara sahiptir (2). Otolog yağ transferi, ideal yumuşak doku dolgu özelliklerinin çoğunu karşılamaktadır; doku uyumu mevcuttur, teratojenik ve karsinojenik olmayan ucuz ve kolay bir uygulamadır (3).

Yumuşak doku defektlerinin düzeltilmesinde otolog yağ kullanımı kabul görmüş bir teknik olsa da aktarılan yağın belirlenemeyen oranda absorpsiyonu sıklıkla tekrarlayan uygulamaları gerektirir (4). Yağ grefti uygulamalarının kısa ve uzun dönem sonuçları oldukça değişkendir (3). Literatürde bulunan farklı yağ elde etme, işleme ve enjeksiyon teknikleri ile ilgili raporlar birbiriyle uyumlu değildir (5). Serbest yağ greftleri ile elde edilen olumsuz sonuçlardan; matur yağ hücrelerinin iskemiye toleranslarının düşük olması ve greftlerin revaskülarizasyonunun yavaş gelişmesi sorumlu tutulmaktadır (6). Yapılan teknik modifikasyonlarla adipositlerin narin yapısı korunmaya, yağ hücrelerine güvenilir kan desteği sağlanmaya çalışılmıştır (7). Günümüzde yağ transplantasyon çalışmaları hücresel düzeye odaklanmaya başlamıştır.

Matur adipositler mekanik travmalara karşı daha hassastır ve farklılaşmaları tamamlandığında polifere olmazlar (6, 8). Preadipositler; çoğalma ve matür adipositlere farklılaşma özelliğine sahip öncü hücrelerdir. Bu hücreler travmaya daha dayanıklıdır, hipoksik koşullara toleranslıdır ve proliferatif aktiviteleri yüksektir (6). Preadipositlerin izolasyonu ve in vitro koşullarda kültüre edilmesi mümkündür. Hücreler otolog greft şeklinde tekrar implante veya enjekte edildiğinde yavaşça lipid yüklü adipositlere diferansiye olabilir ve alıcı sahanın yeterince kapillerize olmasını sağlayabilir (9, 10). Bu özellikleri nedeniyle transplant materyali olarak tercih edilmişlerdir. Fakat bazı çalışmalarda preadipositlerin in

vivo adipojenik dönüşümünün beklenen düzeyde olamayabileceği ve implantasyon öncesi hücrelerin adipositlere diferensiyasyon edilmesi gerektiği belirtilmiştir (11). İn vivo ortamda adipogenezis ve greft yaşayabilirliği multi faktöriyeldir ve preadipositlerin in vivo adipojenik dönüşümünün sağlanması en önemli sorunlardan birisi olarak görülmektedir (11). Bu nedenle adipoz doku oluşumunu ve kalıcılığını artırmak için kültür ortamında elde edilen adipositler de kullanılmaya başlanmıştır.

Çalışmamızda; rat modelinde, kültür ortamında çoğaltılan preadipositlerin ve adipositlerin otolog transplantasyonu sağlanarak, in vivo adipoz doku oluşturulması hedeflenmiştir. Bu iki hücre tipinin otolog transferi sonrası histolojik özellikleri, adipoz doku oluşumuna ve kalıcı volüm elde edilmesine katkıları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmadaki amacımız; yumuşak doku defektlerinin onarımı için en ideal hücre kaynağının ortaya çıkartılmasıdır. Hangi hücre tipinin adipoz doku oluşumuna daha fazla katkıda bulunacağı ve kalıcılığının daha uzun süreli olacağı literatürde bulunmamakta ve araştırmamızın temelini oluşturmaktadır. Araştırmamız prelinik çalışma niteliğinde olup, elde edilecek sonuçlar klinik çalışmalar için temel oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

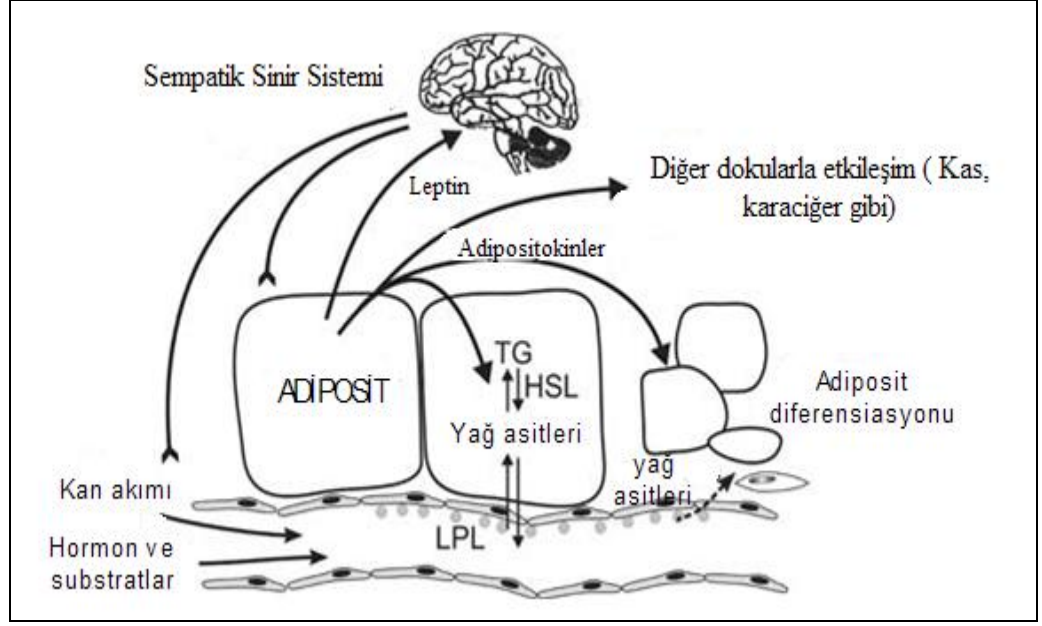
2.1. Yağ Dokusu

Yağ dokusu; vücudun her bölgesinde bulunma ve eşsiz gelişim kapasitesiyle, insan anatomi ve fizyolojisinde çok önemli bir role sahiptir (12). Geçmişte yağ dokusu, cansız ve izole bir doku olarak ele alınsa da, günümüzde yağ dokusunun iyi vaskülarize, yüksek metabolik aktivitesi olan bir doku olduğu bilinmektedir (13). Yağ dokusu; diğer organları destekleyip izole etmenin yanında, tanımlanmış diğer fonksiyonları ile artık ayrı bir organ olarak ele alınmaktadır. Yağ hücreleri pasif hücreler olmayıp, günlük enerji alımına bağlı olarak sürekli hacim değişikliği göstermekte, çeşitli sitokin ve hormonları sentezlemektedir. Yağ dokusu; hücre sayısı ve büyüklüğü bakımından, yaşam boyu sürekli hacim değişikliği gösteren bir dokudur (14).

Yağ dokusu; ince membranlı, lipid dolu yağ hücrelerinden oluşur ve fibröz ağ ile kuşatılmıştır. Hücrelerin boyutu 10-200 mikrometre arasında değişmektedir (14). Destekleyici liflerin yokluğunda hücreler kollaps eğilimindedir. Adipositlerin etrafı fibroblast, immün sistem hücreleri, kollojen lifler ve kan damarlarından oluşan stromal vasküler hücrelerle çevrilidir (3). Ekstraselüler matriks adipositleri birbirine bağlar. Konnektif dokunun ilave destek ağı, yağ lobüllerini oluşturur.

Yağ dokusunun görevlerini yerine getirebilmesi yeterli kan desteği ile mümkündür (12). Yağ dokusu ve yağ hücreleri kan damarları ile yakın ilişki içerisindedir ve iyi gelişmiş bir kapiller ağa sahiptir (14). Yağ depolarının artışı ve yeni adipositlerin farklılaşması ile yeni kan damarları ihtiyacı ortaya çıkar (15). Yağ dokusunda anjiogenezisin doku içerisinde üretilen faktörlerle düzenlendiği düşünülmektedir (15). Leptin bu faktörlerden en önemlisidir (15). Matür adipoz dokunun eşsiz bir anjiogenik potansiyele sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12).

Adipoz doku kan akımı her zaman sabit değildir ve yağ depoları arasında ve farklı metabolik durumlar arasında değişkenlik göstermektedir (12). Yağ dokusu kan akımı düzenlenmesi oldukça karışıktır ve pek çok mekanizma eş zamanlı etkileşerek kan akımını kontrol etmektedir (12). Bu çoklu kontrol mekanizması aynı zamanda enerji dengesini de düzenlemektedir (12). Kan akımı düzenlenmesinde sempatik sinir sistemi etkilidir ve adrenerjik etki baskındır (15). Lipid metabolizmasında rol oynayan lokal etkili hormon ve substrat konsantrasyonları da kan akımı düzenlenmesinde etkilidir (Şekil 1) (12).



Şekil 1: Yağ dokusu kan akımının düzenlenmesi ve yağ hücreleri arası etkileşim

2.1.1. Yağ Dokusunun Görevleri

Yağ dokusunun ana görevleri şöyle sıralanabilir:

- 1) Metabolizma fazlası enerjiyi trigliseritlere çevirerek depolamak,
- 2) İhtiyaç durumunda depo trigliseritleri yağ asitlerine dönüştürerek kana vermek,
- 3) Hormonal ve nöral yollarla metabolik kontrolü sağlamak, iştah düzenlenmesini kontrol etmek,
- 4) Endokrin organ gibi hareket etmek,
- 5) Diğer organları desteklemek,
- 6) İmmünolojik yanıt oluşturulmasında rol oynayan faktörler sentezlemek,
- 7) Vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan, renin-anjiyotensin sistemi komponentleri gibi, proteinleri sentezlemek,
- 8) Yağda çözünen vitaminleri depolamak,
- 9) Isı kaybına karşı koruyucu bir tabaka oluşturmak (14, 16, 17).

Yağ dokusunun temel görevlerinden birisi enerji depolamaktır. Yağ dokusu insanlarda serbest yağ asitlerinin ana kaynağıdır. Negatif enerji dengesi durumlarında, adipositler trigliserid depolarını kaybeder (15). Yağ hücreleri enerji depolama ve üretme görevlerini yerine getirirken pek çok sistem tarafından kontrol edilmektedir.

Yağ dokusu günümüzde, enerji dengesini ve kendi metabolizmasını düzenleyen önemli molekülleri sentezleyip kan akımına verme kapasitesine sahip, endokrin bir organ

olarak ele alınmaktadır (12). Adipositler lipoprotein lipaz sentez ve sekresyonunda önemli rol oynamaktadır. Yağ dokusu seks steroid hormonlarının sentez ve aktifleşmesinde önemli görevler üstlenmektedir. Adipositler endokrin bezlerden salgılanan hormonlara yanıt oluşturmanın yanında, diğer hücreler tarafından tanınan ve kullanılan, peptid ve peptid olmayan; adenozin (antilipolitik ve vazodilatatör etkili), anjiotensin II (vazokonstriktör) ve prostoglandinler gibi, faktörler sentezleme ve salgılama yeteneğindedir (18).

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

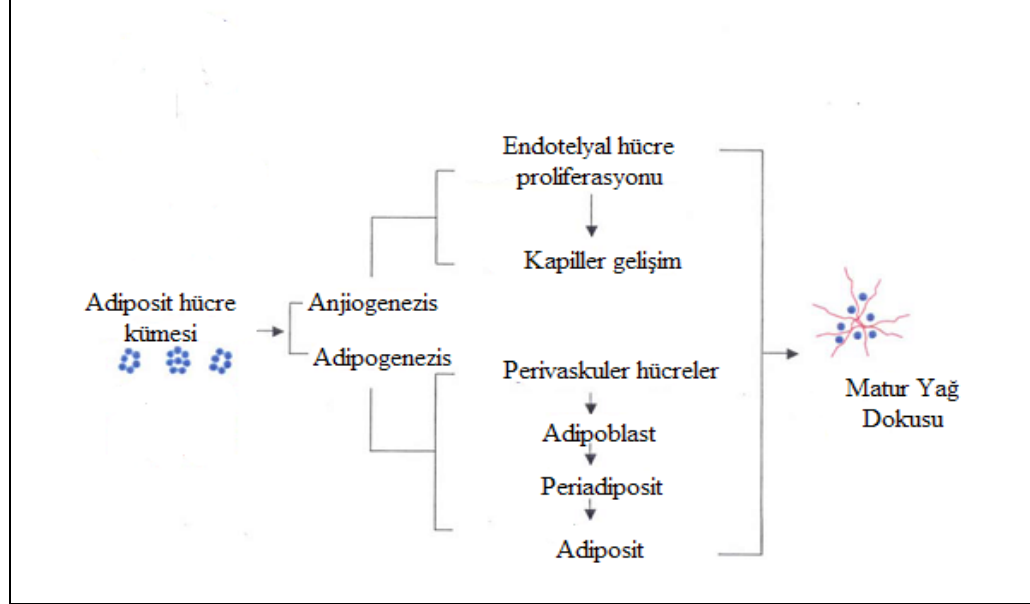
Memelilerin çoğunda birbirlerinden renk, dağılım, damarlanma ve metabolik etkinlik açısından farklılık gösteren iki farklı yağ dokusu mevcuttur.

2.1.2. Beyaz Yağ Dokusu

İnsanlarda beyaz yağ dokusu gelişimi gebeliğin ikinci trimesterinde başlamaktadır (18). Yoğun mezenşimal hücre kitleleri, vasküler yapıların çevresinde yoğunlaşır ve sonrasında primitif yağ hücre kümeleri oluşmaya başlar (12). Vasküleriteye ait moleküler işaretler adipositler isimlendirilmeden önce ortaya çıkmaktadır (12). Yani anjiogenez adipoz doku koordinasyonda önemli rol oynamaktadır (Şekil 2) . Sonrasında yağ hücre kümelerinin boyutunda artış olurken, onu çevreleyen mezenşimal doku yoğunlaşarak septaları oluşturur. Adipoz doku gelişimi; adiposit hücre boyutunda artışı ve öncü hücrelerden yeni adipositlerin oluşturulmasını içermektedir (16). Yaşamın ilk iki yılında yağ hücre sayısında ve boyutunda artış olmaktadır (14). Puberteye kadar yağ hücre sayısı çoğalarak artmaya devam eder. Genel olarak yağ hücre sayısının adölesan gelişim tamamlandıktan sonra sabit kaldığı varsayılmaktadır. Ergenlikten itibaren hücrelerde mitoz görülmez, hücreler sayıca artmaz sadece hücre büyüklüğü değişir (14). Yaşam boyu yağ hücre prekürsörlerinden yeni yağ hücresi kazanma potansiyeli araştırılmaktadır (16).

Beyaz yağ dokusu visseral yağ ve subkutanöz yağ şeklinde iki kısımda incelenebilir (14). İnsanlarda cinsiyet ve vücut bölgesine bağlı olarak yağ dağılımında farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bu durumun, hücre düzeyinde farklı hiperplastik gelişim süreçleri sonucu oluştuğu düşünülmektedir (18). Adipoz depoların lokalizasyonuna, diyet şekline ve çevresel koşullara bağlı olarak adiposit hacminde artış olabilmektedir. Hipofiz hormonları, matur yağ hücrelerinin oluşumunu direkt ve indirekt yollarla düzenlemektedir

(12). İnsanlarda büyüme hormonu eksikliğinde subkutanöz yağ dokusunda hipoplazi görülmektedir (12, 18). İnsülin hormonu ve glukokortikoidler, hipertrofik etkileri ile adipoz doku kütlelerini artırmakta ve adipoz doku öncü hücrelerinin terminal diferensiasyonunu kontrol etmektedir (18).



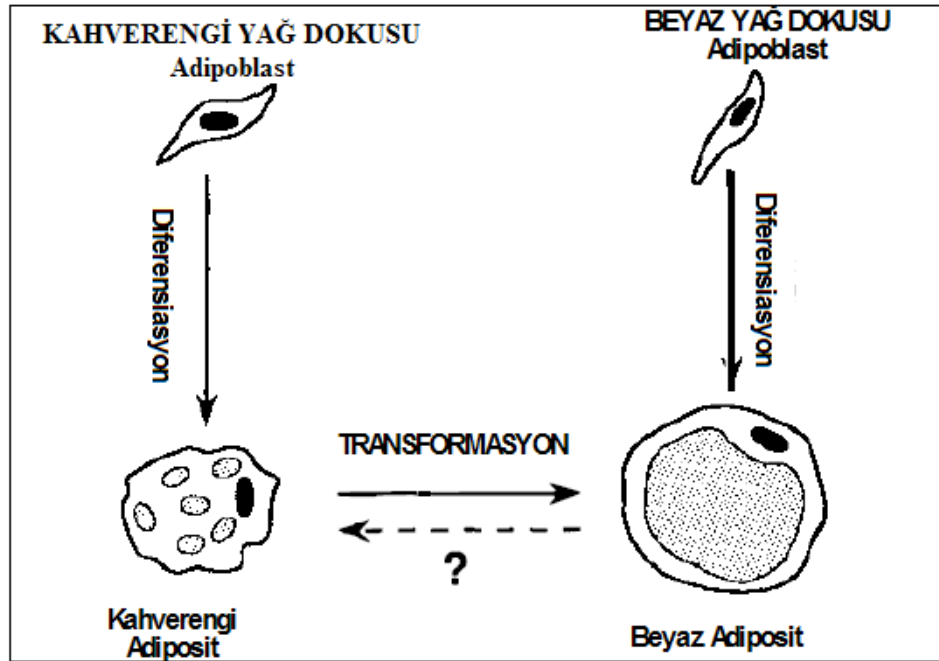
Şekil 2: Adipoz doku gelişimi ve diferensiasyonu için anjiogenezis ve adipogenezis gelişiminin şematik gösterimi

2.1.3. Kahverengi Yağ Dokusu

Kahverengi yağ dokusunun rengi koyu sarıdan kahverengiye kadar değişebilmektedir. Dokunun kahverengi rengi içerdiği fazla kan damarlarından, çok fazla miktarda bulunan sitokromlardan ve mitokondrilerden ileri gelmektedir. Kahverengi yağ dokusu fonksiyonel açıdan ve anatomik olarak beyaz yağ dokusundan farklıdır (12). Memelilerde kahverengi yağ dokusu fetal hayatta gelişmekte ve doğumda saptanmaktadır. Kahverengi yağ dokusunun prenatal gelişimi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Gebeliğin son trimesterinde geliştiği düşünülmektedir. Diferensiasyon aşamasının, intersitisyel hücrelerin az diferansiye kahverengi yağ hücrelerine dönüşümü ile başladığı ve sonrasında kahverengi adipositlere farklılaşma şeklinde olduğu düşünülmektedir (18). Kahverengi yağ doku proliferasyonu ve diferensiasyonu beta adrenerjik mediatörler tarafından düzenlenmektedir. Hücreleri, beyaz yağ dokusunda bulunanlardan daha küçük olup, kesitlerde poligonal görülmektedir. Sitoplazmaları; hacimce beyaz yağ dokusundaki yağ hücrelerinden daha fazla

olup, çeşitli boyutlarda pek çok yağ damlası içerir. Kahverengi yağ hücreleri içerisinde çok sayıda mitokondri mevcuttur ve multiloküler görünüme sahiptirler. Kahverengi yağ dokusunun termoregülasyonda görevli olduğu düşünülmektedir. Kahverengi yağ dokusu; böbrekler, adrenal bez, perikardium ve boyun bölgesindeki geniş damarların çevresinde bulunur ve insanda toplam vücut ağırlığının %2'sinden daha azını oluşturmaktadır (12).

Kahverengi yağ dokusu ile beyaz yağ dokusu arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Farklı prekürsör hücreler olabileceği gibi tek bir adipoblastın farklı kahverengi ve beyaz preadipositlere dönüşebileceği de düşünülmektedir (18). Kahverengi adipositlerin beyaz adipositlere olası transformasyonu da düşünülmektedir (Şekil 3)(18).

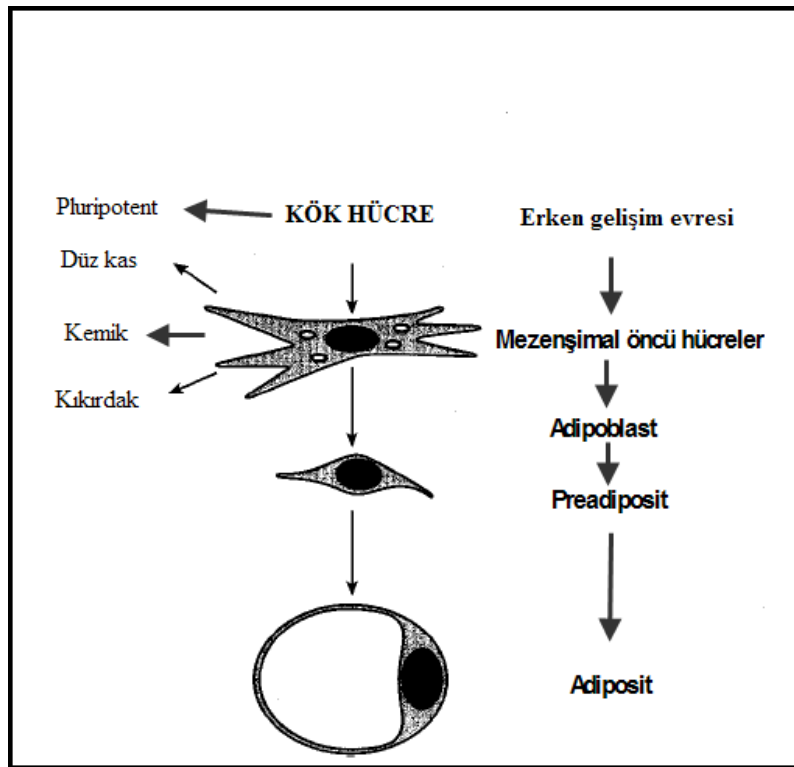


Şekil 3 : Beyaz ve kahverengi yağ dokusu hücreleri arasındaki ilişki

2.1.4. Adipositler

Adipositler; yağ dokusundaki toplam hücre sayısının 1/3-2/3'ünü oluşturmaktadır (19). Adipositlerin çevresinde; kan hücreleri, endotelial hücreler, perisitler, çeşitli derecede diferansiye adipoz öncü hücreler ve fibroblastlar bulunmaktadır (18, 20). Yağ hücrelerinde yağ lipid damlacıkları trigliserit olarak depolanır ve bu damlacıklar hücrenin yaklaşık % 90'mı oluşturur, geri kalan bölümü ise diğer hücre organelleri oluşturmaktadır (14). Adipositlerin boyutları lipid depolanması veya mobilizasyonuna göre artıp azalabilmektedir (12). Adipoz doku öncü hücreleri; daha önceleri interstisyel hücreler, lipid yüklü olmayan

mezenşimal hücreler veya farklılaşmamış mezenşimal hücreler olarak da isimlendirilmiştir (18). Adipoz doku öncü hücreleri; multipotent kök hücrelerden köken almaktadır. Bu hücreler adipositler, kondrositler, osteoblastlar ve miyositler gibi mezodermal hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir. Adipoblastlar, adipojenik seriye ait erken evre unipotent hücrelerdir (20). Adipoz hücre diferensiasyonu; adipoblastların preadipoz hücre olan preadipositlere dönüşümü ile başlamakta ve sonrasında immatür adipoz hücre ve matür adipoz hücre şeklinde devam etmektedir. Şekil 4’de yağ dokusu hücrelerinin diferensiasyon basamakları özetlenmiştir.



Şekil 4: Yağ dokusu hücreleri diferensiasyon basamakları

2.1.5. Preadipositler

Preadipositler; yağ doku stromal-vasküler bölümünde bulunan fibroblast benzeri hücrelerdir ve matür adipositleri oluşturmak üzere farklılaşabilirler ve bu kapasiteleri yaşam boyu devam etmektedir (15). Preadipositler yaşamın her döneminde prolifer olma yeteneğine sahiptirler (21). Preadipositlerin gelişim ve farklılaşması hücreler arası ve ekstraselüler çevre ile ilişkilerle kontrol edilmektedir (16). Adiposit diferensiasyonunu ve gelişim sürecini, pozitif ve negatif anlamda etkileyen pek çok hormon ve büyüme faktörü tanımlanmıştır (8,

16). Son zamanlarda Preadiposit faktör-1 (Pref-1) adı verilen yeni bir faktör tanımlanmıştır (8, 20). Bu faktör sadece çoğalan preadipositlerde tespit edildiğinden, hücreleri farklılaşmamış proliferasyon evresinde korumakla sorumlu olduğu düşünülmektedir (8). Adipositlere farklılaşmayı sağlayan sinyaller beslenme durumu ile de ilişkilidir (15).

Preadipositler adipositlere farklılaştıkça; fibroblastlara morfolojik benzerliklerini kaybeder, kollojen tip I ve III ifadesi azalır ve kollojen tip 4, laminin, entaktin ve glikozaminoglikanların üretimi artar (20, 22).

Yağ doku kökenli öncü hücrelerin sadece matür adipositlere farklılaşmadığı; osteoblastlar, kondrositler, myoblastlar ve nöron benzeri hücreleri içeren çok çeşitli hücrelere farklılaşma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (23).

2.2. Yumuşak Doku Defektleri ve Rekonstrüksiyonu

Yumuşak doku defekti terimi; tümör eksizyonu, konjenital malformasyon veya travma gibi durumlara bağlı oluşan, önemli kısmı subkutanöz yağ doku kaybını içeren, kontur defektleri ile sonuçlanan bir dizi fiziksel eksikliği kapsar (24). Bu defektler kozmetik sorunlara yol açabilir, emosyonel durumu etkiler ve fonksiyonu bozabilir. Bu defektlerin rekonstrüksiyonu plastik cerrahinin temel görevlerinden birisidir. Günümüze kadar bu defektlerin rekonstrüksiyonu için pek çok enjekte edilebilir veya implante edilebilir, kalıcı veya resorbe olabilen, otolog veya otolog olmayan pek çok materyal kullanılmıştır.

2.2.1. Dolgu Materyalleri

Yumuşak doku defektlerinin rekonstrüksiyonu zordur çünkü bu defektlerin düzeltilmesinde kullanılacak ideal materyal hala bulunamamıştır. Son zamanlarda yumuşak doku defektlerinin rekonstrüksiyonunda daha az invazif metodların kullanımı yaygınlaşmış ve enjekte edilebilir materyaller daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Bir ürün veya bir aracın yumuşak doku defektlerinde genel olarak kullanılabilmesi için bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir :

- Doku uyumluluğu olmalı,
- Kolay bulunabilir olmalı,
- Karsinojenik ve teratojenik olmamalı,
- Ucuz olmalı,
- Uzun etkili olmalı,

- İmplantasyon sonrası yer değiştirmemeli,
- Doğal bir görünüm oluşturulmalı,
- İmmünolojik reaksiyonlara yol amamalı,
- Alıcı sahaya uygulaması kolay olmalı,
- Yaygın ve olası yanlış veya gelişigüzel kullanımı önemli morbidite yaratmamalı,
- Tutarlı ve yinelenebilir sonuçlar oluşturmalı,
- İstenilen sonucu minimum istenmeyen yan etki ile oluşturabilmelidir (7, 22, 25-27).

Yumuşak doku defektlerinin düzeltilmesinde pek çok materyal kullanılmıştır. Fakat bu kriterlerin tümünü karşılayan implant bulunmamaktadır. Bu materyallerin çoğunda kalıcı etki oluşturamama, yabancı cisim reaksiyonu, doğal olmayan görünüm ve olası hastalık geçişi gibi sorunlarla karşılaşılmaktadır (13). Ek olarak bu ürünlerin çoğu pahalıdır. Yine de pek çoğu verilen görevi yeterince yerine getirmekte, hastaları memnun etmekte ve mükemmel güvenlik profili sunmaktadır (26). Amaca yönelik mükemmel materyal araştırmaları sürmektedir.

Günümüzde yumuşak defektlerin onarımında lokal/rejyonel ve serbest mikrovaskuler flepler, dermal yağ greftleri, yağ greftleri ve farklı alloplastik ve allojenik ürünler kullanılmaktadır (28). Otolog dokular çeşitli avantajlara sahiptir ve ideal ürün özelliklerinin çoğunu karşılayabilmektedir. Dermis ve fasya gibi dokular geniş defektlerin düzeltilmesinde uzun süre kullanılmıştır. Fakat bu dokuların elde edilmesinde ilave insizyonlar gerekmekte ve ek skar oluşturulmaktadır. Bu rnler likid ve yarı likid ürünlerin esnekliğine sahip değildir (13).

Silikon gibi bazı materyaller geçmişte yaygın olarak kullanılmıştır. Silikon pek çok hastada istenilen estetik sonuca ulaşılmasını sağladığından yüksek kullanım potansiyeline sahip olmuş, bununla birlikte uygunsuz ve kötüye kullanımı da artış göstermiştir (26). Likid silikon, defekt alanına gerekenden az miktarda enjekte edilerek gelişecek yumuşak doku reaksiyonu ile ek hacim elde edilmeye çalışılmıştır. İstenilen etkiye ulaşılabilmesi için birden fazla uygulama gerekmektedir (27). Silikon uygulaması öncesi cilt testine gerek olmaması, etkisinin kalıcılığı, ucuz olması ve oda ısısında saklanabilmesi ürünün avantajlarıdır. Gelişen geç komplikasyonlar arasında kronik dem, lenfadenopati, skar gelişimi, cilt ülserasyonu, ciltte incelme ve renk değişikliği ve silikonoma bildirilmiştir (27). Sorunların gelişmesinde

temel sebep silikonun çok yüksek miktarlarda uygulanması ve diğer mineral yağlarla karıştırılarak uygulanmasıdır (27). Günümüzde silikon tercih edilen bir ürün değildir.

Geliştirildiğinde yaygın olarak kullanılan fakat klinik kullanımı giderek azalan ürünlerden birisi saflaştırılmış sığır kollojenidir. Zyderm I ve II ve Zyplast (Inamed, Santa Barbara, California) isminde üç ticari formu mevcuttur. Özellikle ince yüz çizgilerinin düzeltilmesinde yararlıdır. Sığır kollojeni enjeksiyon sonrası yabancı cisim olarak algılanmakta ve kollajenaz enzimi tarafından ayrıştırılmaktadır (29). En önemli dezavantajı etki süresinin kısa olmasıdır; 2-3 ay içerisinde tamamen rezorbe olmaktadır (25). Ayrıca sığır kaynaklı kollojen kullanıldığından, allerjik reaksiyon varlığını değerlendirmek için; kullanımdan bir ay önce iki hafta aralarla iki cilt testi yapılmalıdır. Lokal yan etkileri; eritem, ödem, kaşıntı ve ciltte renk değişikliğidir (25).

Sığır kaynaklı kollojen ile problemler yaşanması üzerine son dönemde insan kaynaklı kollojen kullanılmaya başlanmıştır. Cosmoderm ve Cosmoplast (Inamed, Santa Barbara, California); insan dermal fibroblast hücre dizisinin kültüre edilmesi ve bu hücrelerce üretilen doğal kollojenin izole edilip saflaştırılmasıyla elde edilir (25). Yüzeysel kırışıklık ve akne skarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Salin içerisinde çözünür durumda olduğundan ve salin rezorbe olacağından izlerin gerekenden bir miktar fazla düzeltilmesi gereklidir. Etkinlik süresi 3-6 aydır. Tedavi öncesi cilt testi gerekmez.

Hyaluridik asid, ekstraselüler matriksin komponentlerinden birisidir. Kollojenin aksine tüm hayvan türlerinde ve mikroorganizmalarda özdeştir ve bu özelliği nedeniyle immünolojik reaksiyon oluşturmaz. Su bağlama yeteneği ile cilt turgorunun sağlanmasına katkıda bulunur. Hyalen jel; yüksek moleküler ağırlıklı hyaluridik polimer moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla elde edilmiştir. Hyalaform jel (Biomatrix, Ridgefield, New Jersey) horoz ibiğinden elde edilen hyaluridik asitten üretilmektedir. Etki süresi 3-6 aydır (25).

Restylane (Q-Med AB, Uppsala, Sweden); streptokok bakteri kültürlerinden fermentasyon yoluyla elde edilen hyaluridik asit içermektedir. Fermente edilen materyal, glikozaminoglikan zincirlerin çapraz bağlanması ile stabilize edilir. Akışkan özelliği nedeniyle uygulaması kolaydır, kalıcılığı 6-12 aydır (30). Ödem, kızarıklık, morarma gibi lokal yan etkiler kollojen bazlı ürünlere göre daha sık gözlenir ve ürün daha pahalıdır.

Solid politetrafloroetilen (Gore-Tex; W.L. Gore and Associates, Flagstaff, Arizona); plastik cerrahide kullanılan ürünlerden birisidir. Çeşitli boyutlarda, tabaka, tüp ve parça formları mevcuttur. Ürünün enjekte edilebilir formu bulunmamaktadır, rijiddir ve doğal

olmayan görünüm oluşturabilir. Alıcı doku ile bütünleşmediğinden gerektiğinde kolaylıkla çıkartılabilir (31).

Yeni ürünlerden birisi olan Alloderm (Life Cell, Woodlands, Texas), insan dermisinden elde edilmektedir. Hücreden yoksun dermal matris hastanın fibroblastları ve endotel hücreleri için iskele görevi üstlenmektedir. Tabaka şeklinde olduğundan kullanım alanı sınırlıdır. İnsan kaynaklı olduğundan alıcı yatakta revaskulerize olmakta ve daha doğal bir görünüm oluşturmaktadır. Dezavantajı; pahalı oluşu, implantasyon için cerrahi insizyon gerektirmesi ve olası hastalık geçiş riskidir (29).

Cymetra (Life Cell, Branchberg, New Jersey), Alloderm'in küçük parçalara ayrılmasıyla elde edilen enjekte edilebilir hücreden yoksun dermal allogrefttir (32). Ürün toz halinde olduğundan enjeksiyon öncesi %1 Lidokain ile sulandırılmalıdır. Uygulama öncesi cilt testine gerek yoktur. Cymetra büyük partikül boyutuna sahip olduğundan enjeksiyonu daha ağrılıdır ve enjeksiyon alanında kontur düzensizliği ve ödem oluşabilir (25). Kalıcılık süresi 5-7 ay olarak bildirilmiştir (27).

Fascian (Fascian Biosystems, Beverly Hills, California); insan kadavrasından elde edilen fasya latadan hazırlanan, daha yoğun karakterde, enjekte edilebilir allogrefttir (33). Fascian partikülleri 0.25 mm, 0.5 mm ve 2.0 mm gibi değişik boyutlardadır ve enjeksiyon öncesi salin veya lidokain ile sulandırılması gerekir (27) Materyal subdermal olarak enjekte edilmelidir, daha yüzeysel enjeksiyonu enflamasyona ve düzensizliklere sebep olabilir (27). Fascian derin kırışıklıkların, skarların ve yağ atrofisinin düzeltilmesinde endikedir (34). Kalıcılığı 6-8 ay olarak bildirilmektedir (25).

Poly-L-laktik asid (Sculptra; Dermic Aesthetics, Berwyn, PA) laktik asid sentetik polimeridir. Günlük kullanımdaki pek çok sütür materyalinin üretildiği emilebilir plastik materyalden üretilmektedir. Dokuda çözünebilme, rezorbe olma ve doku uyumluluğu özellikleri mevcuttur. Skar ve kırışıklıkların tedavisi yanında HIV (Human Insufficiency Virus) hastalığı ile ilişkili fasial lipoatrofi tedavisinde kullanılabilir (27). Kalıcılığı 1-2 yıldır (25).

Yumuşak doku defektlerinde kullanılan materyallerin kalıcılığını artırmak için emilebilir ve emilemeyen komponentler enjekte edilebilir bileşimde biraraya getirilmeye çalışılmıştır (25). Radiesse (Bioform, Franksville, Wis); sentetik hidroksiapatit küresel partiküllerinin, su bazlı jel taşıyıcı ile karıştırılmasıyla elde edilmiş enjekte edilebilir bir implanttır (35). Kalsiyum hidroksiapatit bioseramik partikülleri yüksek dansitesi ve düşük

çözünürlüğü ile implantın kalıcılığını ve doku uyumunu sağlar (25). Taşıyıcı jel selüloz, gliserin ve sudan oluşmaktadır. Klinik etkilerinin kalıcılığı iki yıl olarak raporlanmıştır (25). Enjeksiyon öncesi cilt testine gerek yoktur, antijenik ve enflamatuvar reaksiyonlar raporlanmamıştır (25, 27).

Çok sayıda yeni enjekte edilebilir dolgu maddesi geliştirildiğinden, bu ürünlerin içerikleri ve özellikleri dikkatlice incelenmeli, hastanın ihtiyaçlarını karşılayabilecek ve yan etkileri minimum olan ürünler seçilmelidir.

2.3. Otolog Yağ Grefti Uygulamaları

Hastanın kendi dokularının kullanımı her zaman en çok tercih edilen seçenek olmuştur. Adipoz doku rekonstrüktif, plastik ve estetik cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağ grefti uygulamaları, yumuşak doku defektlerini düzeltmede kullanılan pek çok teknik arasında uygulaması en basit ve en etkili metod haline gelmiştir (36). Çünkü; otolog yağ ideal bir dolgu maddesinde aranan özelliklerin pek çoğunu karşılamaktadır:

- Kolay ve gereken miktarda bulunur,
- Yağ dokusu ek iz oluşturulmadan küçük insizyonlarla elde edilebilir,
- Yağ dokusu yumuşaktır ve doğal görünüm oluşturur,
- Otolog olduğundan allerjik reaksiyon oluşturmaz, doku uyumluluğu vardır,
- Ucuzdur ,
- Sonraki uygulamalar için dondurularak saklanabilir,
- Çok yönlüdür, vücudun birçok yerinde küçük ve büyük defektleri düzeltmede kullanılabilir,
- Hastalara yeni enfeksiyon (hepatit, HIV gibi) bulaştırma riski taşımaz,
- Basit ve düşük morbiditeli bir prosedür gerektirir (4, 27, 37-40).

2.3.1. Yağ Grefti Uygulamalarının Tarihçesi

Yumuşak doku defeklerinin düzeltilmesinde uygun otolog materyal arayışı her zaman plastik cerrahinin gündeminde olmuştur (36). Yağ enjeksiyonu konusunda değişen başarı oranları nedeniyle yıllardır tartışmalar devam etmektedir.

Modern yumuşak doku defektlerinin düzeltilmesinin tarihçesi; 1893 yılında Neuber'in ilk olarak doku ilerletilmesinde otolog yağ kullanımı ile başlar (26, 36, 41).

Neuber'in tüberküloz sonucu oluşan deprese yüz defektlerini rekonstruktör etmek için koldan elde ettiği serbest yağ bloklarını kullandığı bildirilmiştir (26, 42).

Lexer, 1910 yılında; Neuber'in tekniğini modifiye ederek, malar bölgedeki çöküklük ve çene deformitesinde geniş, blok şeklinde bir yağ grefti kullanmıştır (26, 43).

Bruning, 1911'de; cerrahi olarak eksizye ettiği yağı küçük küpler haline getirilerek rinoplasti sonrası defektleri düzeltmek için, enjektör yardımıyla enjekte etmiştir (43). Otolog yağı subkutanöz olarak enjekte eden ilk kişidir. Erken sonuçları mükemmel olsa da geç dönemde hayal kırıklığına uğramıştır (36).

Peer, 1956'da; serbest yağ greftlerini kullandığı deney serisinde transplante edilen yağın birinci yılın sonunda % 50'sinin canlı kaldığını rapor etmiştir (26, 36, 42). Bu volüm kaybı pek çok kişinin serbest yağ greftlerinin etkinliğini sorgulamasına neden olmuştur.

Fischer ve Fischer, 1974 yılında; liposakşın öncüsü olarak anılan mikrolipoenjeksiyon olarak bilinen tekniği geliştirmişlerdir (41).

Yves-Gerard Illouz, 1980 yılında; bugün liposakşın olarak bilinen tekniği geliştirmiş ve liposakşın cerrahisi ile elde edilen canlı yağın tekrar enjeksiyonunu raporlayarak yağ alma ve transplantasyon alanında devrim yaratmıştır (26, 43). Liposakşın cerrahisinin ilerlemesi ile yağ enjeksiyon uygulamaları yeniden önem kazanmıştır.

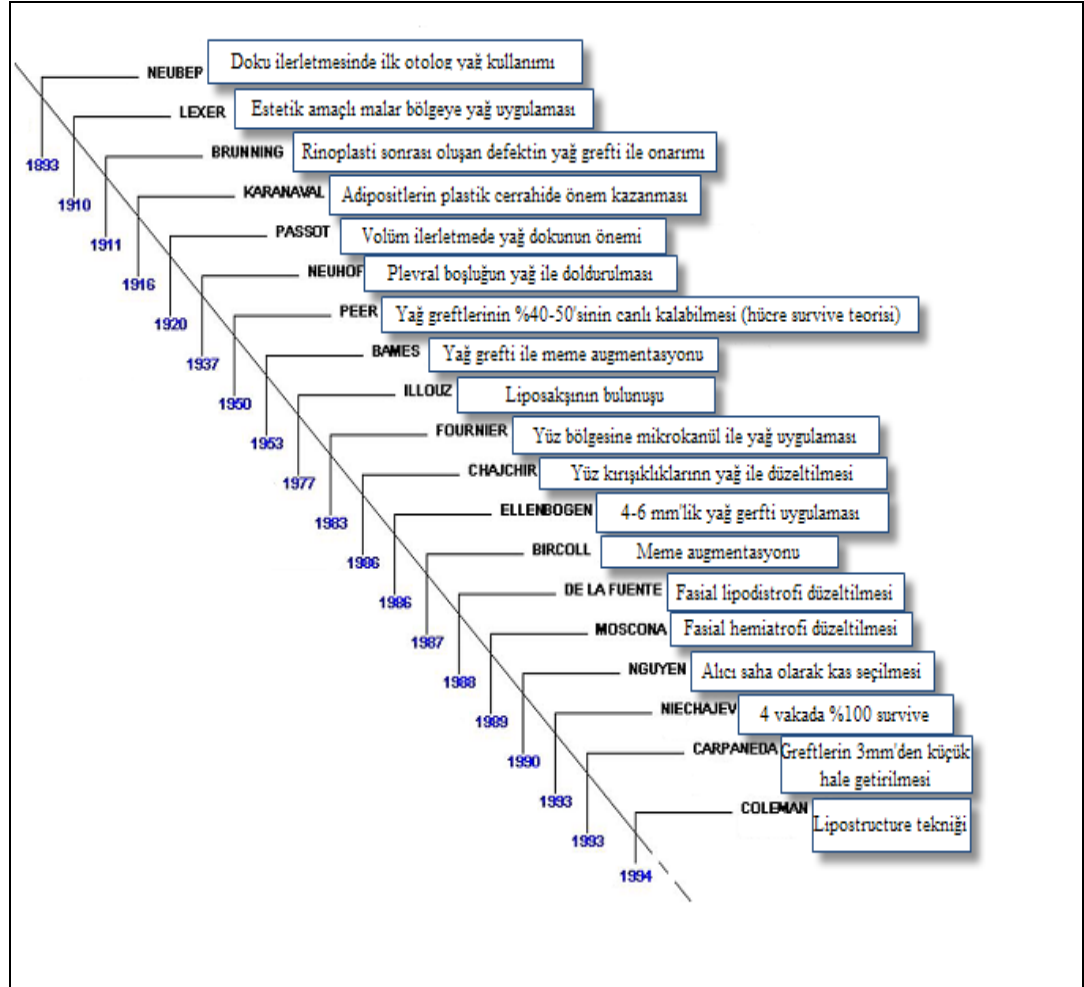
Klein; 1987'de, tümesent anesteziğini geliştirmiştir (43). Bu teknikle hedeflenen cerrahi alana yüksek volümde dilüe edilmiş anestetik solüsyon direkt olarak infiltre edilir. Bu yaklaşım liposakşın cerrahisinde devrim yaratmıştır. Klein'in prosedürü, önemli oranda daha az kan kaybı, azalmış anestetik risk, uygulamada kolaylık ve uzun süreli postoperatif analjezi sağlamaktadır. Bu teknikle daha iyi estetik sonuçlar ve daha hızlı postoperatif iyileşme sağlanabilir (26).

Fournier; mikrokanül uygulaması ile yağ transfer düşüncesini yeniden canlandırmıştır (26, 43). Daha önce yağ grefti uygulamaları açık veya yarı-açık teknikle uygulanmaktayken, Fournier; yağ dokusunu enjektör ve iğne yardımıyla alıp, tekrar enjekte ettiği kapalı tekniği geliştirmiştir (39). Bu teknikle yağ alımı kolaylaşmış, dokunun içeriği ve sterilitesi korunmuş ve enfeksiyon ve görünür skar oluşumu engellenmiştir.

Klein ve Fournier'in katkıları ve Asken'in çalışmaları sonucunda mikro-yağ enjeksiyon uygulamalarında artış olmuştur (26).

Ellenbogen, 1986'da; 4-6 mm boyutlarında inci grefti olarak adlandırdığı greftlerin skar, yüz kırışıklıkları, nazolabial kıvrım, fasial atrofi, göz kapağı depresyonları ve çene ilerletmesinde başarılı kullanımını raporlamıştır (26).

Otolog yağ doku uygulamalarının tarihçesi şekil 5 'de özetlenmiştir.



Şekil 5: Yağ grefti uygulamalarının tarihçesi

2.3.2. Yağ Grefti Kullanım Alanları

Günümüzde yağ greftleri ;

- yüz konturunun düzeltilmesinde, ilerletme ve belirginleştirme gerektiren alanlarda (yanak, çene, dudak gibi),
- yüz ve vücut yeniden şekillendirilmesinde (meme, liposakşın defektleri gibi),
- izler sonucu oluşan çöküklüklerde, akne skarlarında,
- kırışıklıklarda,

- kazanılmış veya konjenital yüz ve vücut anomalilerinin düzeltilmesinde (hemifasial atrofi, Rhombert hastalığı, Poland gibi),
- postravmatik defektlerin düzeltilmesinde,
- onkolojik rezeksiyonlar sonucu oluşan defektlerin düzeltilmesinde,
- radyoterapi sekellerinin düzeltilmesinde ve
- vokal kord yetersizliği, üriner inkontinens gibi pek çok estetik ve rekonstrüktif alanda kullanılmaktadır (2, 4, 17, 36, 42).

2.3.3. Yağ Greftlerinin Revaskülerizasyonu

Yağ dokusu mekanik veya kimyasal müdahale ile kolayca hasarlanabilen kompleks ve hassas bir yapıya sahiptir (44). En önemlisi yağ yaşayan bir dokudur ve yaşayabilmesi için besleyici ve respiratuar bir kaynakla yakın ilişkide olmalıdır (44).

Yağ greftlerinin yaşamını sürdürmesiyle ilgili iki teori mevcuttur:

Greftlenen yağ, mikroskop altında incelendiğinde greftlerde iki veya üç ay boyunca dejeneratif fenomenin etkili olduğu gösterilmiştir (37). İkinci aydan itibaren rejenerasyon oluşmaya başlar, embriyonik yağ hücreleri matür yağ hücreleri haline gelirler (37). Beşinci ay sonunda rejenerasyon tamamlanır, normal yağ doku görünümünde yeni metaplastik yağ oluştuğu varsayılmaktadır (37). Yağ greftlerinin 'konak hücre replasman teorisi' olarak bilinen bu teoride transplante edilen yağ tamamen ölmektedir ve fibröz doku veya yeni oluşan metaplastik yağ ile yer değiştirmektedir (43).

Peer tarafından tanımlanan ikinci teoriye göre; transplant mekanik hasara bağlı olarak önce iskemik kalmakta fakat sonra neovaskülerizasyon gelişmektedir ve adipositlerin tamamı ölmemektedir, donör alana transfer edilen yağın yaklaşık %50'si canlı kalmaktadır (37, 43, 45). Sağlam kalan preadipositler ve adipositler zamanla fonksiyonel hale gelmekte ve yağ depolamaktadır (43). 'Hücre hayatta kalma teorisine' göre; alıcı yatak reaksiyonu geriledikten sonra greftlenen yağ dokusunun bir kısmı canlılığını sürdürmektedir (36).

Günümüzde yağ greftlerinin survivi ile ilgili bu iki teorinin de doğru olduğu kabul edilmektedir.

Serbest yağ greftlerinin, transplantasyon sonrası değişik zamanlarda histolojisi incelenmiş ve şu bulgular elde edilmiştir (46):

İlk dört günde : Hücresel infiltratta; polimorfonükleer, plazma hücreleri, lenfositik ve eozinofilik hücreler gözlenmiştir. Greft damarlarında, kırmızı kan hücreleri kümelenmiş

şekilde, beyaz kan hücreleri sağlam damar duvarlarından geçiş halinde bulunmuştur. Greft endotelial hücrelerinde ve stromal fibroblastlarda dejenerasyon saptanmamıştır.

Dördüncü günde : Küçük stromal damarlarda konjesyon ve dilatasyon, kırmızı ve beyaz kan hücrelerinde artış belirlenmiştir. Küçük greft damarları ile alıcı kan desteği arasında anastomozlar görülmüştür. Eozinofil sayısında artış saptanmış, yabancı cisim tipi dev hücreler gözlemlenmiştir.

Onuncu gün : Nekrotik yağ dokusu alanları belirlenmiştir. Lobül periferinde orijinal yağ hücrelerinde rejeneratif proliferasyon, greft yağ hücrelerinde proliferasyon, alıcıya ait yağı alıp genişleyen yuvarlak histeosit benzeri hücreler gözlemlenmiştir.

On dört-yirmibirinci günler : Daha ileri adipoz hücre yıkımı saptanmıştır. Sitoplazmalarında lipid emilimi sonucu damlacıklar oluşturan geniş alıcı histiositlerinde artış bulunmuştur.

Birinci-ikinci aylar : İkinci ayda geniş histiositler sayıca en fazladır ve sitoplazmalarında birleşmiş yağ globülleri görülür.

2.3.4. Yağ Grefti Uygulamalarına Teknik Bakış

Otolog yağ transferi çok aşamalı bir prosedürdür. Son yirmi yılda, çok sayıda yağ enjeksiyon tekniği geliştirilse de, herkesin uygulayabileceği standart bir prosedür bulunmamıştır (36, 41). Her bir adımı uygularken pek çok prosedür seçeneği bulunmaktadır. Geliştirilen tekniklerin genel hedefi daha fazla adiposit yaşamını sağlamak ve sonuç olarak daha güvenilir sonuçlar elde etmektir (45). Maksimum greft yaşayabilirliğini sağlayabilecek en uygun yağ greftleme metodu konusunda görüş birliği bulunmamaktadır (36). Prosedürün çok sayıda çelişkili yönü ve çok az başarı kanıtı olmasına rağmen daha iyi bir alternatifi bulunmadığı için, uygulamalar yaygın olarak devam etmektedir (5).

2.3.4.1. Donor Alan

İnsan vücudundaki tüm adipositler aynı özellikleri taşıyabilir ve farklı vücut bölgeleri, farklı metabolik ve vasküler gereksinimler gerektirebilir (43). Araştırmalarda optimal donor alan konusunda görüş birliği yoktur ve donor alanın sonuca minimal etkisi olduğu belirtilmektedir (40). Coleman; donor alanın yağ greft uygulamalarının sonucunda etkili olmadığını ve yağın kolay ulaşılabilir ve hastanın konturunu düzeltecek bölgelerden

alınmasını önermiştir (37). Bazı çalışmalarda ise diyet ile oluşan değişikliklere dirençli, vasküleritesi az olan alanlardan yağ alınması önerilmektedir (40, 42).

2.3.4.2. Donor Alan Anestezisi

Pek çok araştırmacı lokal anestezi uygulamasının hidrolik ve kimyasal travma gibi olumsuz etkilere neden olduğunu belirtse de, literatür gözden geçirildiğinde lokal anestezi uygulanarak veya uygulanmadan aspire edilen yağın survive oranlarının benzer olduğu gösterilmiştir (39, 41). Epinefrin lokal uygulamasının, kan akımını azaltarak greft üzerinde zararlı etkilere sahip olduğu kabul edilse de, bu görüş hiçbir çalışmada klinik olarak kanıtlanamamıştır (41, 43). Lidokain'in adipositlerde glukoz transportunu ve lipolizi inhibe ettiği ve hücrelerin kültürde üremelerini engellediği fakat bu etkinin sadece ilaç ortamdayken geçerli olduğu, yıkama işleminden sonra hücrelerin fonksiyonlarını ve gelişim potansiyellerini tekrar kazandıkları gösterilmiştir (41).

2.3.4.3. Yağ Alınması

Yağ elde etmek için; vakum makinesi yardımıyla yağ alma (liposakşın), manuel enjektör ile aspirasyon veya direkt eksizyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Yağ grefti başarısızlık sebeplerinden biri olarak iskemi suçlanmaktadır. Liposakşın prosedürünün travmatik etkisinin adiposit canlılığı üzerine etkisi bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada liposakşın yoluyla elde edilen yağ, eksizyon ile elde edilen yağ ile karşılaştırılmış ve artmış yağ hücre hasarı saptanmamıştır (47). Diğer bir çalışmada liposakşın ile alınan yağ incelendiğinde; %90 veya daha fazla yağ hücrelerinin canlı olduğu bulunmuştur (46).

Makine veya enjektör yardımıyla elde edilen yağ greftlerinde, hücre canlılığı ve hayatta kalma süresi açısından fark saptanmamıştır (38, 41, 45).

Liposakşın kanülü veya iğne ile elde edilen yağda, survive açısından bağlantı saptanmamıştır (41).

2.3.4.4. Yağın Hazırlanması

Transplante edilen yağ içerisinde kan bulunması makrofaj aktivitesini uyararak, yağ hücrelerinin emilimini hızlandırmaktadır (46). Bu nedenle elde edilen yağın implantasyon öncesi çeşitli normal salin veya Ringer laktad solüsyonu ile yıkanması veya santrifüj uygulanması önerilmektedir (42, 45).

Santrifüj işlemi ile yağ yoğunluğuna göre tabakalara ayrılmaktadır. Üst tabaka en az yoğun olan tabakadır ve serbest yağ asitlerini içermektedir. Orta tabakada canlı yağ hücrelerini içeren yağ dokusu bulunur ve en alt tabakada enjekte edilen lokal anestetik, tümesent solüsyonu ve kan içeren sıvı yer almaktadır (38). Bu sıvı içeren tabakanın enjeksiyonu 24-48 saatte ortadan kaybolan aldatıcı volüm ilerletmesi sağlar (38).

Yağın santrifüj edilerek, yıkanarak veya hiçbir müdahalede bulunmadan uygulanması arasında survive açısından fark bulunmamıştır (41). Uygulanan hiçbir yöntemin diğerine üstünlüğü saptanmamıştır, önemli olan bu işlemler sırasında travmanın minimumda tutulmasıdır.

2.3.4.5. Yağ Enjeksiyonu

Enjeksiyonda kullanılan iğne çapı ile elde edilen düzlemenin uzunluğu arasında bağlantı bulunmamıştır (41). Elde edilen yağ; vücutta kullanılacağı bölgeye göre farklı kanül çapları, uzunlukları ve kanül uçları tercih edilerek enjekte edilebilir (37). Künt uçlu kanül kullanımı daha güvenli ve daha az travmatiktir (37). Keskin uçlu kanüller, yapışıklıkları açmak için kullanılabilir (37). Enjeksiyon uygulanırken retrograd yöntem tercih edilmelidir yani iğne veya kanül geri çekilirken yağ dokusu enjekte edilmelidir ve her geçişte çok küçük miktarda yağ infiltre edilerek yeni greftlenen yağ adaları birbirinden ayrılmaya çalışılmalıdır (37). Greft adaları birbirinden ayrılarak yeni alıcı doku ile daha geniş temas alanı sağlanır ve böylece mevcut kapillerle temas artar, yağ stabilize edilerek migrasyon önlenir (37). Defektin yönüne göre yağ enjeksiyonu düz veya eğimli olarak yapılabilir, uygun düzeltim için, farklı seviyelere enjeksiyon uygulaması gerekebilir (39, 42). Bazı araştırmacılar multipl plan uygulamasının alıcı yatakta travmaya sebep olarak ödemi ve enflamatuvar yanıtı artırdığını ve bunun sonucunda da greft rezorbsiyonunu artırdığını düşünmektedir (38).

2.3.4.6. Alıcı Saha

Enjeksiyon alanı hastanın spesifik ihtiyaçlarına göre belirlenmektedir. Guerrerosantos ve Eppley çalışmalarında, yağın kas içerisine enjekte edildiğinde yağ hücrelerinin yaşayabilirliğinin daha yüksek olduğunu raporlamıştır (36). Fakat hemifasial atrofi ve postravmatik skarlarda azalmış kan desteğine rağmen uzun etki süresi klinik olarak kanıtlanmıştır (41).

Carpenada ve Ribeiro; greft canlılık oranının, greft kalınlığı ve geometrik şekline bağımlı olduğunu, greft çapı 3 mm'den daha büyükse yağ greft canlılığının azaldığını bildirmişlerdir (42, 48). Yağın plazmatik imbibisyon ile beslenebilmesi için vaskulerize kenardan en fazla 1,5 mm uzaklıkta olması gerektiğini göstermişlerdir. Bu çalışmalar sonunda 3mm kalınlıkta yağ damlacıklarının, neovaskülerizasyon için boşluk bırakarak uygulandığı tekniklerini geliştirilmiştir.

Butterwick ve Lack (2003); yağın yüz mimik kasları içerisine enjekte edildiği, yağ otogreftinin kas enjeksiyonu (FAMI) olarak adlandırılan yeni bir teknikle 100 hastadaki deneyimlerini sunmuşlardır (43). Bu teknikte yağ atravmatik ve steril olarak alınmış, santrifüj edilmiş ve özel künt uçlu kanüllerle farklı kas gruplarına enjekte edilmiştir. Bu teknikle simetrik ve uzun süreli sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.

2.3.4.7. Yağın Dondurularak Saklanması

Alınan fazla yağın soğutularak saklanabildiği ve tekrarlanan enjeksiyonlar için kullanılabilirliği ve sonuçların normalde kullanılan taze implantlardakinden farklı olmadığı bildirilmektedir (39). Elde edilen yağ normal salin ile yıkanarak, kan içeren bölüm uzaklaştırıldıktan sonra kapalı enjektörler içerisinde dondurucuda saklanabilmektedir (39). Dikkat edilmesi gereken dondurma işleminin mümkün olduğunca hızlı, çözme işlemininse yavaş yapılmasıdır (39).

2.3.5. Yağ Grefti Uygulamalarının Komplikasyonları

Yağ enjeksiyonu uygulamaları sonucunda ciddi komplikasyonlar nadirdir ve sıklıkla uygun olmayan aletlerin veya tekniğin kullanımı sonucu oluşmaktadır (36).

Yağ grefti uygulamaları sonucunda oluşan komplikasyonların çoğu estetikdir (37). Yağın belirlenen bölgeye çok fazla veya gerektiğinden az yerleştirilmesi problemler oluşturabilir. Diğer bir yaygın problem oluşan düzensizliklerdir. Bu düzensizlikler hastanın vücut yapısından, kullanılan enjeksiyon tekniğinden ve uygulanan yağın migrasyonu sonucu oluşabilmektedir (37). Yağ kümelenmeleri, alt göz kapağı gibi duyarlı bir alana fazla miktarda yağ enjeksiyonu veya yağın çok yüzeysel olarak enjekte edilmesi sonucu oluşan, enjekte edilen yağın ayrı bir kitle şeklinde görüldüğü durumdur (49). Bazı durumlarda bu kitlesel oluşumların eksizyonu gerekebilir.

Operasyon sonrası görülen ödem bir komplikasyon olarak değil operasyonun bir parçası olarak ele alınmalıdır (39). Ekimoz ve eritem kısa süreli olarak, ağrı, enfeksiyon ve rahatsızlık hissi nadir olarak görülmektedir (50). Yüksek miktarda yağ enjeksiyonu uygulandığında gelişen komplikasyonlar artmaktadır.

Dikkatsiz yapılan enjeksiyonlar sonucu emboli gelişmi, en ciddi potansiyel komplikasyonu oluşturmaktadır. Egido ve arkadaşları, glabellar bölgeye yağ enjeksiyonu sonrası intravasküler enjeksiyona bağlı orta serebral arterde emboli ve görme kaybı olan vakalar yayınlamışlardır (36, 42). Yağın elde edilmesinde ve enjeksiyonunda künt uçlu kanüller kullanılsa bile alttaki kas, sinir veya damar gibi yapılarda hasarlanmalar olabilir (37).

Küçük yağ kistlerinin oluşumu, kilo alımına bağlı oluşan yağ hipertrofisi, yağ nekrozu ve kalsifikasyon oluşumu, intramusküler enjeksiyonlar sonrası görülen yüz kaslarında güçsüzlük gelişebilecek diğer komplikasyonlar olarak sıralanabilir (31, 43).

Yumuşak doku defektlerinin düzeltilmesinde otolog yağ kullanımı kabul görmüş bir teknik olsa da elde edilen düzeltmenin devamlılığının sağlanması uygulanan tekniklerde ilerlemelere rağmen önceden tahmin edilememektedir. Erken dönemde sonuçlar mükemmel olsa da yüksek oranda hacim kaybı tekrarlayan prosedürler gerektirmektedir.

2.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü; hücrelerin laboratuvar ortamında, kontrollü koşullar altında yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Kültür için kullanılacak hücreler enzimatik, mekanik ya da kimyasal ayrıştırma yöntemleri kullanılarak asıl dokudan, primer kültürden veya bir hücre grubundan temin edilebilir. Doku kültürü uygulamaları ilk olarak yirminci yüzyılın başlarında Harrison'ın hayvan embriyo sinir hücrelerini in vitro ortamda çoğaltma çalışmaları ile başlamıştır (51). Yapılan ilk çalışmalarda hayvan hücrelerinin davranışları, in vivo ortamdaki sistemik değişkenler uzaklaştırılarak gözlemlenmiştir (51).

Hücre kültürleri; hücre içi aktivitelerin, hücre ürünlerinin ve hücreler arası etkileşimlerin değerlendirilmesinde, genetik analiz, deneysel kanser araştırmaları, enfeksiyon, ilaç araştırmaları ve kök hücre araştırmaları gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Hücre kültürü uygulamalarının avantajları:

- Sıcaklık, pH, ozmotik basınç, oksijen ve karbondioksit miktarı gibi fizikokimyasal ortam değişkenleri güvenilir bir şekilde kontrol edilebilir.
- Hormon, besin konsantrasyonları ve mikroortam düzenlenebilir.

- Hücrelerin sitolojik ve immün boyama işlemleri kolaylıkla yapılabilir.
- Hücreler tüm özellikleri korunarak likid nitrojen içerisinde dondurularak sakalanabilir.

- Elde edilen hücrelerin köken, geçmiş ve saflık derecesi kayıt altına alınabilir.
- Hücre sayımı ve ölçüm işlemleri kolay yapılır.
- Hayvan deneylerinde karşılaşılan yasal ve etik problemlerden kaçınılabilir (51).

Hücre kültürü çalışmalarının en önemli dezavantajı, deneyim ve ekipman gerektirmesidir. Çalışmalarda başarı elde etmek için kültür tekniklerinin katı ve disiplinli bir şekilde uygulanması gerekmektedir.

Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültüründe en çok tercih edilen pH aralığı 7,2-7,4, istenilen sıcaklık genellikle 37-37,5 °C'dir (52). Isı artışları eğer öldürücü sınıra ulaşmazsa hücrelerin bölünme hızında artış gözlelenebilir. Kültürdeki hücreler in vivo koşullardaki bağışıklık sistemine sahip olmadığından enfeksiyon oluşma riski mevcuttur. Kontaminasyon riski antibiyotikler kullanılarak aşılmaya çalışılır.

Hücre kültürü besiyerleri; laboratuvarında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Besiyeri ihtiyacı; hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Besiyerleri genellikle vitaminler, amino asitler, glikoz, yağ asitleri, proteinler ve inorganik tuzlar eklenmiş tamponlu tuz çözeltilerini içerirler. İnorganik tuzlar ozmatik dengeyi sağlamak için kullanılır. Tamponize tuz çözeltileri ortam pH'nın optimum değerlerde tutulmasını sağlar. Kültür ortamında hücrelerin temel enerji kaynağı glukozdur. Vitaminler hücrelerin büyüme ve proliferasyonu için gerekli birçok kofaktörün öncü maddesidir. Fetal Sığır Serum (FBS); kültür çalışmalarında en sık kullanılan serumdur. Serum içerisinde; medyum için en önemli faktörler olan albümin ve büyüme faktörleri bulunur. Serum ayrıca mekanik hasara karşı bariyer ve tampon görevi görür, toksinleri bağlayarak ortamdaki uzaklaştırır (51, 52).

Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir:

1) Primer hücre kültürleri : Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildikleri dokunun özelliklerini taşırlar. Primer hücre kültürleri; küçük doku parçalarının petri yüzeylerine ekilmesiyle eksplant

kültürler halinde veya enzimatik uygulamalarla tek hücre süspansiyonu halinde yapılabilir. Primer kültür uygulamalarının en önemli avantajı in vivo yaşam özelliklerini koruyan hücreler elde edilebilmesidir (52).

2) Sekonder hücre kültürleri : Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilen kültürlerdir.

3) Sürekli hücre kültürleri : Genellikle malign tümörlerden elde edilen sonsuz pasajı yapılabilen hücre kültürleridir. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir. Sınırsız deney yapma avantajının yanında bu hücrelerin en önemli dezavantajı in vivo özelliklerinin çoğunu yitirmeleridir.

2.4.1. Preadiposit ve Adiposit Hücre Kültürleri

Adiposit öncü hücreleri olan preadipositler ilk olarak Wasserman tarafından 1926 yılında tanımlanmıştır (9). Matur beyaz yağ dokusunun stromal-vasküler bölümünün doku kültürleri sürecinde ortaya çıkartılmışlardır (53). Bin dokuz yüz yetmişlerde doku kültür tekniklerinin geliştirilmesiyle fibroblast benzeri bu hücreler sitolojik ve enzimatik olarak karakterize edilebilmişlerdir (9). Poznanski ve ark, 1973 yılında; insan yağ dokusundan elde ettikleri adipoz doku öncü hücrelerini kültüre etmişlerdir (3).

Van ve Roncari, 1978 yılında; adipositlerin morfolojik maturasyonunu çalışabilmek için bir kültür sistemi geliştirmiş ve preadipositlerin in vitro diferensiyasyon esnasındaki morfolojik basamakları tanımlamışlardır (9, 54). İnsan omentumundan elde edilen hücrelerin özelliklerini tanımlayarak; bu hücrelerin lipid depoladığını, trigliserid içeriğini boşaltmış matür yağ hücrelerinin fonksiyonel özelliklerine sahip olduklarını ve cilt fibroblastlarından bu yönleriyle farklılık gösterdiklerini belirtmişlerdir (55). İşaretlenmiş preadipositlerin ilk otolog transplantasyonunu 1982 yılında yapmışlardır (55).

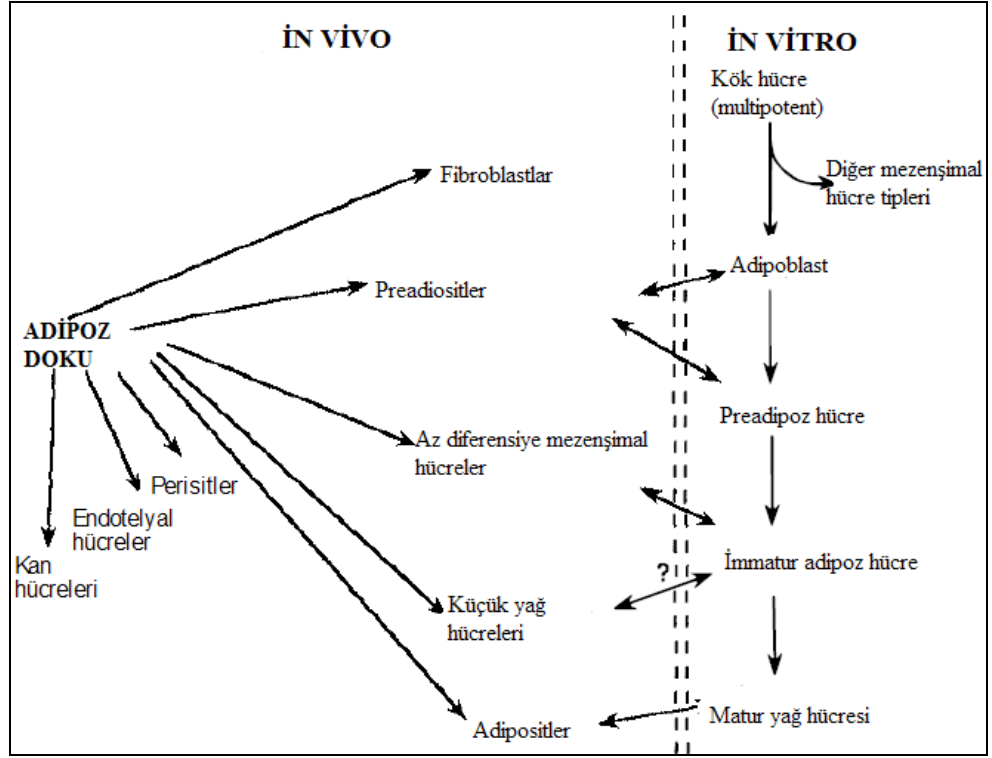
Green ve Kehinde; ratlarda belirli fibroblast hücre dizilerinin adipositlere diferansiye olabileceğini göstermişler ve daha sonra da kültüre preadipositlerin in vivo başarılı transplantasyonunu kanıtlamışlardır (54). Sonuçları Van ve Roncari tarafından da doğrulanmıştır.

Yağ doku hücre kültürlerinde ilk adım; yağ dokusu stromal vasküler bölümünden preadipositlerin izole edilmesidir (19). Bu yaklaşım; elde edilen yağ dokusundan, fibröz dokuların uzaklaştırılarak kollojenaz ile sindirime uğratılmasına dayanmaktadır. Hücrelerin çok evreli santrifüj ve filtrasyon işlemlerinden sonra oldukça homojen preadiposit

populasyonu elde edilmektedir. Diferensiasyon protokollerinde başlangıçta serum içeren medyumlar kullanılmış fakat preadipositlerin adipositlere farklılaşma oranı oldukça düşük bulunmuştur (19, 56). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda serum içeriği değişken protokoller kullanılmaktadır ve diferensiasyon oranları % 70'e kadar yükseltilmiştir (19).

Preadipositler kültür koşulları altında proliferere olabilir ve matur yağ hücrelerine farklılaşabilir (57). Kültür ortamında erken dönemde preadipositler (beşinci gün civarı) santral nükleuslu ve az miktarda granülasyon içeren fuziform hücre şeklinedirler (9). Kültür ortamına zenginleştirilmiş medyum eklendiğinde preadipositler mature hale gelmeye başlarlar. İlk birinci haftada uzamış, iğsi şekillerini korurken sitoplazma içerisindeki lipid granüllerinin artışı gözlenebilir. Yağ damlacıkları zamanla birbiriyle birleşme eğilimindedir. Kültürün ikinci ve üçüncü haftasında lipid damlacıkları az sayıda geniş lipid damlacıklarına dönüşür ve sonunda santraldeki büyük lipid globülü nükleusu periferite iter ve olgun yağ hücresine özgü taşlı yüzük görünümü meydana gelir. Matur yağ hücreleri diferensiasyonun son basamağı olarak görülmektedir ve proliferatif aktiviteden yoksun oldukları düşünülmektedir (57). Şekil 6'da in vivo ortamda yağ dokuda mevcut olan hücreler ile in vitro ortamdaki çeşitli diferensiasyon basamaklarından geçen hücreler arasındaki ilişki gösterilmiştir.

Kültür ortamında hücre içerisinde lipid vakuollerin histolojik olarak görülmesi bu hücrenin adiposit olduğuna dair tek kanıttır (9). Epitel benzeri preadipositleri diğer epiteloid hücrelerden ayıracak histolojik ve immünolojik boyama yöntemi bulunmamaktadır (9). Lipid içeren hücrelere diferensiasyonun varlığı hücre kültüründe preadipositlerin varlığının kanıtıdır (9). Tüm araştırmacılar insan preadipositlerini mikroskopik görünümüleriyle belirlemişlerdir (9). Maalesef insan preadipositlerini tanımlayacak antikolar mevcut değildir.



Şekil 6: İn vivo ortamdaki hücre tipleri ve in vitro ortamdaki hücre diferensiyasyon basamakları arasındaki ilişki

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne bağlı olarak hizmet veren Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, standart koşullarda bakılan, toplam 32 adet yetişkin erkek Wistar albino rat (350-450 gr ağırlığında) kullanıldı. Çalışma öncesinde Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı. Uygulamalarda deneysel hayvan araştırmaları protokollerine bağlı kalındı. Çalışmanın hücre kültürü uygulama aşaması Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmamızda 'Human Cell Culture Protocols' kitabındaki, Harmelan ve ark.'nın tanımladığı adiposit prekürsör hücrelerin primer kültürünü açıklayan kültür protokolü referans alındı (58).

Çalışma temel olarak beş aşamadan oluşmaktadır:

Birinci aşama : Hücre kültür protokolünde kullanılacak kültür medyumlarının hazırlanması

İkinci aşama: Ratlardan yağ örnekleri alınması.

Üçüncü aşama: Yağ doku örneklerinin hücre kültür protokolünde yer alan çeşitli işlemlerden geçirilerek, prekürsör yağ hücrelerinin izole edilmesi, çoğaltılması ve hücrelerin bir bölümünün adipositlere diferensiasyonunun sağlanması.

Dördüncü aşama: Kültür ortamında çoğaltılan preadiposit ve adiposit hücre süspansiyonlarının ratlara otolog implantasyonu.

Beşinci aşama: Enjeksiyon bölgelerinin periyodik aralıklarla değerlendirilmesi .

3.1. Birinci Aşama

3.1.1. Kültür Medyumlarının Hazırlanması

Çalışmanın ilk aşamasında prekürsör yağ hücrelerinin izolasyonu ve çoğaltılması esnasında gerekli olan hücre kültürü medyumları hazırlandı. Hücre kültürü uygulamasında kullanılan; hücre kültür besiyerleri, kimyasallar ve kültür malzemeleri Sigma (Sigma, St. Louis, MO), Serva (Serva, Heidelberg, Germany) ve Biochrom (Biochrom AG, Berlin, Germany) firmalarından temin edilmiştir.

Bazal medyum: Dulbecco modifiye eagle medyum (DMEM) ve Ham's F-12 çözeltisi eşit volümde karıştırılarak, bu karışıma 15 milimol (mM) 4-(2-Hidroksi Etil)-1-

Piperazin Etan Sülfonik asit (HEPES), 14 mM NaHCO₃, 33 mikromol (μ M) biotin ve 17 μ M D-pantotenat eklenmesiyle hazırlandı. Karışım filtre edildi ve pH değeri 7,4 olarak ayarlandı.

Fosfat ile tamponlanmış salin solüsyonu (PBS) : Tablet şeklindeki form üretici firmanın önerileri doğrultusunda solüsyon şekline getirildi. Solüsyon filtrasyonla sterilize edildi.

Kollajenaz solüsyonu: Kollajenaz (0,251 U/mg) , %2 sığır serum albumini (BSA) içeren PBS içerisinde pH 7.4’de eritilerek hazırlandı.

Eritrosit lizis buffer: 155 mM NH₄Cl, 5.7 mM K₂HPO₄, 0.1 mM Etilen Diamin Tetra Asetikası (EDTA) karıştırılarak hazırlandı. Filtrasyonla sterilize edildi.

İnokulasyon medyum: Bazal medyum içerisine gentamisin (50 μ g/mL) ve %10 fetal sığır serumu (FBS) eklenmesiyle hazırlandı.

Bazal preadiposit kültür medyum: Bazal preadiposit kültür medyumunun hazırlanması için ilk olarak insülin, triiodo-L-tironin ve transferin stok solüsyonları hazırlandı. Triiodo-L-tironin 1 mM solüsyonu, 1 mol (M) NaOH ile alkalize edildi ve % 50 konsantrasyondaki etilen hidroksit içerisinde 2 μ M stok solüsyonuna dilüe edildi. İnsülin stok solüsyonu için 22 μ M insülin, 10 mM HCl içerisinde hazırlandı. Transferin stok solüsyonu 1 mg/ml distile su içerisinde hazırlandı. Stok solüsyonlar filtrasyonla sterilize edildi. Bazal medyum içerisine, hazırlanan stok solüsyonlardan insulin (66 nM), triiodo-L-tironin (1 nM), transferin (10 μ g/mL) ve gentamisin (50 μ g/mL) eklenerek bazal preadiposit kültür medyum hazırlandı.

Preadiposit diferensiasyon medyum: Preadiposit diferensiasyon kültür medyumunun hazırlanması için ilk olarak isobutil-metilksantin (IBMX), hidrokortizon ve troglitazon stok solüsyonları hazırlandı. IBMX stok solüsyonu; 20 mM IBMX’in Na₂CO₃ ile alkalize edilmesiyle hazırlandı. 0.1 mM hidrokortizon stok solüsyonu % 50 konsantrasyondaki etilen hidroksit içerisinde hazırlandı. Troglitazone stok solüsyonu 1 mg/ml olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı. Bazal preadiposit kültür medyum içerisine 0.5 mM IBMX, hidrokortizon (100 nM) ve troglitazon (1 μ g/mL) eklenmesiyle preadiposit diferensiasyon medyum elde edildi.

Çalışma başlangıcında tüm medyum ve çözeltiler; hücre kültür protokolüne uygun şekilde hazırlandıktan ve steril edildikten sonra steril cam şişelerde önerilen koşullarda saklandı.

3.2. İkinci Aşama

3.2.1. Kültür Örneklerinin Elde Edilmesi

Çalışmada her grupta 8 rat olmak üzere 4 grup oluşturuldu, toplam 32 adet yetişkin erkek Wistar albino rat (350-450 gr ağırlığında) kullanıldı. Ratların bakımı ve takibi Adnan Menderes Üniversitesi Tıp fakültesi'ne bağlı olarak hizmet veren Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

Tüm ratlar kas içine uygulanan 5 mg/kg Xylazine ve 50 mg/kg Ketamin enjeksiyonu ile uyutuldu. Tüm cerrahi prosedürler steril koşullar altında gerçekleştirildi. Ratların abdominal bölgesi % 5 iodine solüsyonla temizlendi. Abdominal cilt üzerinde yaklaşık 2 santimetrelilik vertikal insizyonla girilerek, diseksiyonla sağ epididimal bölgeye ulaşıldı ve periepididimal bölgedeki yağ yastıkçığından 2 gr yağ örneği alındı (Resim1). Alınan yağ doku örnekleri bazal medyum içeren steril plastik şişelerde laboratuvara ulaştırıldı.

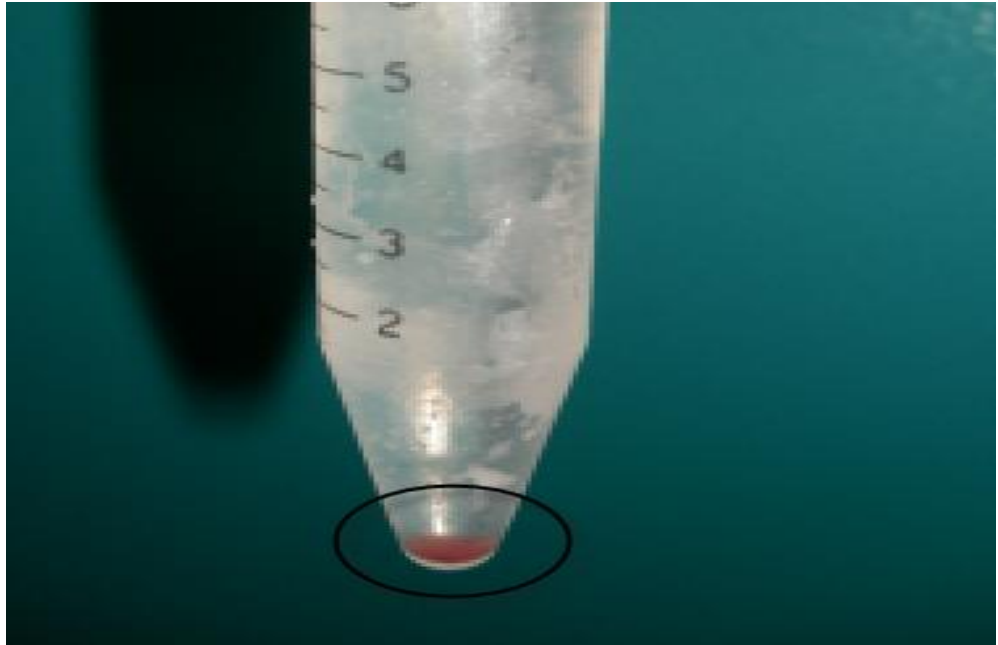


Resim 1: Epididimal yağ yastıkçığından yağ doku örneğinin alınması

3.3. Üçüncü Aşama

3.3.1. Hücre İzolasyonu

Yağ doku örnekleri laminer akımlı kabin içerisinde, görünen artık konnektif doku ve kan damarlarından ayrılarak, 2 ml'ye eşdeğerdeki yağ örneği alındı. Hazırlanan yağ doku parçaları kollajen ile sindirim uygulanana kadar , PBS içerisinde saklandı ve sindirim işlemini kolaylaştırmak amacı ile makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Yağ dokusu parçaları 50 ml'lik tüplere aktarılarak, yağ doku mililitresine 3 ml kollajenaz solüsyonu (3ml solüsyon/ml) eklendi. Tüpler, 37°C'de çalkalanan su banyosu içerine yatay konumda yerleştirildi ve 90 dakika bekletilerek sindirim sağlandı (Resim 2). Sindirim işlemi sonrasında stromal-vasküler bölümden yüzen adipositleri ayırmak için; oda ısısında 10 dakika 200 g de santrifüj işlemi uygulandı. Matur adipositleri ve kollajenaz solüsyonunu içeren en üst tabaka boşaltılarak preadipositleri içeren alt tabakadan ayrıldı. Eritrositler preadipositlerin kültür flasklarına yapışmasını engellediğinden, preadipositleri içeren 1 mililitrelik alt tabaka içerisine 9 ml eritrosit lizis buffer eklenerek (1:9 oranında) 10 dakika enkübe edildi ve süspansiyon 150 µm'lik filtreden süzülerek sonrasında 200 g'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Üst tabaka ayrılarak alt tabakaya 10-20 ml bazal medyum eklenerek tekrar süspansiyon elde edildi. Süspansiyondan, belirli volümde hücre örneği sayım için alındı.



Resim 2: Kollajenaz ile sindirim sonrası elde edilen stromal-vasküler tabaka

3.3.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücre süspansiyonundan 20 µl örnek alındı ve eşit miktarda tripan blue ile süspand edilerek, karışımın 10 µl'si Thoma lamına transfer edildi ve x100 büyütmede bir büyük karedeki canlı hücreler sayıldı. Bulunan hücre sayısı yardımıyla mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Bir ml'deki hücre sayısı} = \text{Büyük karenin tamamındaki hücre sayısı} \times 2 \times 10^4$$

3.3.3. Hücre İnokulasyonu

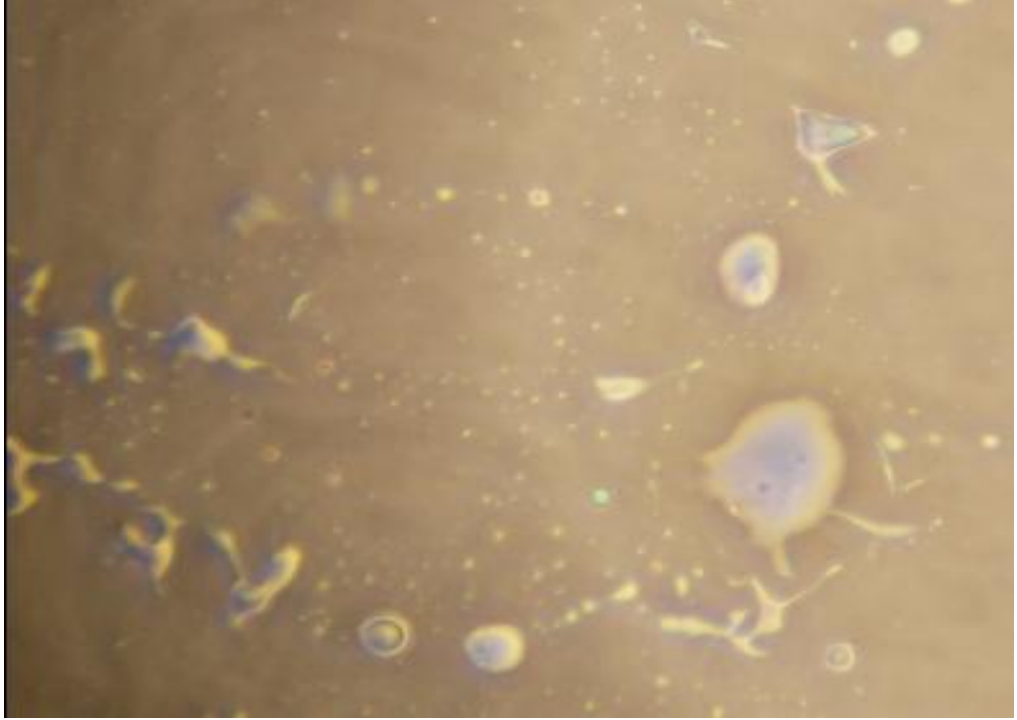
Hücre sayımı sonrasında her bir rata ait yağ örneklerinden hazırlanan hücre süspansiyonları, preadiposit ve adiposit üretimi için 1 milyon hücre/ml olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Hücreler inokulasyon dansitesi 30000-50000 hücre/cm² olacak şekilde kültür plaklarına aktarıldı üzerine yaklaşık 10 ml inokulasyon medyumunu eklendi. Optimal hücre adezyonu için; hücreler inokulasyon medyumunda 37°C'de ve %5 CO₂'de enkübatör içerisinde 16-24 saat enkübe edildi.

3.3.4. Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Süspansiyonlarının Hazırlanması

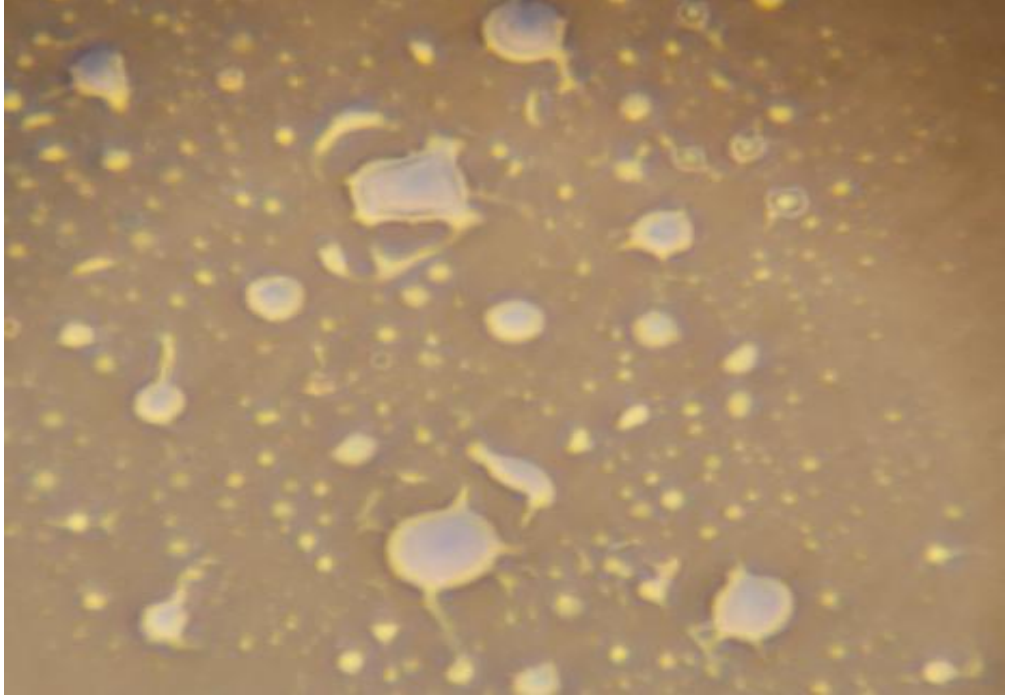
Hücre adezyonu sağlandıktan sonra, yapışmayan hücrelerin ve serumun ayrılması için hücreler iki kez ılık PBS ile yıkandı. Birinci grup kültür plaklarında preadiposit üretimi için ortama bazal preadiposit kültür medyumunu eklendi. Üç gün sonra kültür plağındaki hücreler mikroskop altında değerlendirildi (Resim 3). Hücreler kültür flasklarının tabanına yapıştıktan sonra iğsi şekilli preadipositler mikroskopik olarak görüldü. Kültür plaklarında konfluens elde edilene kadar medyum iki günde bir değiştirildi (Resim 4). Konfluens elde edildikten sonra hücreler bu aşamada tripsinize edilerek plaklardan ayrıldı ve DMSO içeren medyumda -20°C'de dondurularak saklandı.

İkinci grup kültür plaklarında preadiposit diferensiasyonunu sağlamak için ortama preadiposit differensiyasyon medyumunu eklendi. Hücreler bu medyum içerisinde 3 gün (37°C'de ve %5 CO₂'de) kültüre edildi ve sonra bu medyum, hidrokortizon eklenmiş (100nM) bazal preadiposit kültür medyumunu ile değiştirildi. Bu medyum 3-4 günde bir değiştirildi. Yaklaşık 6-8 gün içerisinde hücrelerin sitoplazmasında genişleme ve lipit birikiminin oluşmaya başladığı görüldü (Resim 5). Preadipositlerin yaklaşık iki hafta içerisinde tamamen lipit damlacıkları ile dolu ve daha küresel adipositler haline geldiği gözlemlendi.

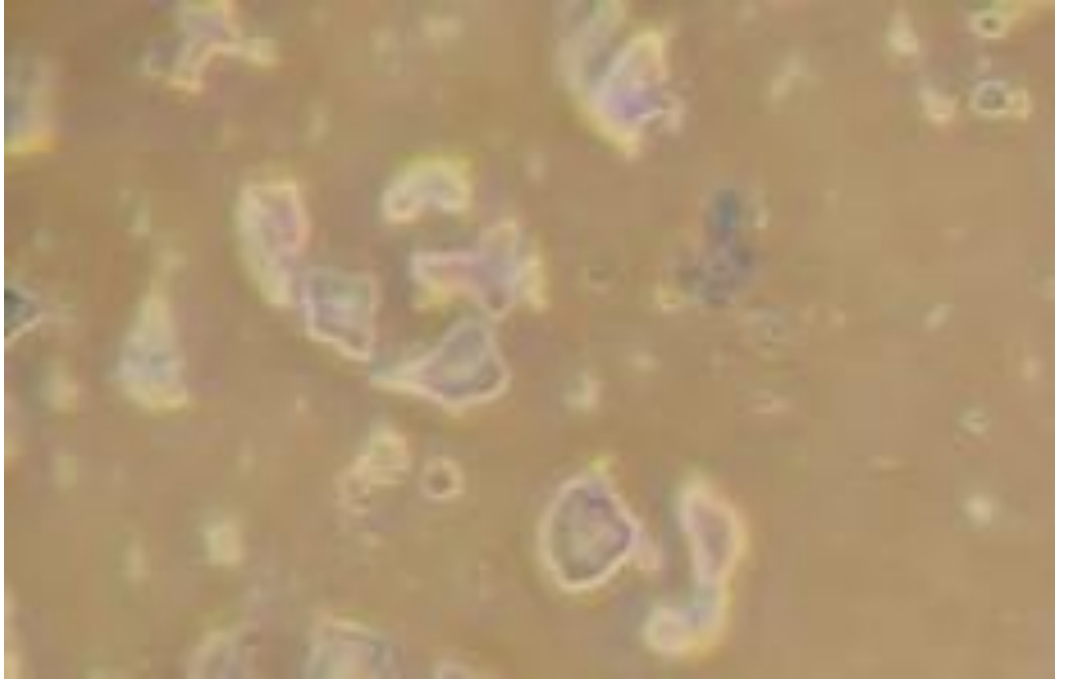
Adiposit kültür plaklarında konfluens elde edildiğinde hücreler tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak plaklardan ayrıldı. Aynı zamanda preadiposit aşamasında dondurulmuş hücreler çözülerek enjeksiyon için hazırlandı. Santrifüj edilerek hazırlanan preadiposit ve adiposit hücre süspansiyonlarından alınan örneklere hücre sayımı yapıldı. Mililitresinde 10×10^5 hücre olacak şekilde, hücreler PBS ile süspande edildi ve 1 ml'lik hücre süspansiyonları enjeksiyona hazır hale getirildi.



Resim 3: Preadipositlerin kültürün üçüncü günündeki mikroskopik görünümü (x4 büyütme)



Resim 4: Preadipositlerin kültürün beşinci gününde mikroskopik görünümü (x4 büyütme)



Resim 5: Diferensiyasyon medyumuna uygulanmış preadipositlerin adipositlere doğru diferensiyasyonunu gösteren granüler görünümde artış (x4 büyütme)

3.4. Dördüncü Aşama

3.4.1. Hücre Süspansiyonlarının Enjeksiyonu

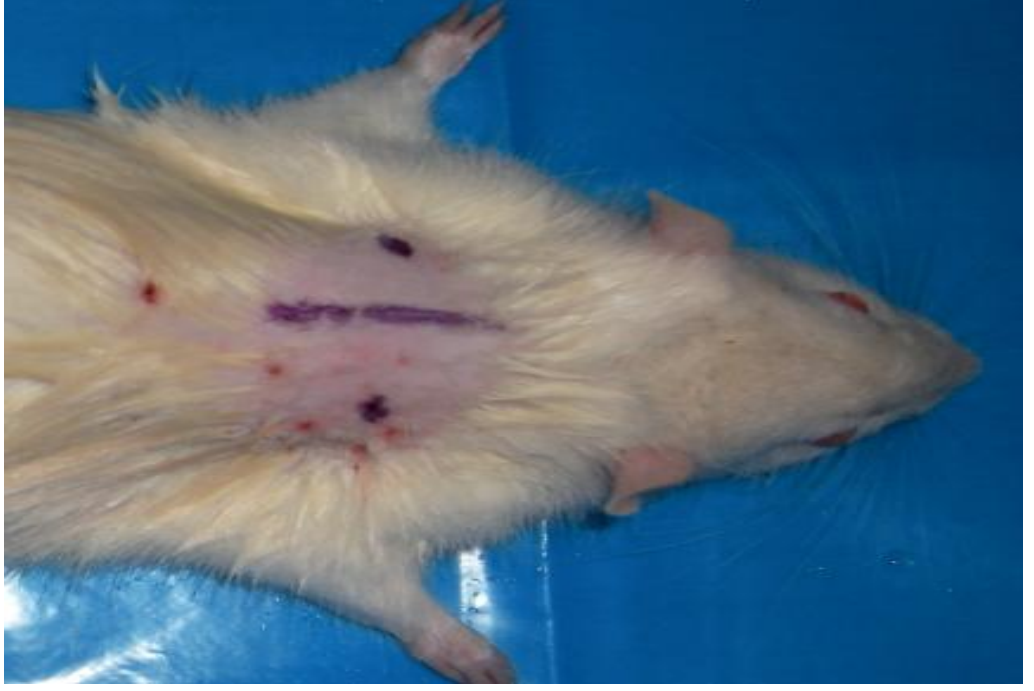
Hücre süspansiyonlarının enjeksiyonunda Marler ve arkadaşlarının geliştirdiği hayvan modeli referans alındı (24).

Ratlara tekrar anestezi verilerek, steril koşullar altında skapular bölgeleri bilateral olarak traş edildi. İnterskapular bölge orta hat işaretlendikten sonra hücre süspansiyonlarının enjekte edileceği sağ ve sol skapular bölgeler işaretlendi (Resim 6). Yirmi gauge anjioket ucu işaretli alana gelecek şekilde orta hattan subkutanöz olarak yerleştirildi. On ml'lik enjektörün uç kısmı kesilerek, gövde kısmı sağ skapular bölgedeki işaretli alana yerleştirildi. Enjektörün pistonu çekilerek dokuya vakum uygulanırken, sağ skapular bölgeye 1 ml'lik preadiposit hücre süspansiyonu yavaşça enjekte edildi. Enjektörle vakum uygulaması 3 dk boyunca sürdürüldü (Resim 7). Aynı yöntem kullanılarak sol skapular bölgeye 1 ml adiposit hücre süspansiyonu enjekte edildi.

Enjeksiyon sonrası hayvanlar değerlendirilmenin yapılacağı zaman göre her grupta 8 adet rat bulunacak şekilde 4 gruba ayrıldı :

- Birinci grup: Enjeksiyondan 4 hafta sonra değerlendirilecek grup (n=8).
- İkinci grup: Enjeksiyondan 2 ay sonra değerlendirilecek grup (n=8).
- Üçüncü grup: Enjeksiyondan 3 ay sonra değerlendirilecek grup (n=8).
- Dördüncü grup : Enjeksiyondan 6 ay sonra değerlendirilecek grup (n=8).

Preadiposit ve adiposit enjeksiyonları sırasında hayvanlarda herhangi bir komplikasyona gözlenmedi.



Resim 6: Sağ ve sol skapular bölgedeki enjeksiyon alanlarının işaretleme



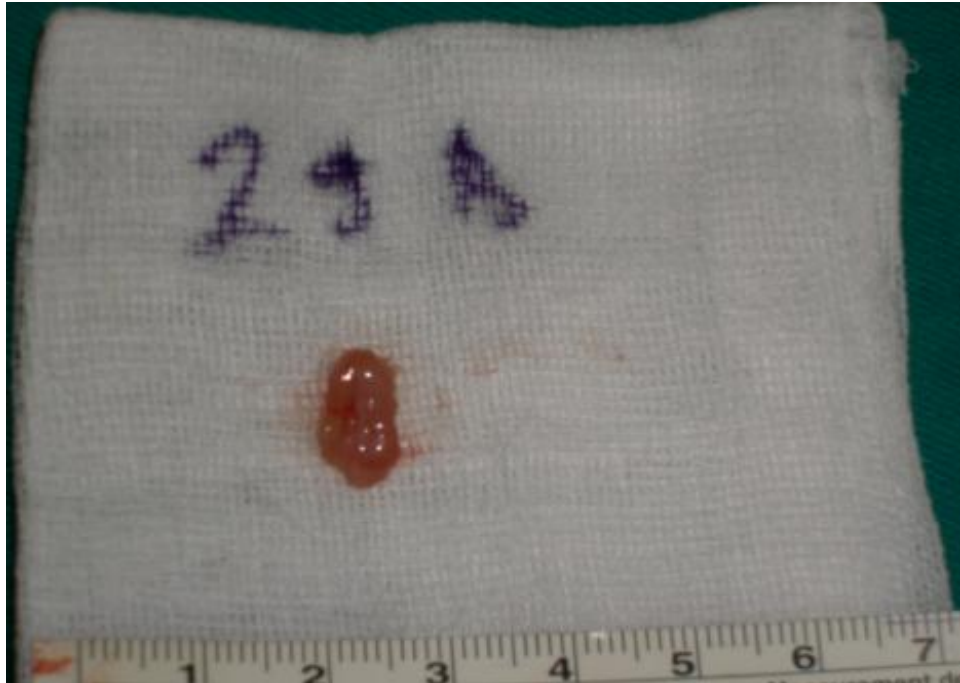
Resim 7: Enjeksiyon sonrası negatif basınç uygulaması

3.5. Beşinci Aşama

3.5.1. Enjeksiyon Bölgelerinin Değerlendirilmesi

Birinci gruptaki hayvanlar enjeksiyondan 4 hafta sonra, ikinci gruptaki hayvanlar enjeksiyondan 2 ay sonra, üçüncü gruptaki hayvanlar enjeksiyondan 3 ay sonra, dördüncü gruptaki hayvanlar enjeksiyondan 6 ay sonra sağ ve sol skapuler bölgedeki yağ örnekleri eksize edildikten sonra yüksek doz ketamin verilerek sakrifiye edildi. Enjeksiyon bölgelerine ulaşmak için interskapular bölgeden orta hat insizyonu ile girilerek sağ ve sol skapular bölge cildi lateral tabanlı flepler şeklinde kaldırıldı. Öncelikle sağ skapuler bölgedeki preadiposit hücre enjeksiyon alanı değerlendirildi ve implantlara pannikulus carnosus ve paralumbar fasya arasındaki boşlukta ulaşıldı ve görünen beyaz yağ doku oluşumları eksize edildi (Resim 8). Aynı işlemler sol skapular bölgedeki adiposit enjeksiyon alanı için tekrarlandı.

Eksize edilen hemi-elips şeklindeki her bir implantın boyutu en, boy ve yüksekliği santimetre cinsinden ölçülerek kaydedildi. Örnekler % 10 formaldehit içeren solüsyona konuldu ve histopatolojik değerlendirme için Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı 'na gönderildi.



Resim 8: Preadiposit enjeksiyon grubundan eksize edilen yağ örneği

3.6. Hacim Değerlendirmesi

Eksize edilen implantların hacim değerlendirmesi için kaydedilen en, boy ve yükseklikleri ölçümleri değerlendirildi. Elde edilen implantların volümlerini matematiksel olarak hesaplamak için hemi-elips hacim hesaplama formülü $(2/3\pi)(r^1)(r^2)(r^3)$ (r^1 ; genişliği, r^2 ; boyu, r^3 ; yüksekliği ifade etmektedir) kullanıldı (24). Kültüre preadiposit enjeksiyonu ve kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ örneklerinin hacimleri; birbirleriyle ve eksizyon zamanına göre oluşturulan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldı.

3.7. Histopatolojik Değerlendirme

Patoloji laboratuvarına gönderilen doku örnekleri, fiksasyon için % 10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonunda bir gece bekletildi. Yağ dokusu örnekleri kasetlendi ve rutin doku takibi sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler alınarak ve hemotoksilen-eozin ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında deney gruplarını bilmeyen bir patolog tarafından değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede nekroz varlığı, fibrozis varlığı, vaskülarite değişiklikleri, kist oluşumu ve mast hücre yoğunluğu kriter alınarak olarak alındı ve bulguların değerlendirmesini kolaylaştırmak için bir skorlama sistemi hazırlandı (Tablo I). Skorlama sisteminde yer alan mast hücre yoğunluğu, üç büyük büyütme alanında (x40) toplam mast hücre sayısına göre bulunmuştur. Elde edilen mast hücre sayısı 0-10 arasında ise; hücre yoğunluğu az, 10-20 hücre arasında ise; yoğunluk normal ve >20 hücre ise; yoğunluk artmış olarak değerlendirildi. Kültüre preadiposit enjeksiyonu ve adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ örneklerinin toplam histopatolojik skorları birbirleriyle ve eksizyon zamanına göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırıldı.

Tablo I : Histopatolojik Değerlendirme Skorlaması

Değerlendirilen Kriter	Skor		
	0	1	2
Nekroz	Yok	Az	Geniş
Fibrozis	Yok	Az	Geniş
Vaskülarite	Artmış	Normal	Az
Kist oluşumu	Yok	Mikrokist	Makrokist
Mast hücre yoğunluğu	Az (0-10 hücre)	Normal (11-20 hücre)	Artmış (> 20 hücre)

3.8. İstatistiksel Analizler

Tüm sonuçlar ortalama \pm SD ve median (minimum-maksimum) olarak ortaya konuldu. Veriler Kruskal-Wallis ANOVA ve Dunn multipl karşılaştırma posttest'i ile analize edildi. İstatistiksel analiz GraphPad InStat 3.0 (San Diego, CA, USA) ve SPSS 16.0 istatistik yazılımı kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hacim Değerlendirmesi

4.1.1. Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarının Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması

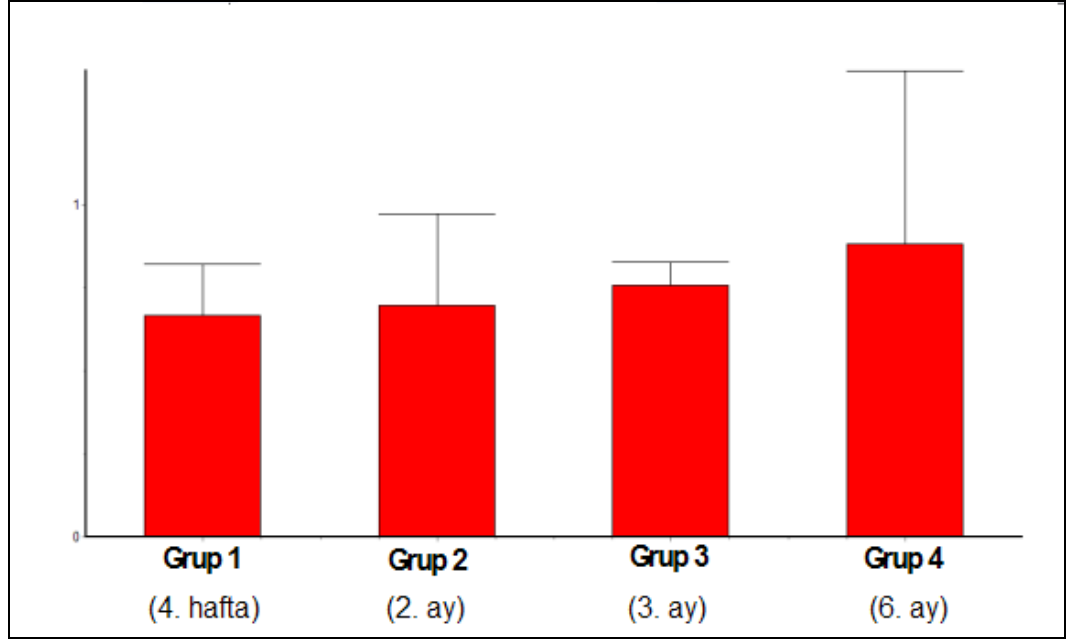
Kültüre preadiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ dokusu hacimlerindeki zamana göre değişiklikler Tablo II’de gösterilmiştir. Elde edilen yağ örneklerinin hacimleri zamana göre artış göstermekle birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo III). Şekil 7’de kültüre preadiposit gruplarından elde edilen yağ doku hacim değişiklikleri grafikte gösterilmiştir. Resim 9’da kültüre preadiposit enjeksiyonu uygulanan sağ skapular bölgede saptanan yağ dokusu görülmektedir.

Tablo II: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacimleri

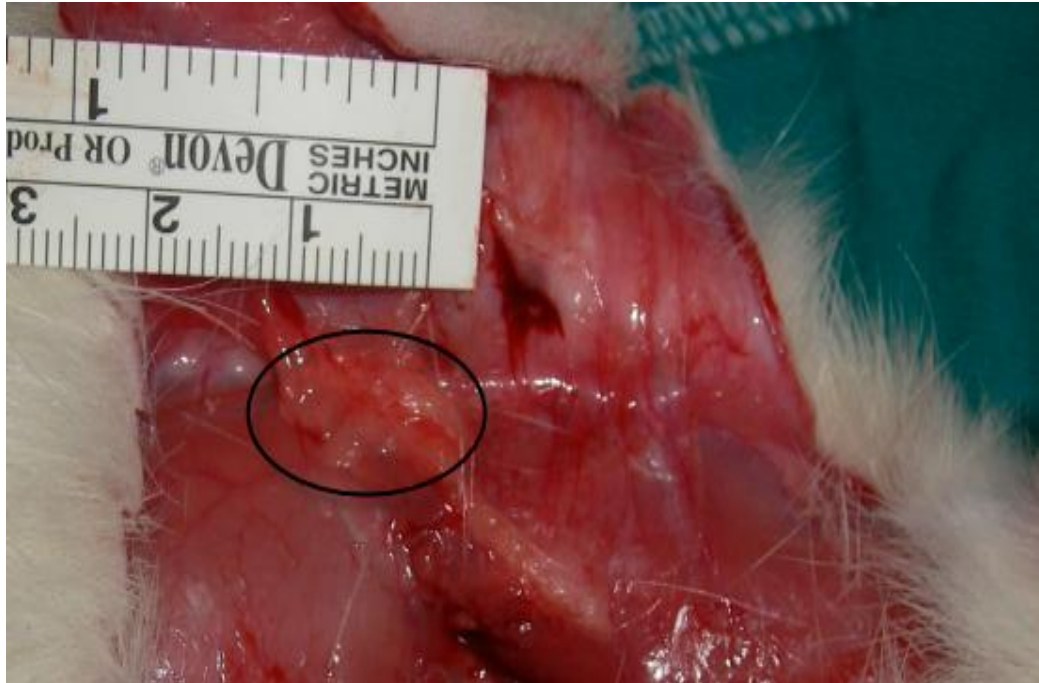
Grup	Ortalama \pm SD (cm ³)	Median (cm ³)	Minimum - maksimum (cm ³)
1. grup	0,67 \pm 0,16	0,66	0,42 – 0,89
2. grup	0,70 \pm 0,27	0,63	0,45 – 1,32
3. grup	0,76 \pm 0,07	0,76	0,66 – 0,88
4. grup	0,88 \pm 0,52	0,68	0,43 – 2,10

Tablo III: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
1. grup ile 2. grup	0,03	p>0,05	
1. grup ile 3. grup	0,08	p>0,05	
1. grup ile 4. grup	0,21	p>0,05	
2. grup ile 3. grup	0,05	p>0,05	
2. grup ile 4. grup	0,18	p>0,05	
3. grup ile 4. grup	0,13	p>0,05	



Şekil 7: Kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ dokularının hacim değişikliklerinin grafikte gösterilmesi



Resim 9: Kültüre preadiposit enjeksiyon grubunda saptanan yağ dokusu

4.1.2. Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması

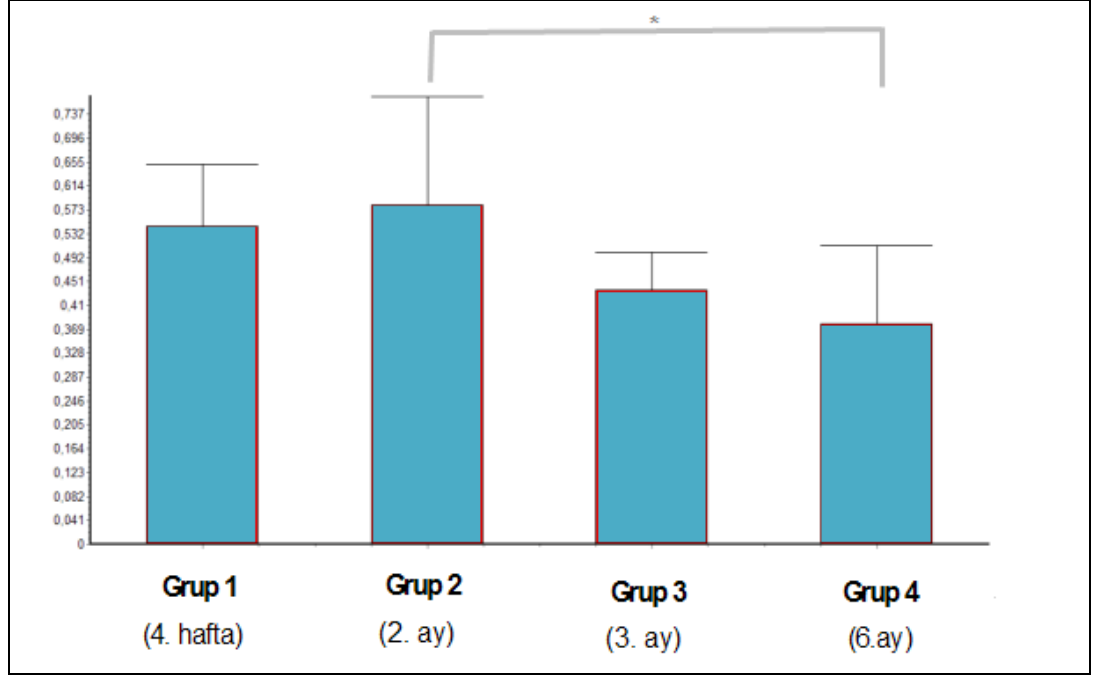
Kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ dokusu hacimlerindeki zamana göre değişiklikler Tablo IV’de gösterilmiştir. Elde edilen yağ örneklerinin hacimleri zamana göre azalma göstermektedir ve 2 ve 4. gruplar arasındaki hacim azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo V). Şekil 8’de kültüre adiposit gruplarından elde edilen yağ doku hacim değişiklikleri grafikte gösterilmiştir. Resim 10’da kültüre adiposit enjeksiyonu uygulanan sol skapular bölgede saptanan yağ dokusu görülmektedir.

Tablo IV: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacimleri

Grup	Ortalama \pm SD (cm ³)	Median (cm ³)	Minimum- maksimum (cm ³)
1. grup	0,55 \pm 0,10	0,51	0,43 – 0,72
2. grup	0,58 \pm 0,19	0,55	0,42 – 1,00
3. grup	0,44 \pm 0,07	0,43	0,37 – 0,58
4. grup	0,38 \pm 0,13	0,38	0,22 – 0,62

Tablo V: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değişikliklerinin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
1. grup ile 2. grup	0,03	p>0,05	
1. grup ile 3. grup	- 0,11	p>0,05	
1. grup ile 4. grup	- 0,17	p>0,05	
2. grup ile 3. grup	- 0,14	p>0,05	
2. grup ile 4. grup	- 0,20	p<0,05	*
3. grup ile 4. grup	- 0,06	p>0,05	



* $p < 0,05$

Şekil 8: Kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ dokularının hacim değişikliklerinin grafikte gösterilmesi



Resim 10: Kültüre adiposit enjeksiyon grubunda saptanan yağ dokusu

4.1.3. Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Hacimlerinin Birbirleri ile Karşılaştırılması

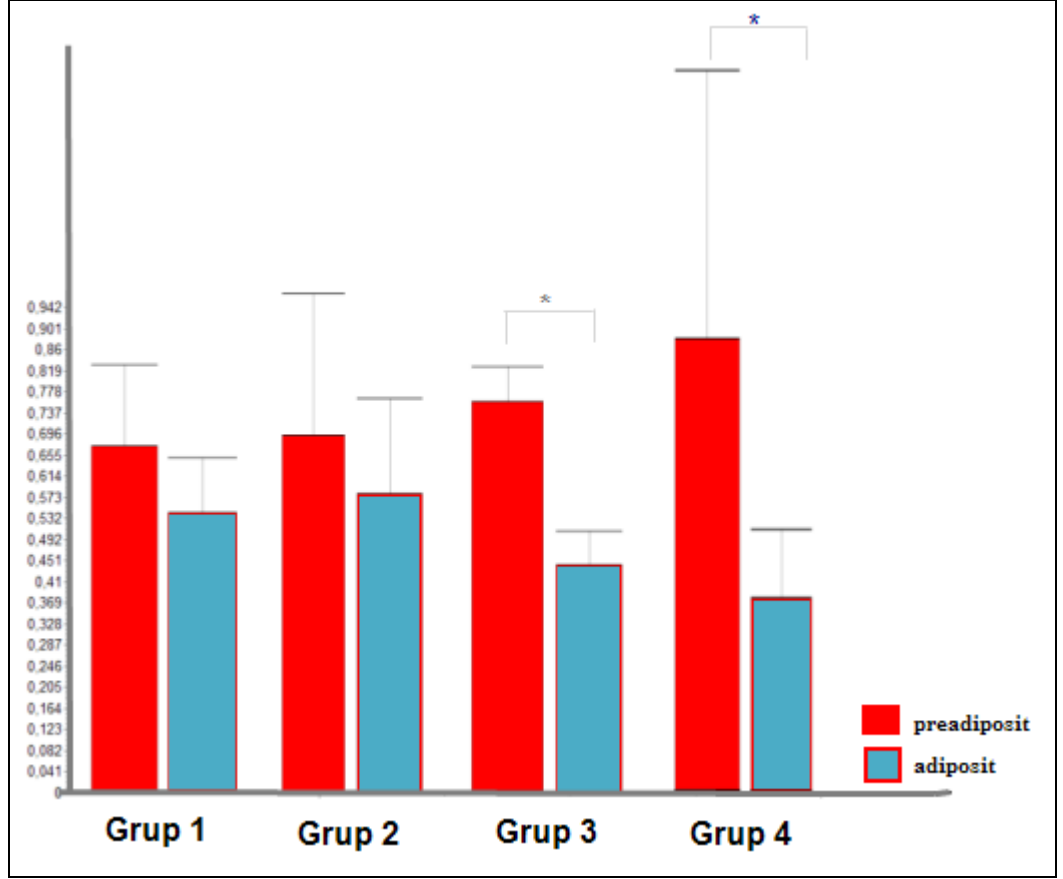
Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ dokularının hacimleri Tablo VI’da gösterilmiştir. Elde edilen hacim değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında; kültüre preadiposit gruplarındaki hacim değerleri kültüre adiposit gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur ve 3. ve 4. gruplar arasındaki hacim farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo VII). Şekil 9’da kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin hacim değerlerinin karşılaştırılması grafikte gösterilmiştir.

Tablo VI: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değerleri

Grup	Kategori	Ortalama \pm SD (cm ³)	Median (cm ³)	Minimum- maksimum (cm ³)
1	Preadiposit	0,67 \pm 0,16	0,66	0,42 – 0,89
	Adiposit	0,55 \pm 0,11	0,51	0,43 – 0,72
2	Preadiposit	0,70 \pm 0,27	0,63	0,45 – 1,32
	Adiposit	0,58 \pm 0,19	0,55	0,42 – 1,00
3	Preadiposit	0,76 \pm 0,07	0,76	0,66 – 0,88
	Adiposit	0,44 \pm 0,07	0,43	0,37 – 0,58
4	Preadiposit	0,88 \pm 0,52	0,68	0,43 – 2,10
	Adiposit	0,38 \pm 0,13	0,38	0,22 – 0,62

Tablo VII: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Hacim Değerlerinin Birbirleri ile Karşılaştırılması

Hacimler	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
Preadiposit 1. Grup – Adiposit 1. Grup	0,12	p>0,05	
Preadiposit 2. Grup – Adiposit 2. Grup	0,12	p>0,05	
Preadiposit 3. Grup – Adiposit 3. Grup	0,32	p<0,05	*
Preadiposit 4. Grup – Adiposit 4. Grup	0,50	p<0,05	*



* $p < 0,05$

Şekil 9: Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ doku hacim değerlerinin birbirleri ile karşılaştırılmasının grafikte gösterilmesi

4.2. Histopatolojik Değerlendirme

4.2.1. Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarının Histopatolojik Değerlendirme

Toplam Skorlarının Karşılaştırılması

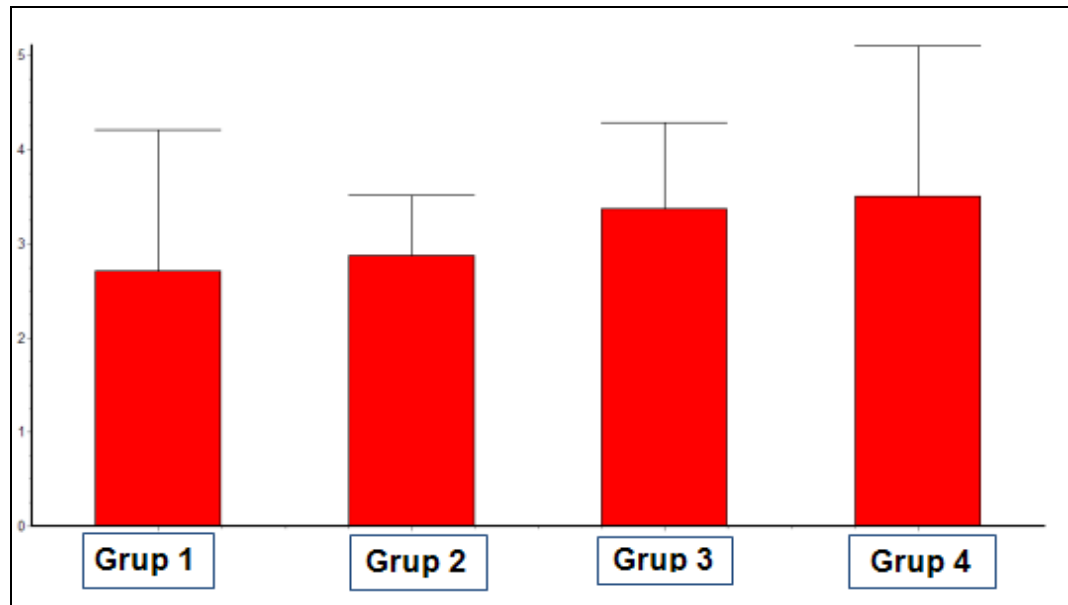
Kültüre preadiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ doku örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorları Tablo VIII'de gösterilmiştir. Elde edilen histopatolojik değerlendirme toplam skorları karşılaştırıldığında; ortalama toplam skorlar değerlendirme zamanına göre oluşturulan gruplar arasında artış gösterse de, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo IX). Şekil 10'da kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarının, toplam skorlarının karşılaştırılması grafikte gösterilmiştir. Resim 11'de kültüre preadiposit enjeksiyon bölgesinden elde edilen sağlıklı yağ dokusunun mikroskopik görünümünü gösterilmiştir.

Tablo VIII: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorları

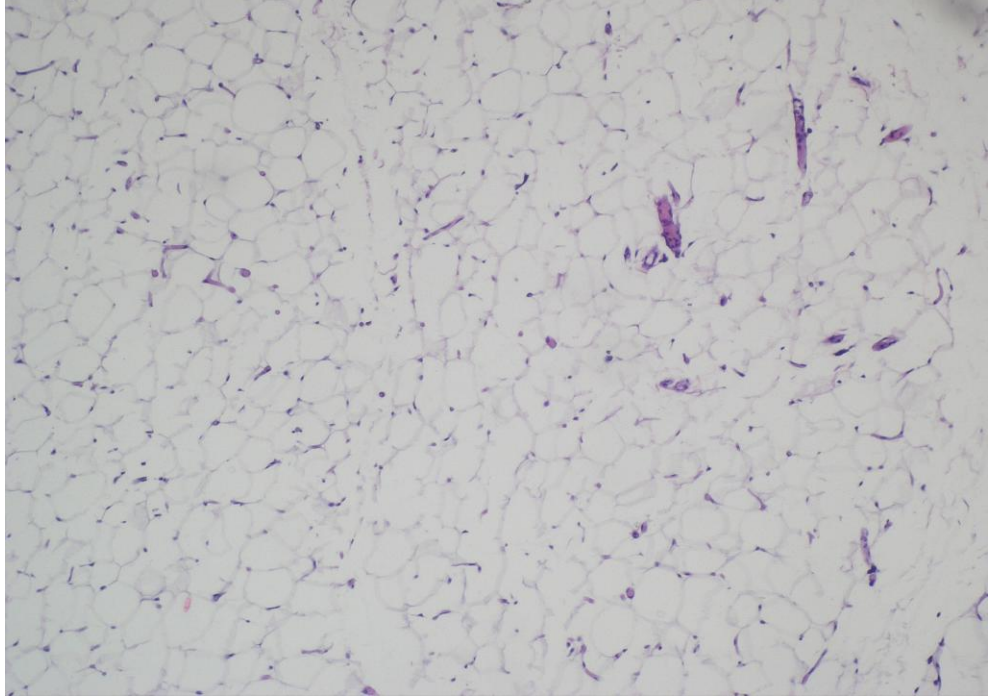
Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum- maksimum
1. grup	2,71 \pm 1,50	3,0	1,0 – 5,0
2. grup	2,88 \pm 0,64	3,0	2,0 – 4,0
3. grup	3,38 \pm 0,92	3,0	2,0 – 5,0
4. grup	3,50 \pm 1,60	4,0	1,0 – 5,0

Tablo IX: Kültüre Preadiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
1. grup ile 2. grup	0,17	p>0,05	
1. grup ile 3. grup	0,67	p>0,05	
1. grup ile 4. grup	0,79	p>0,05	
2. grup ile 3. grup	0,50	p>0,05	
2. grup ile 4. grup	0,62	p>0,05	
3. grup ile 4. grup	0,12	p>0,05	



Şekil 10: Kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının grafiklerle karşılaştırılması



Resim 11: Kültüre preadiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen normal görünümde yağ dokusunun mikroskopik görünümü (Hemotoksilen-eosin boyama, x40 büyütme)

4.2.2. Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması

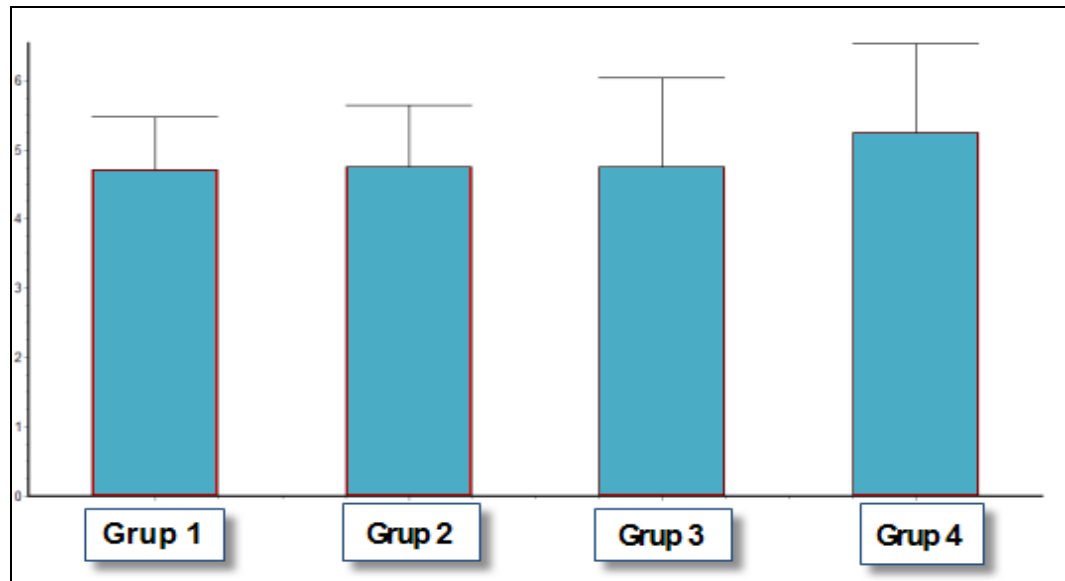
Kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ doku örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorları Tablo X’de gösterilmiştir. Elde edilen histopatolojik değerlendirme toplam skorları karşılaştırıldığında; ortalama toplam skorlar değerlendirme zamanına göre oluşturulan gruplar arasında minimal düzeyde artış göstermiştir fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo XI). Şekil 11’de kültüre adiposit enjeksiyon gruplarının, toplam skorlarının karşılaştırılması grafikte gösterilmiştir. Resim 12’de kültüre adiposit enjeksiyonu bölgesinden elde edilen yağ dokusunun mikroskopik görünümü gösterilmiştir.

Tablo X: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorları

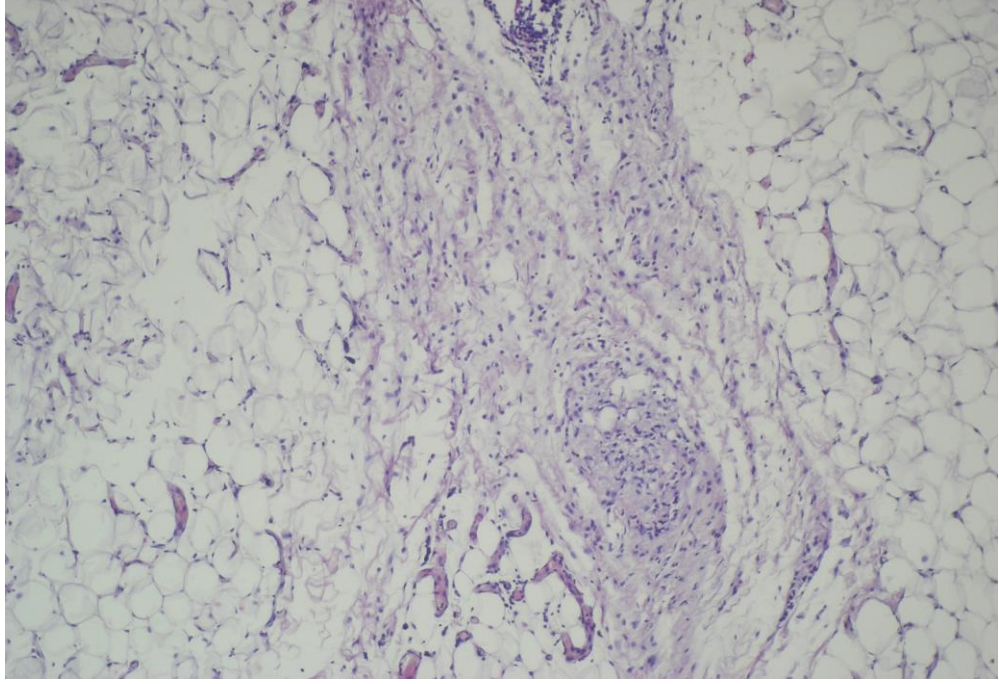
Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum- maksimum
1. grup	4,71 \pm 0,76	5,0	4,0 – 6,0
2. grup	4,75 \pm 0,89	4,5	4,0 – 6,0
3. grup	4,75 \pm 1,28	4,5	3,0 – 7,0
4. grup	5,25 \pm 1,28	5,0	4,0 – 7,0

Tablo XI: Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
1. grup ile 2. grup	0,04	p>0,05	
1. grup ile 3. grup	0,04	p>0,05	
1. grup ile 4. grup	0,54	p>0,05	
2. grup ile 3. grup	0	p>0,05	
2. grup ile 4. grup	0,50	p>0,05	
3. grup ile 4. grup	0,50	p>0,05	



Şekil 11: Kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının grafikte karşılaştırılması



Resim 12: Kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ doku örneğinin mikroskopik değerlendirmesi: Normal görünümde yağ hücreleri çevresinde fibrotik alanlar görülmektedir (Hemotoksilen-eozin boyama x40 büyütme).

4.2.3. Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarının Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Birbirleri ile Karşılaştırılması

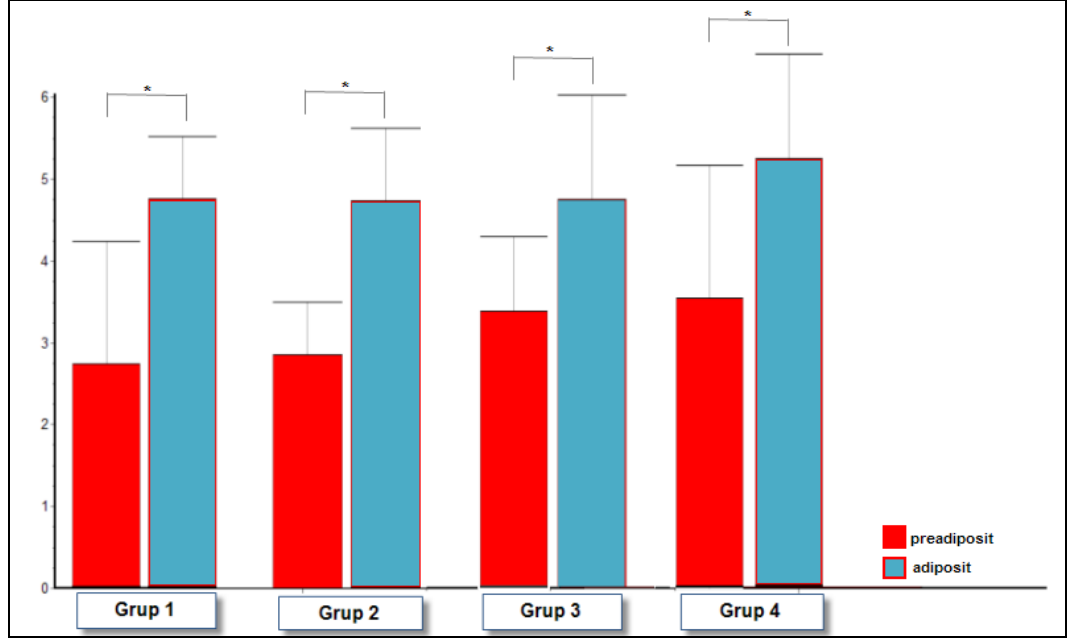
Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyonu sonucu elde edilen yağ doku örneklerinin histopatolojik toplam değerlendirme skorları Tablo XII'de gösterilmiştir. Elde edilen toplam skor değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında; kültüre preadiposit gruplarındaki değerler tüm gruplarda kültüre adiposit gruplarına göre daha düşük bulunmuştur ve gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo XIII). Şekil 12'de kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının karşılaştırılması grafikte gösterilmiştir. Resim 12 ve 13'de preadiposit enjeksiyon bölgesinden elde edilen yağ doku örneklerindeki vasküler yapılarda ve mast hücre sayısında artış gösterilmiştir..

Tablo XII: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorları

Grup	Kategori	Ortalama \pm SD	Median	Minimum- maksimum
1	Preadiposit	2,71 \pm 1,50	3,0	1,0 – 5,0
	Adiposit	4,71 \pm 0,76	5,0	4,0 – 6,0
2	Preadiposit	2,88 \pm 0,64	3,0	2,0 – 4,0
	Adiposit	4,75 \pm 0,89	4,5	4,0 – 6,0
3	Preadiposit	3,38 \pm 0,92	3,0	2,0 – 5,0
	Adiposit	4,75 \pm 1,28	4,5	3,0 – 7,0
4	Preadiposit	3,50 \pm 1,60	4,0	1,0 – 5,0
	Adiposit	5,25 \pm 1,28	5,0	4,0 – 7,0

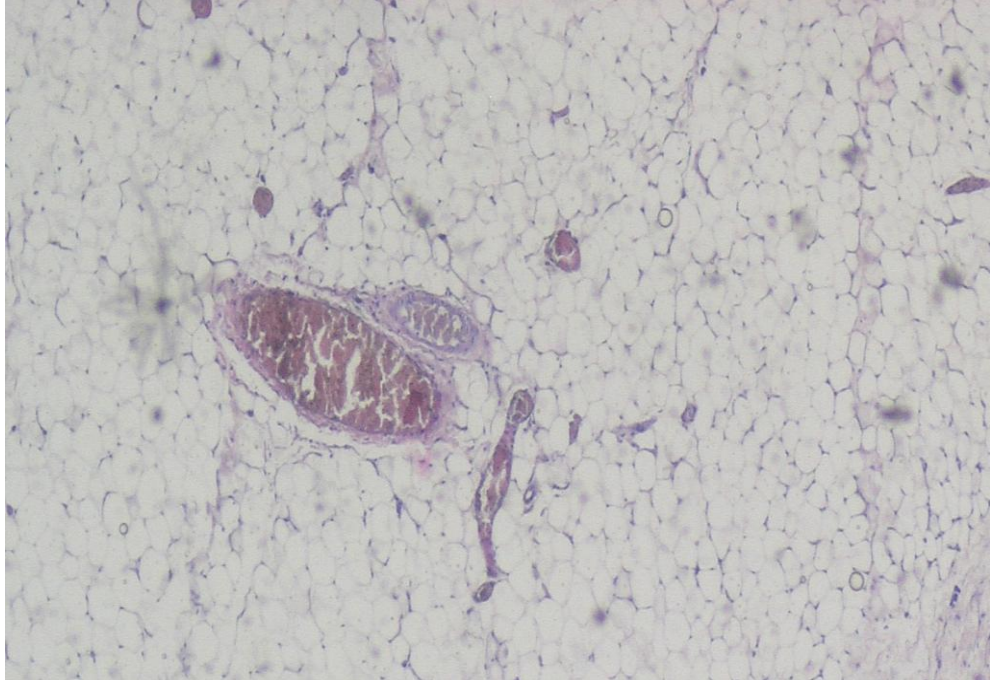
Tablo XIII: Kültüre Preadiposit ve Kültüre Adiposit Enjeksiyon Gruplarından Elde Edilen Yağ Doku Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması

Toplam skor	Ortalama sınıf farkı	P değeri	Anlamlı
Preadiposit 1. Grup – Adiposit 1. Grup	2,00	p<0,05	*
Preadiposit 2. Grup – Adiposit 2. Grup	1,87	p<0,05	*
Preadiposit 3. Grup – Adiposit 3. Grup	1,37	p<0,05	*
Preadiposit 4. Grup – Adiposit 4. Grup	1,75	p<0,05	*

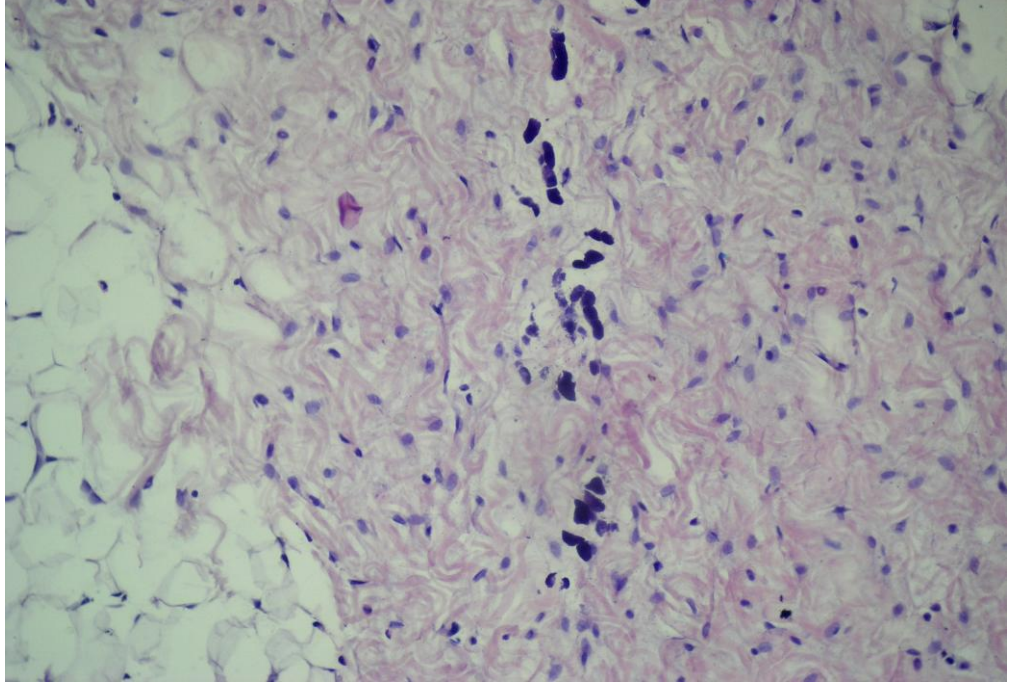


* $p < 0,05$

Şekil 12: Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ doku örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorlarının karşılaştırılmasının grafikte gösterilmesi



Resim 13: Kültüre preadiposit enjeksiyon bölgesinden elde edilen yağ dokusunun mikroskopik değerlendirmesi: Artmış vaskülerite görülmektedir (Hemotoksilen-eozin boyama x40 büyütme).



Resim 14: Kültüre preadiposit enjeksiyon bölgesinden elde edilen yağ dokusunun mikroskopik değerlendirmesi: Mast hücre sayısında belirgin artış görülmektedir (Hemotoksilen-eozin boyama x100 büyütme).

5. TARTIŞMA

Çok sayıda hastada; yanık, avulsiyon, konjenital anomali veya cerrahi sonrası oluşan travmalar gibi pek çok nedene bağlı yumuşak doku kaybına rastlanır. Bu defektlerin rekonstrüksiyonu zor ve uğraştırıcıdır. Plastik cerrahide eksik olan dokuların benzer olan dokularla onarılması prensipi yaygın olarak kabul edilmektedir (17). Çoğu vakada memnuniyetsizliğin sebebi subkutanöz adipoz doku yokluğu veya kaybıdır. Yumuşak dokudaki bu eksikliği onarmaya yönelik lokal ve serbest flepler, dermal yağ greftleri, sentetik materyaller ve otolog yağ doku greftleri gibi pek çok yaklaşım tanımlanmıştır. Bu olası yaklaşımların çoğu belirgin dezavantajlara sahiptir (1). Son zamanlarda minimal invazif yaklaşımların yaygınlaşmasıyla yumuşak doku defektlerinin onarımında enjekte edilebilir materyaller daha çok tercih edilmektedir. Sentetik dolgu materyallerinin çeşitliliğine rağmen ideal materyal kriterlerinin tümünü karşılayan ürün bulunmamaktadır (13). Bu materyallerin çoğunda yabancı cisim reaksiyonu, doğal olmayan görünüm, tutarlı ve kalıcı etki oluşturamama gibi sorunlarla karşılaşmaktadır (59). Ek olarak bu ürünlerin çoğu pahalıdır.

Yumuşak doku defektlerinin onarımında, hastanın kendi dokularının kullanımı her zaman en çok tercih edilen seçenek olmuştur (42). Otolog dokular ideal dolgu maddesi özelliklerinin çoğunu karşılamaktadır (13). Otolog yağ dokusu transplantasyonu, 1893'den bu yana değişken başarı oranları ile plastik cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır (44). Yağ dokusu, ihtiyaç duyulduğunda vücutta kullanılabilir en doğal dokudur. Yüz ve vücuttaki, her boyuttaki yumuşak doku defekti yağ greftleri ile doldurulabilmektedir. Yağ dokusu; kolay ve gereken miktarda bulunabilme, mükemmel doku uyumu, allerjik reaksiyonlara neden olmama ve basit ve düşük morbiditeli bir prosedür ile temin edilebilme avantajlarına sahiptir (37-39).

Hastanın kendi yağ dokusunun kullanılması pek çok avantaj sunsa da bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yağ doku transferi çok aşamalı bir prosedürdür ve çok sayıda yağ transplantasyon prosedürü geliştirilmesine rağmen, kabul edilmiş standart bir prosedür bulunmamıştır (41, 60). Yağ greftlemede en iyi teknik, uzun süreli veri veya diğer klinik parametreler konusunda konsensus sağlanamamıştır. Amerikan Estetik Plastik Cerrahi Derneği'nin yaptığı son ulusal konsensus anketi; yağ grefti elde etme, hazırlama, uygulama tekniklerini ve kısa ve uzun dönem sonuç algıları ile ilgili 508 cerrahi sorgulamıştır (7, 22). Anket sonucunda, otolog yağ transferi oldukça yaygın uygulanan bir prosedürken, çok

az cerrahın birbirine tamamen özdeş teknik kullandığı ve yüksek volüm uygulaması yaptığı bulunmuştur. Bu sonuç yağ greftleri konusunda yaşanan tutarsızlığın göstergesidir.

Otolog yağ doku transplantasyonlarında karşılaşılan diğer bir sorun; yağ greftlerinin kalıcılığıdır. Yağ grefti uygulamaları tartışmaya açıktır ve tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır; bazı cerrahlar etkileyici sonuçlar elde ederken diğerleri hayal kırıklığına uğramaktadır. Yağ grefti uygulamalarının kalıcılığı ile ilgili üç ekol mevcuttur:

- yağ greftleri kalıcı değildir,
- yağ greftleri kalıcıdır,
- yağ greftleri tekrarlayan enjeksiyonlar uygulandığında kalıcıdır (49).

Pek çok çalışmada yağ greftlerinin kalıcı olmadığı, bir yıl içerisinde % 30-70 resorbe olduğu ve fibröz doku ve yağ kisti ile yer değiştirerek, belirsiz sonuçlara neden olduğu raporlanmıştır (1, 4, 61). Bu durumu açıklamak için çeşitli teoriler ileri sürülmüştür (28). Greft uygulaması sonrası öncelikle yara iyileşme süreci gerçekleşmekte, greftlenen yağ doku ve çevresinde kontraksiyon güçleri etkili olmaktadır (61). Ayrıca bu evrede greft çevre dokusunda yeni damar oluşumu meydana gelmektedir. Anjiogenezis ortama alıcı yatağın tüm büyüme faktörlerini de taşımaktadır. Bu yeni damar oluşumu başlangıçta sınırlı bir alanı etkilediğinden greftin iç bölgelerinde apoptoz, hücre ölümü ve doku nekrozuyla sonuçlanmaktadır (28, 62). Bu süreç sonucunda greft boyutunu azaltarak yeniden yapılanmaya başlar (63). Hücrelerdeki volüm kaybı veya adiposit atrofisinin de yağ greftlerinin başarısını etkilediği düşünülmektedir (63).

Yağ greftlerinin kalıcı olduğunu savunan Coleman; 1997 yılında tanımladığı tekniğiyle, küçük miktarlarda yağ dokusunun, alıcı yatakta oluşturulan çok sayıda tünel içerisine yerleştirilmesinin başarılı estetik düzeltme için en etkili yöntem olduğunu savunmuştur (43). Coleman, başarılı üç boyutlu şekillendirmenin; hastanın uygun hazırlanmasına, dikkatli ve titiz planlamaya bağlı olduğunu vurgulamıştır. Yağ dokusu künt uçlu kanül yardımıyla ve düşük basınçlı liposuction yöntemiyle alınarak, kan ve sıvılaşmış yağ ayrıldıktan sonra iğne yardımıyla, çoklu tabakalar şeklinde enjekte edilmiştir (44). Coleman'a göre oluşturulan çok sayıda tünel içerisine küçük miktarlarda yağ doku yerleştirilmesi, yağ doku yaşayabilirliğini artırma ve uygun estetik düzeltim için gereken unsurların çoğunu yerine getirmektedir (44). Günümüzde yağ yapılandırma metodu; yüz bölgesinin şekillendirilmesinde otolog yağı kullanan güvenilir ve uzun etkili bir metod olarak görülmektedir (36). Çoklu tabaka şeklinde enjeksiyon uygulanırken oluşturulan travma ve

bunun sonucunda oluşan enflamatuvar yanıtın, uzun dönem sonuçlardan sorumlu olduğu savunularak eleştirilmiştir (5).

Yağ grefti uygulamalarında karşılaşılan sorunlardan birisi transplante edilen yağın kalıcılığı ile ilgili literatürde çok az sayıda objektif çalışma bulunmasıdır (43). Sonuçları objektif bir biçimde dökümente edecek pratik bir metod bulunamamıştır. Kalıcılık değerlendirme konusunda yapılan çalışmaları birbiriyle karşılaştırmak zordur çünkü farklı araştırmacılar farklı yağ elde etme teknikleri, farklı işleme ve enjeksiyon teknikleri ve farklı sonuç değerlendirme teknikleri kullanmaktadır (41, 44). Canlı greftleri alıcı metabolizmasıyla etkileşime girmeden işaretleyecek ve canlı ve nekrotik greftlerin oranını ölçecek bir metod bulunamamıştır (64). Bu problemi çözmek için pek çok girişim yapılmış; yağ greftleri değişik hayvan modellerinde fizyolojik olarak yağdan yoksun alıcı sahalara implante edilmeye çalışılmıştır. Fakat bu modellerin klinik uygulaması mümkün olmamıştır.

Sommer ve Sattler; otolog yağ greftleri ile yapılan onarımların süresi ile ilgili tartışmalar üzerinde çalışmıştır (41). Aspire edilen yağ dokusunu histolojik değerlendirmesini yaparak, literatürde bulunan bulgularla karşılaştırmışlardır. Otolog yağ transferi ile yapılan düzeltmenin klinik uzunluğunun; canlı yağ hücre sayısı ve oluşturulan fibrozisin derecesiyle belirlendiği saptanmıştır. Aspire edilen yağ hücre greftlerinin survisi; temel olarak alıcı sahanın anatomik yerine, mobilitesine ve vasküleritesine, altta yatan sebep ve hastalıklara ve daha az olarakta yağ alma ve yeniden enjekte etme metoduna bağımlı bulunmuştur.

Yağ dokusunun iskemiye toleransı çok düşüktür (65). Hedef adipositin yaşamasını sağlamaktır ve bunu etkileyen pozitif ve negatif faktörler isimlendirilmelidir. Bu faktörlerin her biri bir noktaya kadar araştırılmış fakat kesin cevaplar bulunamamıştır. Sonuçları iyileştirmek için yağ örnekleri daha az travmatik teknikler kullanılarak alınmış, elde edilen örnekler küçük fragmanlara ayrılmış, greft revaskülerizasyonunu artırmak için daha iyi vaskülerize alıcı sahalara tercih edilmeye çalışılmıştır. En uzun transplant yaşayabilirliğini sağlama hedefiyle, doku elde edilmesinde, işlenmesinde ve transferinde alternatif teknikler geliştirilmiştir.

Liposakşın metodu, aspire edilen yağın hazır donör materyali olarak kullanımına izin vermiştir. Bu yaklaşımın teorikteki yararı kanüler aspirasyonla partikül haline getirilen yağın greft revaskülerizasyonunda iyileşme sağladığının düşünülmesidir (10). Buna rağmen aspirasyon sürecinde oluşturulan hücresel ayrıştırma ile greft hazırlanması, gerçekte yağ doku hücresel beslenmesini iyileştirmemektedir. Mekanik müdahale; pek çok canlı, sağlam

hücrenin ölümüne ve devaskülerize hale gelmesine ve sonuçta fibrozis ile yer değiştirmesine sebep olmaktadır (10).

Tranplante edilen dokuda ilk iskemik hasarı azaltma hedefiyle farklı implantlama teknikleri geliştirilmiştir. Küçük yağ parçaların enjeksiyonu, volüme göre daha geniş alan sağlayarak besleyici akımı en üst düzeye çıkarma amacıyla kullanılmıştır (10). Bazı araştırmacılar intramuskuler alan gibi iyi vaskülerize alıcı saha sağlama yoluyla, ilk rezorbsiyonu azaltarak sınırlı oranda başarı elde etmişlerdir (10). Belirtilen çabalara rağmen 6-9 aylık izlemlerde rezorbsiyon oranları kabul edilemez düzeydedir ve transplante edilen doku önemli miktarda fibrozis ile yer değiştirmiştir. Histolojik kesitler az sayıda yaşayan adiposit ile kistik boşluk kalıntılarını göstermektedir (10).

Greft yaşayabilirliğini artırmaya yönelik son girişimler alternatif işleme metodlarının geliştirilmesini içermektedir. Liposakşın prosedürü esnasında uygulanan mekanik kuvvetler adipositlerin %90 kadarında nekroza sebep olabilir (61). Bu nedenle adipoz doku içerisindeki, operasyon stresine dayanıklı, daha yüksek yaşam kapasitesine sahip ve yeterli adipojenik potansiyele sahip alternatif hücre kaynağı ortaya çıkartılmalıdır. Başarı oranlarını artırmak için aspire edilen dokudan bu hücrelerin ayrılması gereklidir. Ek olarak operasyon sırasında elde edilen canlı hücre sayısı artırılmalıdır (61).

Son zamanlarda hücre kültürü ve doku mühendisliği alanındaki ilerlemeler nedeniyle pek çok araştırmacı otolog doku augmentasyonunda matur yağ hücreleri yerine, hücre kültüründe çoğaltılan hücrelerin kullanımını hedeflemektedir. Yağ hücre kültürünün geliştirilmesi adiposit hücre prekürsörlerinin çoğaltılmasına ve transferine olanak sağlamıştır. Kök hücre ve preadiposit çalışmalarına duyulan ilgi bu hücrelerin kullanılmasını teşvik etmiş ve kültürlerinin kolay olması preadiposit çalışmalarına yardımcı olmuştur (10).

Eksize edilen yağ sindirilip santrifüjle ayrıldığında; yüzen tabaka, aselüler üst tabaka ve preadiposit hücrelerini içeren stromal alt tabaka şeklinde üç tabaka elde edilmiştir (10). Bu preadiposit tabakası in vitro kültüre edilebilir ve sonra alıcıya tekrar verilebilir (10). Bu yolla küçük bir biyopsi örneğinden çok sayıda hücre elde edilebilmektedir ve transplantasyon hücreler için optimal beslenmeyi sağlayacak şekilde yapılabilir.

Adiposit öncü hücreleri olan preadipositler; matür beyaz yağ dokusunun stromal-vasküler bölümünün doku kültürleri sürecinde ortaya çıkartılmışlardır (53). Öncü hücrelerin transferi ile ilgili ilk çalışma Wassermann tarafından yapılmış ve immatur yağ yastıkçıklarından farklılaşmamış konnektif doku hücreleri transplante etmiştir (54).

Transplante edilen hücrelerin özelleşmiş hücreler olduğu, diğer fibroblastlardan ayırt edilemediği fakat transplantasyon sonrası yağ depolama yeteneklerinin olduğu bulunmuştur (54). Günümüzde yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip konnektif doku hücrelerine preadiposit olarak adlandırılmaktadır.

Van ve Roncari; adipositlerin morfolojik maturasyonunu çalışabilecekleri bir kültür sistemi geliştirmişler ve preadipositlerin in vitro diferensiyasyon esnasındaki morfolojik basamakları tanımlamışlardır (9, 54). Van ve Roncari, ratlarda hem in vivo hem de in vitro adiposit prekürsörlerinin yetişkin adipositlere dönüşümünü göstermiştir (46).

Björntorp ve ark. 1978 yılındaki yaptıkları çalışmada, ratların epididimal yağ yastığından izole ettikleri hücreleri kültür ortamında çoğaltmışlar ve çalışma sonucunda; rat adipoz dokusu içerisinde, in vitro matür adiposit morfoloji ve fonksiyonunda hücrelere dönüşen, hücrelerin varlığını göstermişlerdir (55). Bu hücrelerin preadipositler veya adipoblastlar olabileceğini ve in vivo veya in vitro adipositlere dönüşebileceklerini ileri sürmüşlerdir (55).

1989 yılında Billing ve May yumuşak doku defektlerini tedavi etmek için preadiposit hücre süspansiyonunun otolog transferinin etkili olabileceği düşüncesini ileri sürmüştür (66).

Adipogenezis, hem anjiogenezis hem de preadipositlerin adipositlere diferensiyasyonunu gerektirir (22). Adipogenezis pek çok aşama içeren kompleks bir süreçtir (22). İlk olarak canlı preadipositler elde edilmelidir. Sonrasında prekürsör hücrelerin in vitro veya in vivo adipositlere diferensiyasyonu gerçekleşmelidir. Son olarak tüm bu aşamalar boyunca canlılığı sürdürebilmek ve yeni adipoz dokunun uzun süreli kalıcılığı için bütün süreç anjiogenezis için uygun bir ortamda gerçekleşmelidir.

Preadipositlerin in vitro ortamda adipositlere diferensiyasyonu gösterilmiş olmasına rağmen in vivo ortamda adipositlere diferensiyasyon konusunda bazı belirsizlikler mevcuttur ve bu konuda incelenmeler devam etmektedir (22). Bu nedenle adipojenik prekürsör hücrelerin implantasyon öncesi çeşitli işlemlere tabi tutularak diferansiye edilmesiyle yani adiposit haline getirilmesiyle in vivo adipoz doku oluşumunun artırılabilceği ileri sürülmüştür (11).

Yeterli miktarda adipoz doku üretilebilmesi için optimal hücre kaynağının seçilmesi zorunludur. Çalışmamızda hücre kültüründe üretilen preadiposit ve adiposit hücre süspansiyonlarının transplantasyonu ile in vivo adipoz doku oluşturulması hedeflenmiştir.

Preadipositler iskemik koşullara ve travmaya daha dayanıklı olsa da in vivo adipojenik dönüşümlerinde sorun yaşanabilmektedir. Kültür ortamında preadipositlerden diferensiyeye edilmiş adipositlerin enjeksiyonu undiferensiyeye preadipositlerden daha sağlıklı yeni adipoz doku oluşturabileceği görüşü de literatürde bulunmaktadır (22). Çalışmamızda kültür ortamında çoğaltılan preadiposit ve adipositlerin otolog transferi sonrası, histolojik özellikleri, adipoz doku oluşturma potansiyelleri ve kalıcı volüm elde edilmesine katkıları karşılaştırılarak, yumuşak doku defektlerinde kullanılabilir ideal hücre tipinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Kültür ortamında hücrelerin çoğaltılması ve diferensiyasyonu için kullanılacak yöntem, seçilen hücre kültür sistemine bağlıdır. Primer preadiposit ve adiposit kültürleri için çeşitli diferensiyasyon protokolleri geliştirilmiştir (16). Farklı preadiposit kültür medyum çalışmaları; DMEM / F12 besiyerinin diğer besiyerlerine üstün olduğunu göstermiştir (22). Fetal sığır serumu (FBS) içerdiği yüksek konsantrasyonda büyüme faktörleri ve besinler ile hücresel çoğalmaya yardımcı olmaktadır (1). Medyuma FBS eklenmesinin hücresel proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir (22). Primer preadiposit kültürlerinde bazal medyum içerisine düşük konsantrasyonda insülin eklenmesi, preadiposit hücre sayısını artırmaktadır (16). Glukokortikoidler ve IBMX gibi ajanlar diferensiyasyonun başlatılması için gereklidir (16, 20). Çalışmamızda bu faktörler göz önünde bulundurularak Harmelan ve ark.'nın (58) tanımladığı yağ hücre kültür protokolü seçilmiştir ve hücrelerin izolasyonunda, proliferasyon ve diferensiyasyon aşamalarında sorun yaşanmamıştır. Hücreler yaklaşık iki hafta süren kültür aşamasından sonra Marler ve ark.'nın (24) tanımladığı hayvan modeline uygun şekilde, hücre süspanسیونları enjekte edilmiştir. Bu hayvan modeli; subkutanöz doku augmentasyonunda farklı hücre kombinasyonlarının karşılaştırılmasına izin verecek şekilde hazırlandığından ve uygulaması kolay olduğundan tercih edilmiştir. Tanımlanan hayvan modelinde enjeksiyon için orta hatta yedinci vertebra düzeyi kullanılmış olup bizim çalışmamızda beyaz yağ dokusundan yoksun olduğu ve preadiposit ve adiposit grupları arasında karşılaştırma yapılması daha pratik olduğu için sağ ve sol skapular bölgeler tercih edilmiştir.

Preadipositler matur adipositlere çoğalabilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahip öncü hücrelerdir (10). Adipoz doku kökenli kök hücreler ve preadipositlerin fiziksel özellikleri incelendiğinde travmaya, matur adipositlerden daha dayanıklı oldukları bulunmuştur (37). Çünkü bu hücreler arasında boyut, metabolik hız ve hücre içi lipid içeriği açısından farklılıklar vardır (37, 62). Lipid dolu adipositler daha frajil olduğundan yağ alma

işlemi sırasında preadipositlere göre daha kolay hasarlanır (67). Preadipositler liposakşın travmasına karşı daha dayanıklıdır (37). Ayrıca preadipositler besin maddesi olmadan daha uzun süre yaşayabilirler ve matur adipositlere oranla daha düşük oksijen tüketimine sahiplerdir (67). Transplantasyonun ilk birkaç gününde greftler çevre dokudan difüzyon yoluyla beslenir ve difüzyon sadece 150 mikrometre uzaklıktaki hücrelerin beslenmesi için yeterlidir (62). Çevre dokudan damar gelişimi yaklaşık 5 gün sonra gerçekleşmektedir ve bu süreçte greftlerin sadece periferini beslemeye yeterlidir (62). Preadipositlerin iskemiye karşı daha esnek oldukları kabul edilmektedir ve bu durum transplantın ilk periodunda plazma imbibisyonundan kaynaklanan iskemiye karşı istenen bir özelliktir (10). Preadipositler belirli hipoksik koşullara maruz bırakıldığında; endotelial hücreler preadipositlerin canlılığını devam ettirmeye yardımcı çözünebilir bir faktör salmaktadır, bu durum başarılı adipogenezis ve anjiogenezis arasındaki bağlantıyı doğrulamaktadır (22). Preadipositlerde proliferasyon aktivitesi en yüksekken, tam olarak diferansiye olmuş hücreler bölünme kapasitesini kaybetmektedir (18). Bu özellikleri kötü greft yaşayabilirliğine ve hangi prosedürle elde edilirse edilsin doku miktarında azalmaya katkıda bulunur (61). Preadipositler lipid yüklü adipositlerden daha dirençli olduğundan bazı araştırmacılar yağ doku transplantasyonunun major etkisinin stromal hücre fraksiyonundaki preadipositlerin yaşaması sonucu oluştuğuna inanmaktadır (67). Transplantasyon sonrası kalıcılığı preadipositlerin ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin sağlayabileceği ve bu hücrelerin bireyler arası değişkenliği yağ greftlerinin survive farklarından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (37).

Preadipositler, kültür ortamında ışınal şekilde çoğalırlar ve çok sayıda uzantıya sahip, küçük lipid damlacıkları içeren iğ şeklinde hücrelerdir (21, 53). Bu morfolojilerinden dolayı fibroblast benzeri hücreler olarak adlandırılmışlardır (53). Hücrelerin nükleusları geniştir ve lipid birikimi ilk olarak nüklear zon çevresinde görülmektedir. Kültüre yağ doku hücrelerinin morfolojisi, gelişim fazında fibroblastlara benzese de bazı farklılıklar vardır; adipoz hücreler polimorfik formdadır ve gerekli farklılaşma faktörleri eklendiğinde belirgin hücre şekil değişiklikleri gözlenmektedir (16, 21). Preadipositler küresel şekle dönüşürler, lipid damlacıkları birikimi başlar ve matur adipositlerin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini kazanırlar (16). Kültüre adipoz hücrelerin sitoplazmasında pek çok küçük lipid damlacığı görülmektedir. İn vitro ortamda diferansiye olan adipositler, in vivo ortamdaki adiposit hücrelerinin pek çok özelliğini taşımaktadır.

Leong ve ark.'nın yaptığı çalışmada; farklı liposakşın metodlarıyla elde edilen yağ örneklerinde, adipojenik diferensiasyon yeteneğine sahip prekürsör hücre popülasyonunun, metabolik profilleri ve varsayılan adipojenik potansiyelleri karşılaştırılmıştır (61). Vakum makinesi yardımıyla elde edilen ve enjektör yardımıyla elde edilen dokularda benzer sayıda canlı preadiposit bulunduğu ve benzer adipojenik potansiyellere sahip oldukları rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada 1 g yağ dokusundan 350,000 preadiposit izole edilebileceği gösterilmiştir (67). Bu çalışmalar elektif operasyonlar sırasında elde edilen yağ örneklerinin veya liposakşın yoluyla elde edilen yağ örneklerinin, preadiposit kültürlerinde rahatlıkla kullanılabilceğini göstermiştir.

Schoeller ve ark. yaptıkları çalışmada; hücre kültüründe ürettikleri preadipositleri fibrin glue taşıyıcı materyali içerisinde taşıyarak, daha önceden hazırlanmış rektus kası içerisindeki tünellere enjekte etmiş ve izlemlerde sağlıklı görünümde adipoz doku oluşumunu göstermişlerdir (10). İmplantasyondan 1 yıl sonra bile enflamatuvar hücre reaksiyonu, fokal hücre nekrozu, kist oluşumu ve fibrozis saptanmamıştır. Çalışma sonunda elde edilen yağ doku hacmi enjekte edilen hücre süspansiyon hacminden daha fazla bulunmuştur. Sonuç olarak; hücre kültüründe geliştirilen yağ hücre prekürsörlerinin transplantasyonun, yumuşak doku defektlerini doldurmada yeni ortaya çıkan yaklaşımlara potansiyel sağlayabileceği ileri sürülmüştür (10).

Çalışmamızda kültüre preadiposit ve adiposit hücrelerinin otolog transplantasyonu sonrası benzer şekilde sağlıklı görünümde yağ doku oluşumu gözlenmiştir. Preadiposit enjeksiyon gruplarında elde edilen yağ dokusu hacmi zamanla artış göstermekle birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,005$). Enjekte edilen 1 ml'lik hücre süspansiyon hacminin 6 ay sonunda ortalama %88'inin korunduğu gösterilmiştir. Adiposit enjeksiyon grubunda ise erken dönemde hacimde belirgin azalma gözlenmiş ve 6 ay sonunda enjekte edilen hacmin sadece %38'i korunabilmiştir. Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örnekleri zamana göre birbirleriyle karşılaştırıldığında 3. ve 4. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı hacim farkı saptanmıştır ($p<0,05$). Bu sonuç preadipositlerin in vivo adipojenik diferensiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini, transplantasyon sonrası erken dönemde ortaya çıkan hipoksik ortama adipositlere oranla daha dayanıklı olduğunu ve elde edilen yağ dokunun hacminin daha stabil olduğu göstermektedir.

Torio-Padron ve ark.'nın çalışmasında; insandan alınan yağ örneğindeki preadipositler izole edilerek, kültür ortamında çoğaltılmış ve fibrin içerisinde atimik farelere enjekte edilmiştir (28). Bu çalışmada; uzun süre kalıcı olabilen adipoz dokunun insan preadipositlerinin enjeksiyonu ile sağlanabileceği hipotezi araştırılmıştır. Enjeksiyon sonrası adipoz doku oluşumu kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. İlk 3-4 haftada progresif greft abzorbsiyonu gözlenmiş daha sonra implant volum ve şekli sabit kalmıştır. Mikroskopik değerlendirmelerde 6. ay sonunda bile iyi organize yağ dokusunun varlığı gösterilmiş, enflamatuvar yanıt, doku nekrozu ve kist oluşumu saptanmamıştır. Yeni oluşan dokunun kalıcılığı en az 9 ay olarak belirlenmiştir. Hücre konsantrasyonu arttıkça yağ doku oluşumunun arttığı saptanmıştır.

İn vitro çalışmalar preadipositlerin belirli koşullarda adipositlere farklılaşabildiğini ve vakuoll oluşturabildiğini kanıtlamıştır (54, 62). Fakat preadipositlerin in vivo adipojenik dönüşümünün sağlanması en önemli sorunlardan birisi olarak görülmektedir (11). Preadipositlerin in vivo adipojenik dönüşümünü sağlayan, in vivo hücre- hücre, hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü karışıktır (59). Canlı preadipositlerden oluşan tek hücre süspanسیونunun transferi ve mature yağ hücrelerine dönüştürme başarısının in vivo kontrolü henüz mevcut değildir (54). Bazı araştırmacılar implantasyon öncesi preadipositlerin in vitro adipojenik diferensiyasyonunun sağlanmasının, adipoz doku rejenerasyonunu artıracığını savunmaktadır (11). Bu nedenle preadipositler sentetik veya doğal polimer iskeleler üzerinde çoğaltılıp, implante edilerek in vivo adipoz doku oluşturulmaya çalışılmıştır. Fakat in vivo yeni dokular oluşsa da adipojenik diferensiyasyon memnun edici olmadığı savunulmuştur (59).

Etkili adipoz doku rejenerasyonu için optimal hücre kaynağının seçilmesi zorunludur. Cho ve arkadaşları; adiposit prekürsör hücrelerin yani preadipositlerin implantasyon öncesi in vitro olarak adipojenik diferensiyasyonu sağlandığında, in vivo adipoz doku oluşumunun ilerletilebileceğini savunmuşlardır (11). Yaptıkları çalışmada insan subkutanöz yağ dokusundan elde edilen preadipositler, adipojenik diferensiyasyon sağlayan medyumda kültüre edilmiş ve fibrin matriks içerisinde atimik farelere implante edilmiştir (11). Diğer grupta ise diferensiyasyon medyumu kullanılmamış preadipositler aynı şekilde enjekte edilerek karşılaştırılmıştır. Altıncı hafta sonunda tüm gruptaki implantlarda volumde en az % 30 küçülme saptanmıştır. Adipojenik diferensiyasyon sağlanmış preadiposit implantasyonu, diferensiyasyon sağlanmamış preadipositlerle karşılaştırıldığında artmış vaskülerite ve in vivo adipogenezis saptanmıştır.

Preadipositler kültür ortamında fibroblast benzeri morfoloji gösterirler ve adipojenik diferensiasyon indükleyen medyumda kültüre edildiklerinde sitoplazmalarında multilokuler lipid damlacıkları içeren adipositlere diferensiyel olurlar. Yani Cho ve ark.larının çalışmasındaki kültüre hücrelerin undiferensiyel preadipositler ve diferensiyel preadipositler tanımlanmaları doğru bir yaklaşımdır değildir. Ayrıca 6 haftalık çalışma süresi adipogenezisi değerlendirmek açısından yeterli uzunlukta olmadığı görüşündeyiz. Çalışmamızda kültüre preadiposit enjeksiyonu sonucunda hiçbir taşıyıcı ajan kullanılmamasına rağmen sağlıklı görünümde yağ dokusu elde edilebilmiştir.

Çalışmamızda hücre süspansiyonları transplantasyonu sonrası elde edilen yağ doku örnekleri hacimsel olarak değerlendirildikten sonra, histopatolojik olarak daha objektif bir değerlendirme yapabilmek için bir skorlama sistemi oluşturulmuştur. Histopatolojik değerlendirme skorlamasında nekroz, fibrozis, vaskülerite, kist oluşumu ve mast hücre yoğunluğu temel alınmıştır. Çalışma sonuçlarını değerlendirmek için bir skorlama sistemi kullanımının; elde edilen verilerin ve farklı çalışma sonuçlarının karşılaştırılmasına yardımcı olacağını düşünüyoruz. Hazırladığımız skorlama sisteminin en önemli komponentlerinden birisi vaskülerite yoğunluğunun değerlendirilmesidir. Kültüre preadiposit enjeksiyonu uygulanan gruplarda vasküleritenin bütün gruplarda belirgin olarak arttığı görülmüştür. Preadipositlerin iskemiye maruz kaldığında anjiyojenik faktörler salgılayarak ve büyüme faktörlerini stimüle ederek vaskülarizasyonu arttırdığı düşünülmektedir (68). Kültüre adiposit enjeksiyon grubunda ise ilk grupta damar yoğunluğu belirgin şekilde az iken 6. ay sonunda yeni damar oluşumunda artış olduğu fark edilmiştir. Başlangıçta adipositlerin maruz kaldığı iskemik ortam sonrasında yeterli vasküler desteğin oluşturulamaması, ilk gruplardan elde edilen yağ doku hacimlerindeki belirgin azalmadan sorumludur.

Standart yağ grefti uygulamaları sonucunda yağ hücreleri uğradığı mekanik travma sonucu rezorbe olmakta ve yağ greftleri fibrotik doku ve kist oluşumu ile yer değiştirmektedir. Kültür ortamında elde edilen hücrelerin liposakşın yöntemiyle elde edilip hemen enjekte edilen yağ dokusundaki matur adipositlerden en önemli üstünlüğü; mekanik müdahaleye maruz kalmadıklarından implantasyon sonrası revaskularizasyonun daha iyi olması ve sabit volumlü adipoz doku oluşturabilmeleridir. Çalışmamızda hem kültüre preadiposit gruplarından hem de kültüre adiposit gruplarından elde edilen yağ örneklerinde, standart prosedürlerde sık karşılaşılan makrokist oluşumu gözlenmemiştir. Mikrokist oluşumu; kültüre preadiposit gruplarında belirgin olarak az iken kültüre adiposit gruplarında

orta düzeyde saptanmıştır. Fibrotik dokular kültüre adiposit enjeksiyon gruplarında, kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarına oranla daha fazla bulunmuştur. Nekroz; kültüre preadiposit enjeksiyonu 4. grubunda sadece bir örnekte saptanmıştır. Kültüre adiposit enjeksiyon gruplarında fibrotik dokuların çevresinde nekrotik alanlar gözlenmekle birlikte geniş nekroz alanlarına bu grupta da rastlanmamıştır.

Mast hücreleri; bağ dokuda yerleşim gösteren granüllü hücrelerdir. Kemikiliğinde multipotent hücrelerden köken alır ve kanda öncü hücreler olarak dolaşırlar (69). Derinin dermisi, akciğerler ve bağırsakların mukozası gibi bölgelere göç ederek buralarda çeşitli faktörlerin etkisiyle farklılaşırlar (70). Mast hücre granülleri başta heparin ve histamin olmak üzere triptaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G gibi çeşitli proteazları içerirler (69). Bu proteazlar enfeksiyonlara karşı konak savunmasında, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, kronik enflamasyonda ve allerjik reaksiyonlarda rol oynamaktadır (70, 71). Mast hücreleri yeni damarlanma alanı ve solid tümörlerin etrafı gibi farklı immünolojik enflamatuvar reaksiyon bölgelerinde toplanabilmektedirler (71). Mast hücrelerinin tümör büyümesi yanı sıra yara iyileşmesi ve doku tamiri gibi durumlarda artmış olarak saptanması, anjiogenez süreci ile ilişkisini düşündürmektedir (71). Mast hücrelerinin anjiogenezde rol oynayan TNF- α , IL-8, fibroblast ve damar endoteli büyüme faktörleri olan FGF- β ve VEGF salgıladıkları bilinmektedir (71). Son zamanlarda mast hücre mediatörlerinin obezite ile ilişkisi araştırılmaktadır (72).

Çalışmamızda kültüre preadiposit ve kültüre adiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinin patolojik değerlendirmesinde her iki grupta da normale göre belirgin olarak artmış mast hücre sayıları saptanmıştır. Literatürde yağ grefti uygulamaları sonrası mast hücre yoğunluğunun çalışıldığı veya preadiposit-mast hücresi ilişkisini açıklayan çalışma bulunamamıştır. Adiposit prekürsörlerini araştıran bir çalışmada mast hücre sayıları, obez sıçanlarda araştırılmıştır (21). Adipoz dokudaki mast hücre sayıları obez farelerde zayıflara oranla beş kat daha fazla bulunmuştur (21). Mast hücre sayılarındaki bu farklılığın sebepleri henüz ortaya çıkartılamamıştır. Mast hücrelerinin anjiogenezde rol oynadığı dikkate alınırsa bu hücreler yağ grefti uygulamalarında kritik rol üstlenebileceğini ve araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda elde edilen yağ doku örneklerinin hispatolojik toplam skorları incelendiğinde; tüm gruplarda kültüre preadiposit gruplarının toplam skorları kültüre adiposit gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Bunun

sebebi kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarından elde edilen yağ örneklerinde fibrozis, nekroz, mikrokist oluşumu kültüre adiposit enjeksiyon gruplarına göre daha az, vasküleritenin ise daha yüksek saptanmasıdır.

Son dönem çalışmalarda preadiposit veya mezenşimal kök hücrelerin sentetik veya naturel taşıyıcı materyaller üzerinde implantasyonu sonrası adipoz doku oluşumunun artabileceği ileri sürülmüştür (28). Destek yapı; tespit edilen hücrelerin göçü, çoğalması ve son doku şekline uygun doku eşdeğerini oluşturulması için gereklidir (2). Kültüre edilmiş preadipositlerin in vivo transferi için uygun iskelenin seçilmesi gerekmektedir. Bu materyaller mekanik destek ve doku oluşumuna yön verme gibi ihtiyaçları karşılamalıdır. Ek olarak doku uyumu ve kolay muamele gerekli diğer özelliklerdir. Genel olarak materyaller solidler (absorbe olabilen kollojen sponç, polilaktik-glikolik asit (PLGA) diskleri veya hyaluronik asid kalıpları vb) ve sıvılar (aljinat, kollojen, hyaluronik asid, fibron, hidrojel vb) olarak sınıflandırılabilir (28, 73, 74). Adipoz doku mühendisliğinde optimum yapı iskelesinin bulunması zordur, bu yaklaşımlarının hiç birisinin etkili olduğu gösterilememiştir (2, 74).

Heimburg ve ark.; doku mühendisliği yaklaşımlarını kullanarak, kültüre preadipositleri hyalurinan iskelenin üç değişik formu üzerinde transfer etmişlerdir (6). Tüm gruplarda preadiposit-iskele yapılarının makroskopik olarak gözlemlenebilen yağ doku ile kaplandığını ve yeni damar oluşumunda artış olduğunu saptamışlardır. Preadipositlerin; transplantasyon sonrası çoğalma ve adipoz dokuya farklılaşma yeteneği ile yumuşak doku mühendisliği için potansiyel kaynak olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda kültüre preadipositlerin ve adipositlerin transplantasyonunda herhangi bir taşıyıcı veya yapı iskelesi kullanılmamıştır. Yapı iskelesi üzerine ekilmiş kültüre hücrelerin implantasyonu için ek cerrahi insizyon gereksinimi mevcuttur. Kullanılan iskeleler in vivo adipoz doku oluşumunu ve vaskülerizasyonu olumlu yönde etkilemekle birlikte adipoz doku mühendisliğinde standartize edilmiş bir yapı iskelesi bulunmamaktadır. Çalışmamızda daha objektif bir karşılaştırma yapabilmek için herhangi bir taşıyıcı iskele veya ajan kullanmadan sadece hücre süspansiyonlarının enjeksiyonu uygulanmış ve herhangi bir taşıyıcı kullanmadan da adipogenezisin başarılabileceği gösterilmiştir. Küçük kontur defektlerinin düzeltilmesinde hücre süspansiyonlarının kullanımı yeterliyken, mastektomi defekti gibi geniş doku defektlerinde yapı iskelesi ile birlikte kültüre hücre kullanımının daha yararlı olacağına inanıyoruz.

Kök hücreler; kendi kendini yenileyebilme ve daha özelleşmiş fonksiyona sahip hücreler üretebilme yeteneğine sahip hücrelerdir (37, 75). İnsan yağ dokusu kök hücreler için çok önemli bir kaynaktır (76). Son dönemde yağ dokusunun vücutta en fazla yetişkin kök hücreye sahip doku olduğu bulunmuştur (77). Yağ dokusunun gramında 5000 adipoz kökenli kök hücre bulunurken, kemik iliği mililitresinde 100-1000 kök hücre bulunmaktadır (77). Adipoz doku kökenli kök hücrelerin elde edilmesi, izolasyonu ve kültüre edilmesi kolaydır (75). Plastik cerrahlar adipoz dokuyu kolaylıkla elde etme ve işleme konforuna sahiptirler (17, 78). Yakın gelecekte plastik cerrahide kök hücrelerin önemli yer tutacağı tahmin edilmektedir. Kemik iliği potansiyel kök hücre kaynağı olsa da sınırlı miktarda hücre içermekte ve donör saha problemlerine yol açmaktadır (17). Ayrıca kemik iliği kaynaklı hücrelerin kültüre edilmesi zor, pahalı ve uğraştırıcıdır (3, 79). Kemik iliği ile ilgili bu sınırlamalar adipoz doku kökenli kök hücrelerin teröpotik rolüne olan ilgiyi artırmış ve liposakşın yoluyla elde edilen kök hücreler yumuşak doku dolgu materyali uygulamalarında kullanılma potansiyeline sahip olmuştur (17, 79).

Rejeneratif tıp; fonksiyon ve görünümü onarmak için hücre, matriks gibi vücudun kendi materyallerinin ve/veya kimyasal bileşenlerin kullanılmasıdır (17). Rejeneratif temelli yumuşak doku terapilerinde adipoz kökenli hücrelerin ideal hücreler olarak görülmesinin pek çok sebebi mevcuttur (17). Adipoz doku kökenli kök hücreler önemli anjiogenezis ve vaskulogenezis potansiyeline sahiptirler (17). Yağ dokudan elde edilen hücrelerin gerekli indüksiyon faktörlerinin varlığında adipoz dokuya farklılaşabildiği gibi, kemik, kırık, kas, kan damarları, sinirler ve cilt gibi pek çok dokuya farklılaşabildiği gösterilmiştir (9, 23, 80). Kök hücrelerin ek olarak enflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir (17). İnsanlarda yağ doku transplantasyonu sonrası gelişen olaylar henüz kanıtlanamamıştır (37). Bazı çalışmalar greftlenen yağın komşu dokuyla direkt olarak veya anjiogenezis yoluyla etkileştiğini ve iyileştirici etki gösterdiğini, diğer çalışmalarda iyileştirici etkinin artmış immün yanıtı, ölü ve defektif hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasına ve kalıcı doku yeniden düzenlenmesine bağlı olduğunu savunmaktadır (37).

Coleman'a göre yağ grefti uygulanan alanlarda doku kalitesinde de artış olmaktadır (37) Yağ uygulandığı alana entegre olarak uyum sağlamakta, kemik yakınına yerleştirilen yağ kemik gibi hissedilmekte, kas içerisine yerleştirilen yağ kas gibi hissedilmekte ve direkt cilt altına yerleştirilen yağ cildin kalitesini artırmakta ve

kalinlaştırmaktadır (37). Bu iyileştirici etkinin mevcut preadiposit ve yağ doku kaynaklı kök hücrelerin hasarlı dokuları onarma yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir (38).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda rat modelinde; kültür ortamında çoğaltılmış preadipositlerin ve adipositlerin otolog transplantasyonu ile in vivo adipoz doku oluşturulması gerçekleştirilmiştir. Preadipositlerin ve adipositlerin otolog transferi sonrası histolojik özellikleri, adipoz doku oluşumuna ve kalıcı volüm elde edilmesine katkıları karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda sonuçların daha objektif değerlendirilebilmesi için yeni bir histopatolojik değerlendirme yöntemi geliştirilmiştir. Preadipositlerin implantasyonunun, adiposit implantasyonu ile karşılaştırıldığında in vivo adipoz doku oluşumunu daha fazla artırdığı ve kalıcılığının daha uzun süreli olduğu gösterilmiştir.

Gelecekte insandan elde edilen preadiposit hücre süspansiyonunun hücre kültüründe çoğaltılarak aynı hastada yumuşak doku defektini doldurmak için otolog olarak transplante edilebileceğine inanıyoruz. Bu yolla hastalarda donör alan defekti oluşturulmadan, komplikasyon oranı düşük, daha kalıcı ve uzun süreli sonuçlar elde edilebilir. Araştırmamız prelinik çalışma niteliğinde olup, konuyla ilgili yapılacak klinik araştırmalar için temel oluşturacaktır.

7. ÖZET

Başlık: Yumuşak Doku Defektlerinin Rekonstrüksiyonunda Kültüre Preadiposit ve Adipositlerin Karşılaştırılması : İn vivo Çalışma

Amaç ve Hipotez: Bu çalışmadaki amacımız; yumuşak doku defektlerinin onarımında son zamanlarda kullanım alanı bulan kültüre preadipositlerin ve adipositlerin matur yağ dokusu oluşturma kapasiteleri ve kalıcılık özelliklerinin makroskopik ve histopatolojik olarak karşılaştırılmasıdır. Literatürde bu iki hücre tipinin doku augmentasyonundaki etkilerini karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda kültüre preadipositlerin implantasyonunun, kültüre adiposit implantasyonu ile karşılaştırıldığında in vivo adipoz doku oluşumunu daha fazla artıracak hipotezini araştırdık.

Yöntem: Çalışmamızda her grupta 8 rat olmak üzere 4 grup oluşturularak toplam 32 adet Wistar albino rat kullanıldı. Ratların periepididimal bölgesinden kültüre edilmek üzere 2 gr beyaz yağ doku örnekleri alındı. Elde edilen yağ doku örnekleri laboratuvar ortamında konnektif doku ve damarsal yapılarından ayrıldı ve hücre kültür protokolündeki işlemlerden geçirilerek prekürsör hücreler izole edildi. Bu aşamada hücreler iki gruba ayrılarak preadiposit grubundaki hücelere proliferasyon için gerekli medyumlar, adiposit grubundaki hücelere diferensiyasyon için gerekli medyumlar eklendi. Yeterli hücre sayısı elde edildiğinde, hücreler flasklardan ayrılarak 10×10^5 hücre/ml olacak şekilde preadiposit ve adiposit hücre süspansiyonları hazırlandı. Hayvan modeline uygun şekilde ratların sağ skapular bölgelerine 1 ml preadiposit, sol skapular bölgelerine 1 ml adiposit hücre süspansiyonları enjekte edildi. Birinci gruptaki ratlar 4. haftada, ikinci gruptaki ratlar 2. ayda, üçüncü gruptaki ratlar 3. ayda ve dördüncü gruptaki ratlar 6. ayda sakrifiye edildi. Tüm gruplardaki hayvanlarda enjeksiyon yapılan bölgelerden elde edilen yağ örnekleri makroskopik, volümetrik ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede nekroz, kist oluşumu, fibrozis, vaskülerite ve mast hücre yoğunluğunu içeren skorlama sistemi geliştirildi.

Bulgular: Preadiposit ve adiposit enjeksiyon gruplarının her ikisinde de in vivo adipoz doku oluşumu başarılmıştır. Kültüre preadiposit enjeksiyon yapılan gruplardan elde edilen yağ doku örneklerinin hacmi zamana göre artış göstermekle birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kültüre adiposit enjeksiyon yapılan gruplardaki yağ doku hacmi zamana göre azalma göstermiş olup, 2 ve 4. gruplar arasındaki hacim azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kültüre preadiposit ve

kültüre adiposit gruplarının hacim değerleri birbirleri ile karşılaştırıldığında ise; preadiposit ve adiposit 3. ve 4. grupları arasındaki hacim farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), diğer gruplar arasındaki farklar anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Kültüre preadiposit ve kültüre adiposit gruplarından elde edilen yağ örneklerinin histopatolojik değerlendirme toplam skorları birbirleri ile karşılaştırıldığında, preadiposit gruplarının toplam skorları tüm gruplarda adiposit gruplarından daha az olup, gruplar arasında farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda hücre kültüründe üretilen preadipositlerin ve adipositlerin otolog enjeksiyonu sonucu in vivo adipoz doku oluşumu gösterilmiştir. Elde edilen yağ doku örnekleri incelendiğinde kültüre preadiposit enjeksiyon gruplarının kültüre adiposit gruplarına oranla artmış vaskleriteye sahip, daha stabil ve sağlıklı yağ dokusu oluşturduğu bulunmuştur. Yağ dokudan izole edilen öncü hücrelerin otolog uygulamalarının, yumuşak doku defektlerinde kullanılan otolog ve otolog olmayan pek çok materyale alternatif olabileceğini ve preadipositlerin yumuşak doku defektlerinin onarımında adipoz doku rejenerasyonu için uygun hücre kaynakları olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Yumuşak doku defekti, Yağ grefti, Preadiposit, Adiposit, Hücre kültürü

İletişim Adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Merkez/Aydın, email: baksoy@adu.edu.tr
Tel:05332558613

8. SUMMARY

Title: Comparison of cultured preadipocytes and adipocytes in the reconstruction of soft tissue defects: An in-vivo study.

Aim and Hypothesis: The aim of the current study is to compare the potential of cultured adipocytes and preadipocytes to form mature fatty tissue. Therefore, we investigated the durability and permanency of the grafts via histopathological and macroscopical parameters. There exist no study yet in the literature that compares these two cells lines for tissue augmentation. We hypothesized that cultured preadipocytes promote better fatty tissue formation compared to adipocytes.

Method: Thirty-two Wistar albino rats were equally divided into 4 groups. Two grams of fatty tissue were harvested from the periepididymal region of the rats. The adipose tissue was washed out from the connective structure in vitro to obtain precursor cells of the adipocytes. At this stage, the cells were separated as preadipocytes and adipocytes. Proper media for proliferation was added into preadipocyte group. Likewise, another media was included into adipocyte suspension for differentiation. Following sufficient cell formation, the flasks were filtered out to isolate 10×10^5 cells per ml. One milliliter of preadipocyte and adipocyte suspension was injected to the right and left scapular sites respectively. The rats were sacrificed one month (group I), two months (II), three months (III) and six months (IV) after the injection. The samples obtained from injection sites were evaluated for macroscopic changes, volumetric permanency, histopathologic scores (necrosis, cyst formation, fibrosis, vascularity, the number of mast cells).

Results: Mature adipose tissue formation was achieved in all groups. Although a mild time-dependent increase in volume was observed in preadipocyte sites, there was no statistical significance ($p > 0, 05$). On contrary, adipocyte injection site of group IV was found to be decreased compared to group II ($p < 0, 05$). In addition, preadipocyte-derived adipose tissue volume of group III and IV were higher compared to the adipocyte sites of the same rats ($p < 0, 05$). Furthermore, histological score of preadipocyte-derived tissue were less than adipocyte sites ($p < 0, 05$).

Conclusion: Mature adipose tissue formation was successfully demonstrated after both adipocyte and preadipocyte injection. Given to the higher vascularity of adipose tissue, one may speculate that a more satisfactory result was acquired following preadipocyte autotransplantation. We conclude that preadipocytes may play a significant role during the

healing soft tissue defects. Thus, cultured preadipocytes should be considered as a reliable source for soft tissue augmentation.

Keywords: soft tissue defect, fat graft, adipocyte, preadipocyte, cell culture

Correspondence: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Merkez/Aydın, email: baksoy@adu.edu.tr
Tel:05332558613

9. KAYNAKLAR

- (1) Hemmrich K, Von HD, Cierpka K, Haydarlioglu S, Pallua N. Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. *Differentiation* 2005 Feb; 73(1): 28-35.
- (2) Patrick CW, Jr. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec* 2001 Aug; 263(4): 361-6.
- (3) Jatana KR, Smith SP, Jr. The scientific basis for lipotransfer: is it the ideal filler? *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov; 16(4): 443-448.
- (4) Shoshani O, Ullmann Y, Shupak A, Ramon Y, Gilhar A, Kehat I, et al. The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. *Dermatol Surg* 2001 Jul; 27(7): 645-7.
- (5) Calabria R, Hills B. Fat grafting: fact or fiction? *Aesthet Surg J* 2005 Jan; 25(1): 55.
- (6) Von Heimburg DF, Serov G., Oepen T. Fat tissue engineering. *Topics in Tissue Engineering*. 2003; 1-16.
- (7) Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, Heller JB, Wasson K, O'Hara C, et al. Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg* 2007 Jan; 119(1): 323-31.
- (8) Butterwith SC. Regulators of adipocyte precursor cells. *Poult Sci* 1997 Jan; 76(1): 118-23.
- (9) Kremer D MW. Tissue engineering of human fat for soft tissue augmentation: in vitro results. *Eur J Plast Surg* 2002; 24: 343-8.
- (10) Schoeller T, Lille S, Wechselberger G, Otto A, Mowlavi A, Piza-Katzer H. Histomorphologic and volumetric analysis of implanted autologous preadipocyte cultures suspended in fibrin glue: a potential new source for tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 2001 Jan; 25(1): 57-63.

- (11) Cho SW, Kim I, Kim SH, Rhie JW, Choi CY, Kim BS. Enhancement of adipose tissue formation by implantation of adipogenic-differentiated preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Jun 30; 345(2): 588-94.
- (12) Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 1997 Jun; 4(2): 211-32.
- (13) Tholpady A. Facial fat grafting. www.emedicine.com. 2009.
- (14) Ergün A. Yağ hücresi ve salgı ürünlerinin fonksiyonları. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; 56(3): 179-88.
- (15) Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003 Aug; 27(8): 875-88.
- (16) Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998 Jul; 78(3): 783-809.
- (17) Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006 Sep; 118(3 Suppl): 121-8.
- (18) Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 207-33.
- (19) Sorisky A. From preadipocyte to adipocyte: differentiation-directed signals of insulin from the cell surface to the nucleus. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999 Feb; 36(1): 1-34.
- (20) Niemela SM, Miettinen S, Kontinen Y, Waris T, Kellomaki M, Ashammakhi NA, et al. Fat tissue: views on reconstruction and exploitation. *J Craniofac Surg* 2007 Mar; 18(2): 325-35.
- (21) Hausman GJ, Champion DR, Martin RJ. Search for the adipocyte precursor cell and factors that promote its differentiation. *J Lipid Res* 1980 Aug; 21(6): 657-70.

(22) Bucky LP, Percec I. The science of autologous fat grafting: views on current and future approaches to neoadipogenesis. *Aesthet Surg J* 2008 May; 28(3): 313-21.

(23) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002 Dec; 13(12): 4279-95.

(24) Marler JJ, Guha A, Rowley J, Koka R, Mooney D, Upton J, et al. Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2000 May; 105(6): 2049-58.

(25) Eppley BL, Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: clinical overview. *Plast Reconstr Surg* 2006 Sep 15; 118(4): 98-106.

(26) Klein AW, Elson ML. The history of substances for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg* 2000 Dec; 26(12): 1096-105.

(27) Narins RS, Bowman PH. Injectable skin fillers. *Clin Plast Surg* 2005 Apr; 32(2): 151-62.

(28) Torio-Padron N, Baerlecken N, Momeni A, Stark GB, Borges J. Engineering of adipose tissue by injection of human preadipocytes in fibrin. *Aesthetic Plast Surg* 2007 May; 31(3): 285-93.

(29) Alster TS, West TB. Human-derived and new synthetic injectable materials for soft-tissue augmentation: current status and role in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2000 Jun; 105(7): 2515-25.

(30) Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 2003 Sep; 27(5): 354-66.

(31) Shiffman MA, Kaminski MV. Fat transfer to the face: technique and new concepts. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2001 May; 9(2): 229-37.

(32) Sclafani AP, Romo T, III, Jacono AA. Rejuvenation of the aging lip with an injectable acellular dermal graft (Cymetra). *Arch Facial Plast Surg* 2002 Oct; 4(4): 252-7.

(33) Burres S. Preserved particulate fascia lata for injection: a new alternative. *Dermatol Surg* 1999 Oct; 25(10): 790-4.

(34) Burres S. Fascian. *Facial Plast Surg* 2004 May; 20(2): 149-52.

(35) Kanchwala SK, Holloway L, Bucky LP. Reliable soft tissue augmentation: a clinical comparison of injectable soft-tissue fillers for facial-volume augmentation. *Ann Plast Surg* 2005 Jul; 55(1): 30-5.

(36) Toledo LS, Mauad R. Fat injection: a 20-year revision. *Clin Plast Surg* 2006 Jan; 33(1) :47-53.

(37) Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 2006 Sep; 118(3 Suppl): 108-20.

(38) Ducic Y. Fat grafting in trauma and reconstructive surgery. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov; 16(4): 409-416.

(39) Fournier PF. Fat grafting: my technique. *Dermatol Surg* 2000 Dec; 26(12): 1117-28.

(40) Obagi S. Specific techniques for fat transfer. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov; 16(4): 401-7.

(41) Sommer B, Sattler G. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg* 2000 Dec; 26(12): 1159-66.

(42) Fulton JE, Parastouk N. Fat grafting. *Dermatol Clin* 2001 Jul; 19(3): 523-30.

(43) Butterwick KJ, Lack EA. Facial volume restoration with the fat autograft muscle injection technique. *Dermatol Surg* 2003 Oct; 29(10): 1019-26.

- (44) Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995 Sep; 19(5): 421-5.
- (45) Smith P, Adams WP, Jr., Lipschitz AH, Chau B, Sorokin E, Rohrich RJ, et al. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg* 2006 May; 117(6): 1836-44.
- (46) Shiffman MA, Mirrafati S. Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg* 2001 Sep; 27(9): 819-26.
- (47) Lalikos JF, Li YQ, Roth TP, Doyle JW, Matory WE, Lawrence WT. Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. *J Surg Res* 1997 Jun; 70(1): 95-100.
- (48) Carpaneda CA, Ribeiro MT. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic Plast Surg* 1994; 18(1): 17-9.
- (49) Lam SM, Glasgold RA, Glasgold MJ. Limitations, complications, and long-term sequelae of fat transfer. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov; 16(4): 391-9.
- (50) Coleman WP, III. Fat transplantation. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008 Nov; 16(4): 451-8.
- (51) Freshney R.I. Culture of animal cells: Introduction. *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, fifth ed. Oxford: John Wiley Sons. Publ, 2005: 1-9.
- (52) Mather J.P, Roberts P.E. The physical environment. Dunbar B.S (ed). *Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique*, New York: Plenum Press, 1998: 25-40.
- (53) Sugihara H, Funatsumaru S, Yonemitsu N, Miyabara S, Toda S, Hikichi Y. A simple culture method of fat cells from mature fat tissue fragments. *J Lipid Res* 1989 Dec; 30(12): 1987-95.

(54) Rieck B, Schlaak S. In vivo tracking of rat preadipocytes after autologous transplantation. *Ann Plast Surg* 2003 Sep; 51(3): 294-300.

(55) Bjorntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjostrom L, Smith U. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 1978 Mar; 19(3): 316-24.

(56) Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989 Nov; 84(5): 1663-70.

(57) Funatsumaru S. Cellular structure and function of rat fat cells in the primary culture. *Cell Struct Funct* 1995 Feb; 20(1): 23-32.

(58) Van Harmelen, Stahh V. Primary culture and differentiation of human adipocyte precursors cells. In: Picot J, editor. *Human cell culture protocols*, second ed. Humana Press, 2005: 125-35.

(59) Hemmrich K, von HD, Rendchen R, Di BC, Milella E, Pallua N. Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering. *Biomaterials* 2005 Dec; 26(34): 7025-37.

(60) Gutowski KA. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg* 2009 Jul; 124(1): 272-80.

(61) Leong DT, Hutmacher DW, Chew FT, Lim TC. Viability and adipogenic potential of human adipose tissue processed cell population obtained from pump-assisted and syringe-assisted liposuction. *J Dermatol Sci* 2005 Mar; 37(3): 169-76.

(62) Borges J, Mueller MC, Padron NT, Tegtmeier F, Lang EM, Stark GB. Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels. *Tissue Eng* 2003 Dec; 9(6): 1263-70.

(63) Tholpady SS, Aojanepong C, Llull R, Jeong JH, Mason AC, Futrell JW, et al. The cellular plasticity of human adipocytes. *Ann Plast Surg* 2005 Jun; 54(6): 651-6.

(64) Rieck B, Schlaak S. Measurement in vivo of the survival rate in autologous adipocyte transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2003 Jun; 111(7): 2315-23.

(65) Karacaoglu E, Kizilkaya E, Cermik H, Zienowicz R. The role of recipient sites in fat-graft survival: experimental study. *Ann Plast Surg* 2005 Jul; 55(1): 63-8.

(66) Huss FR, Kratz G. Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2002; 36(3): 166-71.

(67) Von HD, Hemmrich K, Haydarlioglu S, Staiger H, Pallua N. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 2004; 178(2): 87-92.

(68) Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med* 2009 Mar; 4(2): 265-73.

(69) Harem MK. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 14(1): 61-7.

(70) Ercan F, Çetinel Ş. Mast hücrelerinin enflamasyondaki rolü: İnsan ve deneysel hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmaların değerlendirilmesi. *Marmara Medical Journal* 2008; 21(2): 179-86.

(71) Özdemir Ö, Savaşan S. Gözardı edilmiş bir hücrenin dönüşü: Mast hücresi ve hematoloji-onkoloji/immunoloji alanlarında tanımlanan yeni rolleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2005; 48: 85-92.

(72) Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, et al. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem* 2003 Nov 21; 278(47): 46654-60.

(73) Halbleib M, Skurk T, de LC, von HD, Hauner H. Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials* 2003 Aug; 24(18): 3125-32.

(74) Borzacchiello A, Mayol L, Ramires PA, Pastorello A, Di BC, Ambrosio L, et al. Structural and rheological characterization of hyaluronic acid-based scaffolds for adipose tissue engineering. *Biomaterials* 2007 Oct; 28(30): 4399-408.

(75) Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 2006 Dec; 27(36): 6052-63.

(76) Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du LT, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004; 6(1): 7-14.

(77) Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005 Sep; 54(3): 132-41.

(78) Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006 Apr; 24(4): 150-4.

(79) Sterodimas A, De FJ, Correa WE, Pitanguy I. Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature. *Ann Plast Surg* 2009 Jan; 62(1): 97-103.

(80) Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5): 362-9.