

**T.C.**  
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN OTOLOG YAĞ GREFTLERİNDE VASKÜLER**  
**ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN GREFT**  
**YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ**

**Dr. ALPASLAN TOPTU**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. ATAY ATABEY**

**İzmir - 2006**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1-İçindekiler .....</b>                                              | <b>1</b>  |
| <b>2-Önsöz .....</b>                                                    | <b>5</b>  |
| <b>3-Özet.....</b>                                                      | <b>6</b>  |
| <b>4-Giriş .....</b>                                                    | <b>10</b> |
| <b>5-Genel Bilgiler .....</b>                                           | <b>12</b> |
| Graft tipleri ve tarihçesi .....                                        | 12        |
| Yağ Matürasyonu.....                                                    | 12        |
| Yağ Grafti ve Tarihçesi .....                                           | 13        |
| Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü .....                                | 15        |
| <b>6-Amaç.....</b>                                                      | <b>19</b> |
| <b>7-Gereç ve Yöntem .....</b>                                          | <b>20</b> |
| Mikroküreciklerin Hazırlanması.....                                     | 20        |
| Gruplar.....                                                            | 22        |
| Cerrahi İşlem.....                                                      | 23        |
| Postoperatif Değerlendirme .....                                        | 25        |
| Klinik Takip ve Gözlem .....                                            | 25        |
| Graftlerin Toplanması, Ağırlıklarının Ölçülmesi ve Data<br>Analizi..... | 25        |
| Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme.....                       | 25        |



|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| İstatistiksel Değerlendirme .....                                        | 26        |
| <b>8-Bulgular.....</b>                                                   | <b>27</b> |
| Klinik Takip ve Gözlem .....                                             | 27        |
| Greftlerin Toplanması, Ağırlıklarının Ölçülmesi ve Data<br>Analizi ..... | 27        |
| Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme .....                       | 28        |
| <b>9-Tartışma .....</b>                                                  | <b>31</b> |
| <b>10-Kaynaklar .....</b>                                                | <b>44</b> |

## **Tablo Listesi:**

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1- Gruplar, işlem zamanı ve sıralaması.....                                                | 23 |
| Tablo 2- Tüm grupların greft postoperative ağırlıklarının, preoperative ağırlıklarına Oranı..... | 28 |
| Tablo 3- Tüm gruplarda greft adiposit oranının, greft toplam oranına oranları.....               | 30 |
| Tablo 4- Grupların ortalama greft yaşayabilirlik ve göreceli adiposit indeksi oranları .         | 30 |

## **Şekil Listesi**

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1- Yağ hücrelerinin mezenkimal hücreden farklılaşma süreci.....    | 13 |
| Şekil 2- VEGF içeren kalsiyum aljinat mikroküreciklerin hazırlanışı..... | 21 |

## Resim Listesi:

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 1- Mikroküreciklerin elektron mikroskop görüntüsü.....                                  | 21 |
| Resim 2- Mikroküreciklerin elektron mikroskop görüntüsü.....                                  | 21 |
| Resim 3- Mikroküreciklerin elektron mikroskop görüntüsü.....                                  | 22 |
| Resim 4- İnguinal flebin elevasyonu.....                                                      | 23 |
| Resim 5- Çıkarılan greft.....                                                                 | 24 |
| Resim 6- 2-4 mm. lik parçalara ayrılmış greft .....                                           | 24 |
| Resim 7- Greft alıcı alanının hazırlanması.....                                               | 25 |
| Resim 8- Greftin alıcı alana yerleştirilmesi.....                                             | 25 |
| Resim 9- Postoperatif çıkarılan yağ grefti.....                                               | 27 |
| Resim 10- Kontrol grubu, yağ nekrozu, artmış mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrozis..... | 29 |
| Resim 11- Kontrol grubu, yağ nekrozu, artmış mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrozis..... | 29 |
| Resim 12- Boş mikrokürecik grubu, yoğun fibrozis ve mononükleer hücre infiltrasyonu.....      | 29 |
| Resim 13- Boş mikrokürecik grubu, yoğun fibrozis ve mononükleer hücre infiltrasyonu .....     | 29 |
| Resim 14- Prefabrikasyon grubu, normal yağ dokusu ve damarlanma artışı.....                   | 29 |
| Resim 15- Prefabrikasyon grubu, normal yağ dokusu ve damarlanma artışı.....                   | 29 |
| Resim 16- Greft + VEGF grubu, normal yağ dokusu .....                                         | 30 |
| Resim 17- Greft + VEGF grubu, normal yağ dokusu .....                                         | 30 |

## **ÖNSÖZ:**

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi eğitimim sırasında verdikleri tüm destek ve özverilerden dolayı öncelikle eşim ve aileme, bana plastik cerrahiyi öğreten ve sevdiren tüm hocalarıma ve yeri geldiğinde ailemden çok zaman geçirdiğim asistan arkadaşlarıma sonsuz şükran ve minnetlerimi sunarım.

Sevgili babacığım, biliyorum beni gururla izliyorsun!

Dr. Alpaslan Topçu

## ÖZET:

### **Sıçan Otolog Yağ Greftlerinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün Graft Yaşayabilirliğine Etkisi**

Otolog yağ grefti birçok cerrahi uygulamada ideal dolgu maddesi olarak tanımlanmaktadır. Otolog ve tamamen biyolojik uyumlu olması, birçok hastada yeterli miktarda olması, son yıllarda yağ greftinin estetik ve rekonstrüktif cerrahinin birincil ve yardımcı uygulamalarında kullanımı artmıştır. Yağ greftinin avantajlarının yanında, aktarım sonrası oluşan, önceden belirlenemeyen oranda nekroz ve kist oluşumu gibi istenmeyen komplikasyonları vardır. Ayrıca uzun dönem takiplerde önceden belirlenemeyen, % 20 - 50 arasında hacim kaybı görülmektedir. Bu nedenle oluşan kontur yetersizlikleri, tekrar operasyon ihtiyacı gerektirebilir. Yağ greftinin yaşayabilirliği ve dayanıklılığı hala tartışma konusudur.

Bu çalışmada sıçan otolog yağ grefti uygulamalarında Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) etkinliği araştırıldı. İlk grupta, önceden VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler ile prefabrike ederek, alıcı alanın damarlanmasının arttırılması yoluyla greftlerin yaşayabilirliğini arttırmak, ikinci grupta, greft ile eş zamanlı verilen VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler ile VEGF'nin kontrollü salınımı sağlanarak, yağ greftinin damarlanma sürecini hızlandırmak yoluyla otolog yağ greftlerinin en sık ve en istenmeyen komplikasyonu olan emiliminin engellenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma dört grupta toplam 24 denek üzerinde yapıldı. İşlem öncesi deneklerin ağırlıkları ölçüldü. Birinci gruba, yağ grefti alıcı alanına hazırlanan VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler 2 µg/ 0.1 ml olarak enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası 21. gün inguinal bölgeden alınan 0.5 gr. yağ grefti 2-4 mm. lik parçalara ayrılarak sırtta hazırlanmış alıcı alanda cilt-ciltaltı ve pannikulus karnosus geçilerek oluşturulan poşa yerleştirildi. İkinci grupta yağ grefti + VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler, üçüncü grupta (sham grubu) ise yağ grefti + serum fizyolojik ile hazırlanmış boş mikrokürecikler eş zamanlı yerleştirildi. Dördüncü gruba (kontrol grubu) ise yağ grefti uygulaması dışında ek bir girişim yapılmadı. İşlem sonrası yaşayan tüm deneklere ağırlıkları ölçüldükten sonra 90. gün yüksek doz anestezi madde ile yaşam sonlandırma planlandı.

Çıkarılan yağ greftlerinin ağırlıkları ölçülerek, işlem öncesi ağırlıklarına oranları belirlendi. Bu oran greft yaşayabilirlik oranı olarak değerlendirildi. Birinci, ikinci ve üçüncü grupların greft yaşayabilirlik oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İkinci değerlendirme parametresi olarak yapılan morfolojik değerlendirmede, adiposit membranları içinde kalan, lipid ekstraksiyonuna uğramış parlak alanın, tüm dokuya

olan oranı hesaplandı. Bu oran greftin göreceli adiposit içeriğinin indeksi olarak kabul edilmiştir. Sonuç olarak VEGF + yağ grefti ve VEGF prefabrikasyonu sonrası yağ grefti uygulanan gruplar ile kontrol ve boş mikrokürecik grubu ile karşılaştırıldığında göreceli adiposit indekslerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Sonuç olarak bu çalışmamız, literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak, VEGF prefabrikasyonu ile hazırlanmış alana yerleştirilen yağ greftlerinin yaşayabilirliklerinin ve göreceli adiposit indeksinin arttığını göstermiştir. VEGF prefabrikasyonu yapılmaksızın, yağ greftleri ile eşzamanlı uygulanan VEGF yağ greftlerinin yaşayabilirlikleri ve göreceli adiposit indeksi de artmıştır. Bu çalışma, VEGF nin yağ greftinin yaşayabilirliğine, damarlanmasını artırma yoluyla etkisini göstermiştir.



## Summary

### **Influence Of Vascular Endothelial Growth Factor On Fat Graft Survival**

Autogenous fat grafts are considered as an ideal filler in many surgical procedures. Being self originated and biologically compatible, plenty amount, fat grafting is gaining popularity in plastic surgical applications. Beside these positive features, it may lead to some complications, like unpredictable necrosis and cyst formation. Long term follow-up reveals 20-50 % volume loss. This postoperative phenomenon frequently results in the need for initial overcorrection, and/or multiple operations, to meet the recipient site volume and contour requirements. Viability and longevity of fat grafts is still of debate.

The efficiency of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) was assessed in rat autogenous fat graft model. The aim of the study is, increasing the viability of fat grafts and preventing the most common complication of fat grafting, prefabricating the recipient area using VEGF in calcium alginate microspheres; and in the second group, shortening the revascularisation time of fat grafts, by grafting fat at the same with VEGF containing calcium alginate microspheres.

24 rats were randomized in 4 groups. All animals were weighed before the procedures. 2 µg/ 0.1 ml VEGF containing microspheres were injected to subdermal area in dorsal region in first group. 21 days after the injection, 0.5 gr fat grafts were harvested from inguinal region and minced into 2-4 mm particles and grafted into the prefabricated pouch. In second group VEGF containing microspheres + fat graft and in the 3. group % 0.9 NaCl containing microspheres + fat grafts were grafted at the same time. Fourth group (Control group) was grafted with only fat graft with no other intervention. At 90th day of initial grafting all the animals were sacrificed with high dose anesthetic.

Explanted fat grafts were weighed and compared to preimplantation weights. This ratio was defined as “Graft Viability Ratio”. Graft Viability Ratio of the first 3 groups were significantly higher than the control group. As a second parameter, lipid extraction area (The bright area within the adipocyte membrane) was compared to whole visual area at same magnification. This ratio was defined as relative adipocyte index. Latter index was significantly higher in prefabricated and VEGF + fat graft groups compared with control and empty microsphere groups.

To sum up, consistent with the current data, prefabrication of the recipient bed using VEGF increased the graft viability ratio and relative adipocyte index. VEGF given at the same time with the grafting procedure also increased the graft viability ratio and relative adipocyte index. This study suggests that, VEGF improves fat graft viability via increased revascularisation.



## GİRİŞ

Otolog yağ dokusu, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahinin pek çok uygulamasında, ideal yumuşak doku dolgu maddesi olarak tanımlanmaktadır<sup>1</sup>. Serbest yağ dokusu ile onarım uygulamaları 19. yüzyılın sonlarında başlamış ve 1970'lerde vakumla yağ alma (liposuction) uygulamalarının tanımlanması ile daha kolay ve sık uygulanabilir bir yöntem olmuştur. Otolog yağ dokusunun doğal yapısı, sınırsız sayılabilecek kaynak ve uygulama pratikliği gibi avantajlarının yanında, en önemli dezavantajı ve geç dönem komplikasyonu greft geri emilimidir<sup>2,3</sup>. Yağ greftlerinin, önceden belirlenemeyen kısa yaşam süreleri ile ilişkili, aktarımı sonrası istenen hacmi sağlayamaması, sık sık ortaya çıkan bir sorundur.

Yağ greftlerinin yaşayabilirliğini açıklamada *Peer'in*<sup>4</sup> 1955'de öne sürdüğü adipositlerde hücre yaşam teorisi halen geçerliliğini korumaktadır. Bu teoriye göre; yağ greftlerinde transfer edilen adipositlerin bir kısmının emildiği, bir kısmının da yaşamaya devam ederek yumuşak doku kütlesi oluşturduğunu ileri sürmüştür.

Yağ greftlerinin yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır ancak, bunların klinik uygulamalardaki yansımaları pek olumlu değildir<sup>5</sup>. Deneysel olarak greft yaşayabilirlik oranlarını artırma yolunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yağ konsantrasyon prosedüründe yaşayan adipoz hücre transplantasyonunu artırma<sup>6</sup>, inflamatuvar mediatörleri yıkama tekniği ile uzaklaştırma<sup>5</sup>, greft dokusundaki mekanik travmayı azaltmak için vakumla yağ alma sırasında negatif basıncı azaltma<sup>8</sup> ve ek olarak E vitamini ve steroid gibi biyokimyasal ortamı destekleyici ajanlar ekleme şeklinde çalışmalar yapılmıştır<sup>9,10</sup>.

Yapılan bazı çalışmalarda, yağ greftinin yüksek damarlanması olan alanlara naklinde yaşayabilirliğinin arttığı ve bu artışın damar zenginliğine bağlı olduğu gösterilmiştir<sup>11,13</sup>. Alıcı alandaki damarlanmayı arttırmak amacıyla farklı yöntemler denenmiştir. *Guarrerosantos ve ark.*<sup>12</sup>, sıçanlarda yaptıkları deneysel çalışmalarında, otolog yağ dokusunun, damarlanması yüksek olan kas içine enjeksiyonu sonrası, uzun dönemde mikroskobik ve makroskobik düzeyde yaşayabilirliklerini arttırdığını belirtmişlerdir<sup>13</sup>. *Baran CN. ve ark.*<sup>11</sup>, yağ transferi öncesi alıcı alana silikon blok yerleştirerek alıcı alan damarsal yatağını arttırmışlardır. Bu işlem, genelde flep cerrahisinde kullanılan prefabrikasyon yöntemi olarak adlandırılabilir.

Yağ grefti, aktarım sonrası ilk dört gün beslenmesini hücreler arası akımdan sağlar. Bu zaman sürecinde, elde edilen oksijen ve besin miktarı yağ grefti yaşayabilirliği için yeterli değildir. Oksijen yetersizliği sonucunda oluşan hipoksi, anjiogenik faktörlerin salınımını

arttırır. Apoptozis, genetik sinyal sonucu oluşan programlı hücre ölümüdür<sup>62</sup>. *Nishimura ve ark.*<sup>3</sup> yeniden damarlanma oluştuktan sonra yağ hücre sayısının azaldığını tespit etmişlerdir. Erken dönemdeki yağ grefti hacim kaybını akut nekroz, geç dönemde oluşan hacim kaybını ise apoptozise bağlı yağ hücre azalmasına bağlamışlardır. Bu durum, yeniden damarlanma oluştuktan sonra bile devam eden yağ grefti hacim azalmasını açıklar.

VEGF bilinen en kuvvetli anjiogenik ajanlardandır. VEGF, özellikle endotel hücrelerine özgü etkilere sahip olan bir büyüme faktörü ailesidir. Endotel hücrelerinin çoğalma<sup>14</sup>, göç ve farklılaşmasını uyarır. VEGF, hem embriyogenez sırasında hem de yetişkinde anjiogenez için önemlidir. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı bir çok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır<sup>15</sup>.

## GENEL BİLGİLER:

### Greft Tipleri ve Tarihçesi

Vücuttaki bir alıcı alana yerleştirmek için bir organizmadan alınan ve belli bir besleyici damarı olmayan doku parçalarına greft denir.

Klinik doku aktarımlarının bilimsel temelleri büyük oranda son 50 yılda içinde atılmakla birlikte, daha önceleri yapılan uygulamalara da rastlanmaktadır. İlk serbest greftlemenin M.Ö. 800 yılında hintliler tarafından yapıldığı bilinmektedir<sup>16</sup>. Hem allojen hem otolog deri greftleri 19. yüzyılda tanımlanmıştır. *Baronio* 1804 yılında koyunlar üzerinde tam kat deri grefti uygulamıştır. *Von Walther* 1820 yılında ilk insan kemik grefti uygulamasını yapmıştır.

Greftler kaynaklarına göre dörde ayrılır:

1. Otogreftler: Verici ile alıcının aynı canlı üzerinde olduğu durumda aktarılan doku parçalarına “otogreft” denir. İmmünolojik uygunsuzluk söz konusu olmadığı için yaşam şansı en yüksek olan ve en sık uygulanan greftlerdir.
2. İzogreftler: Tek yumurta ikizlerinde olduğu gibi aynı genetik yapıyı taşıyan bireyler arasında aktarılan greftlere “izogreft” denir. Yaşam şansı otogreftler kadar yüksektir.
3. Allogreftler: Aynı türden, farklı bireyler arasında doku aktarımına “allogreft” (homogreft) denir.
4. Heterogreftler: Farklı türler arasında yapılan doku aktarımına “heterogreft (ksenogreft)” denir.

Deri, kemik, kıkırdak, tendon, sinir, yağ, fasya ve bazı kompozit dokular greft olarak taşınabilirler.

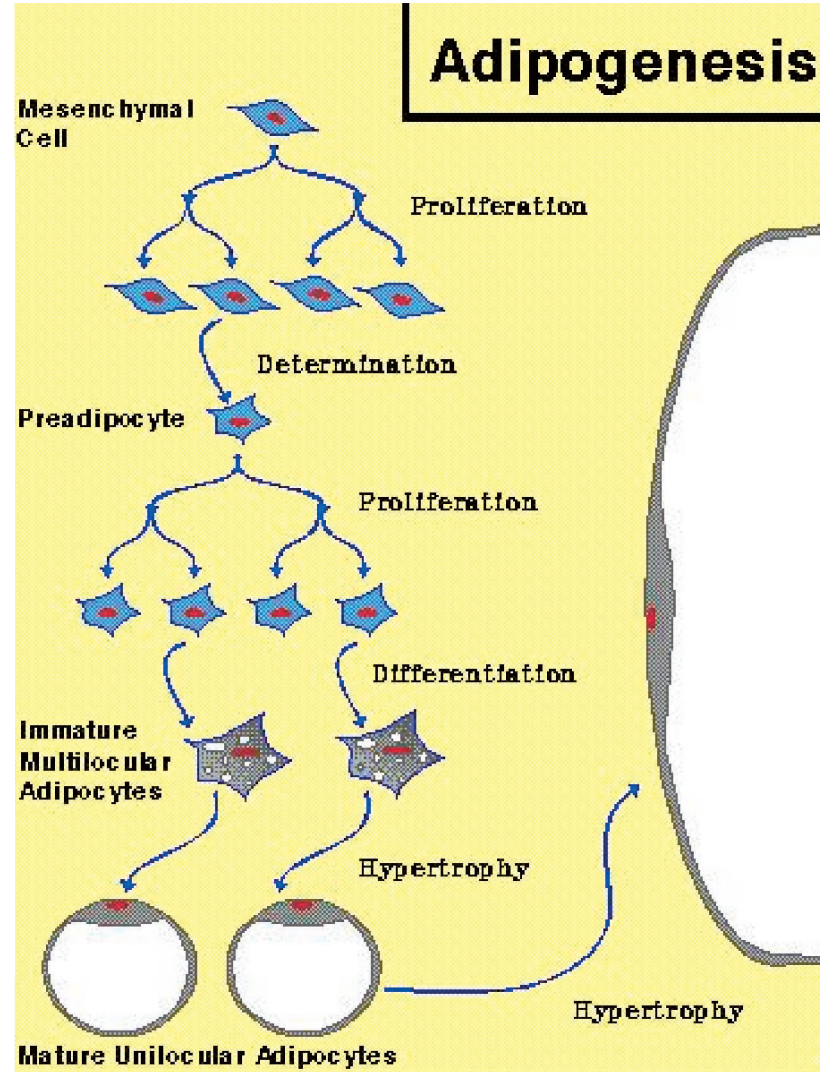
Bireyin kendisinden alınan yağ grefti (otolog) birçok özelliğinden dolayı ideal dolgu maddesi olarak kabul edilir. Yağ dokusu, gelişimsel, anatomik ve fonksiyonel özellikler olarak metabolik aktif olan bir dokudur. Yağ dokusu çeşitli cerrahi uygulamalarda greft olarak kullanılmaktadır<sup>17</sup>. Yağ greftinin yaşayabilirliği ve dayanıklılığı hala tartışma konusudur.

### Yağ Matürasyonu

Yağ dokusu mezenşim kökenlidir. *Invitro* çalışmalardan elde edilen verilere göre multipotent kök hücre ( mezenşimal kök hücre), gestasyonun geç aşamalarında moleküler yönlendiriciler ile kondroblast, osteoblast ve adipoblast gibi mezenşim kökenli dokuların öncül hücrelerine farklılaşırlar. Bu olay determinasyon diye tanımlanmaktadır. Farklılaşan adipoblastlar çevresel ve moleküler faktörlerin etkisiyle preadiposite, bunlarda son farklılaşma ile adipositlere dönüşür. Matür adipositler fiziksel travmaya dirençli olmayan, sitoplazmasında yüksek lipid konsatrasyonu (%90'dan fazla) bulunan, farklılaşma ve bölünme



özelliği olmayan hücrelerdir. Matür adipositlerin sadece hacimlerinde artış olabilir, sayı olarak artamazlar<sup>17</sup>.



Şekil I: Yağ hücrelerinin mezenkimal hücreden farklılaşma süreci

### Yağ Grefti ve Tarihçesi

Otolog yağ greftleri, plastik cerrahi, toraks cerrahisi, abdominal cerrahi, nörocerrahi, ortopedik cerrahi ve meme cerrahisinde, farklı cerrahi yöntemlerle kullanılmıştır<sup>18</sup>.

İlk yağ dokusu aktarımının, 1889 yılında *Van der Meulen* tarafından diafram ile karaciğer arasına omentum ve yağ dokusundan oluşan bir greft yerleştirerek gerçekleştirilmiştir. Plastik Cerrahide yağ grefti hakkındaki ilk bildiri *Neuber* tarafından 1893 yılında 22. Alman Cerrahi Toplantısında yapılmıştır. *Neuber*, koldan aldığı serbest yağ bloklarını deprese fasyal defektlerin onarımında, kullanmıştır. Daha sonra *Czerny* 1895 yılında yağ dokusunu meme onarımında kullanmıştır. Bu çalışmaları *Lexer ve Rehn*'in çalışmaları takip etmiştir. *Lexer* 1910 yılında modifiye *Neuber* tekniğiyle tek bir yağ bloğunu çökük yanak ve çeneyi doldurmak amacıyla kullanmış, kısa ve uzun dönem sonuçlarının çok iyi olduğunu bildirmiştir. *Bruning* 1911 yılında yumuşak doku doldurulması amacıyla otolog yağ greftinin subkutan olarak enjeksiyonunu yapmıştır.

*Peer* 1950'lerin sonunda deneysel olarak, serbest yağ transferinden bir yıl sonra, greftinin %50'sinden fazlasının yaşadığını göstermiştir. Bununla beraber kaybolan yaklaşık %50'lik kısım, serbest yağ transferinin etkisinin yetersizliği savını güçlendirmiştir.

Yağ transplantasyonunun gerçek anlamda gelişimi 1970'lerin sonunda *Fischer* ile başlar. *Fischer* tanımladığı yöntem ile günümüzde uygulanan vakumla yağ alma yönteminin öncüsü olmuştur. 1970'lerin sonunda ve 1980'lerde *Yves-Gerard Illouz* günümüz vakumla yağ alma tekniğini, yağ çıkarılması ve yaşayan yağ hücrelerinin transplantasyonunu tariflemiştir. Vakumla yağ alma cerrahisinin ilerlemesiyle birlikte yağ enjeksiyonu dramatik şekilde tekrar farkedildi. 1986 yılında Amerikan Dermatolojik Cerrahi Kongresinde *Pierre Fournier* "Mikrolipoenjeksiyon" adını verdiği, 13 gauge'lık iğne ile yaptığı modifiye yağ grefti tekniğini sunmuştur.

*Klein* 1987'de, tümesan anesteziyi tanımlamıştır. Bu teknik, seyreltilmiş anestezi solüsyon ile geniş hacimli alanlara direkt infiltrasyonu hedefliyordu. Bu yaklaşım vakumla yağ alma cerrahisinde yeni yapılanma ve taze yağ greftine ulaşabilmeyi sağlıyordu. *Klein*'nin tekniği ile anlamlı derecede daha az kan kaybı, anestezi riskinde azalma ve postoperatif aneljezi ihtiyacında azalma sağlandı.

*Fournier* mikrokanül kullanarak yağ transferi fikrini güçlendirerek yeniden popülerize etmiştir. Bu teknik *Asken* tarafından modifiye edilerek, vakumla yağ almada kullanılmak suretiyle yağ ile yumuşak doku augmentasyonu yapılmıştır. Daha küçük kanüller kullanılması, hasta tarafından daha iyi tolere edilebilirlik ve daha iyi estetik sonuçları doğurduğu öne sürülmüştür. Bu gelişmelerden sonra otolog yağ greftleri Plastik Cerrahinin pekçok uygulamasında, ideal yumuşak doku maddesi olarak kullanılmıştır<sup>18,19</sup>.

Otolog yağ grefti, pekçok yazar tarafından "ideal yumuşak doku maddesi" olarak tanımlanmıştır. Tanımlanmış birçok avantajı ve dezavantajı vardır.

#### **Avantajları:**

Sınırsız sayılacak kaynak

Kolay uygulanabilirlik

Güvenli

Doğal

Stabil (Hareketli değil)

#### **Dezavantajları:**

Verici alan morbiditesi

Postop Ödem

Emilim

Yağ greftinin elde edilmesinde tariflenmiş üç ana yöntem vardır. Bunlardan birincisi eksizyon yöntemiyle elde edilen yağ dokusunun herhangi ek bir işlem yapılmadan direkt alıcı alana yerleştirilmesi. Bu yöntem, yağ greftinin yerleştirilmesi sonrası damarlanma sürecinin

periferden başlaması ve merkezdeki yağ hücrelerinin daha hızlı nekroza uğraması nedeniyle günümüzde tercih edilmemektedir<sup>58</sup>. İkinci yöntem, eksizyon yöntemiyle elde edilen yağ dokusunun dermal yapılarla birlikte veya yalnız olarak küçük parçalara ayrılarak alıcı alana yerleştirilmesidir. Bu yöntemde amaç, yağ greftinin damarlanma sürecini hızlandırarak yaşayabilirliğini arttırmak ve yağ greftinin emilimini azaltmaktır<sup>109</sup>. Üçüncü ve en popüler yöntem ise kontur deformitelerinde kullanılan vakumla yağ alma tekniğinden sonra elde edilen yağ dokusu içeren sıvının doğrudan yada santürfüj uygulanarak alıcı alana enjeksiyonudur<sup>18</sup>.

Yağ grefti aktarım sırasında damarlanması kaybolur ve kısmi travmaya uğrar. Yağ grefti aktarımından bir gün sonra alıcı alana makrofaj, histiyosit ve multinükleer dev hücrelerin göçünü takiben nötrofil infiltrasyonu olur ve hücresel artıklar temizlenir<sup>57</sup>. Yağ greftlerinde aktarımdan 2-4 gün sonra yeniden damarlanmanın başladığı gözlenmiştir<sup>3,47,54,56</sup>. Fakat bu yeniden damarlanma periferdeki hücrelerle sınırlı olarak gelişir<sup>58</sup>. Yeni damarsal ağ yeterli düzeye gelene kadar yağ hücrelerinin ölümü devam eder. İlerleyen dönemlerde fibröz doku artışı kaybedilen hacmi tamamlayamaz.

Yağ greftleri alıcı alana yerleştirildikten sonra zaman içinde bir erime sürecine girerler. Bunu önlemek amacıyla pekçok yazar tarafından çalışmalar yapılmıştır. *Eppley*<sup>19</sup> tarafından greftlerin modifiye edilmesi fikri ortaya atıldıktan sonra, *Baran C.N.*<sup>11</sup> tarafından, greft alıcı alan damarlanmasını arttırmaya yönelik, alıcı alana silikon blok yerleştirilmesi sonucu kapsül oluşumu ile alıcı alan damarlanmasını arttırmak uygulaması yapılmıştır. Bu uygulama, greft alıcı alanını önceden hazırlamak (prefabrikasyon) olarak tanımlanabilir. Alıcı alan damarlanmasının arttırılmasında birçok teknik ve ajanlar kullanılmıştır.

*Elçin ve ark.*<sup>12</sup>, kalsiyum aljinat mikroküreciklerle 165 aminoasitli insan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'nü (VEGF) sıçanlarda ciltaltına uygulayarak, ciltaltı damarlanmasının arttığını göstermişlerdir<sup>12</sup>.

Yeni damar oluşumu sürecinde en önemli kofaktörün VEGF olduğu bilinmektedir. İnvitro modellerde iskemik deri fleplerinin yaşayabilirliği ile yeni endotelyal hücre oluşumunun direkt ilişkili olduğu ve bu süreçte VEGF'nin primer mediatörlerden biri olduğu tespit edilmiştir<sup>65</sup>. Bu yüzden de son yıllarda ilgi odağı haline gelmekte ve birçok araştırmaya konu olmaktadır.

### **Vasküler Endotel Büyüme Faktörleri (VEGF)**

VEGF, özellikle endotel hücrelerine özgü etkilere sahip olan bir büyüme faktörü ailesidir. Endotelin çoğalma, göç ve farklılaşmasını uyarır. VEGF, hem embriyogenez döneminde hem de insanda anjiogenez için önemlidir. Bu büyüme faktörü, hem yeni damar



oluşumunda hem de endotel hücrelerinin yaptığı diğer bir çok fonksiyonda rol almaktadır. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır. Bu yüzden de son yıllarda ilgi odağı haline gelmiş ve birçok araştırmaya konu olmuştur.

VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde bir damarsal sızıntı başlattığı için Vasküler Permeabilite Faktörü olarak isimlendirilmiştir. Bu aileden ilk özel anjiogenik büyüme faktörü izole edilmiş ve buna “vaskülotropin” veya “vasküler endotelial büyüme faktörü” adı verilmiştir. 1980’ lerin sonunda diğerleri bu aileye eklenmiştir.

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) süperailisinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Placenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) adları verilen altı üyeden oluştuğunu göstermiştir.

**VEGF-A** geni, kromozom 6p21.3’teki lokalizasyonda kodlanmıştır. Aynı zamanda Human-VEGF olarak bilinir. VEGF-A bazı makalelerde sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır. VEGF-A’nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> olarak adlandırılmışlardır ve alttaki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir. Bu izoformlardan VEGF<sub>121</sub> hariç, hepsi heparine bağlanmaktadır. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub> ve VEGF<sub>165</sub> salgılandığında kolayca diffüze olur ve erimiş formları sıvılarda saptanabilir. VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> ise salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve varlıkları testlerle kolayca saptanamaz. VEGF<sub>206</sub>, VEGF’ün orijinal karakteristik formu olup, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir. VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>’in aksine hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanan formdur. VEGF<sub>189</sub> heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve artırır.

**VEGF-B**, başlangıçta VEGF-A ile %23’ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Daha sonra, alternatif dilimlenme ile tamamen farklı terminal COOH- grupları içeren 167 amino asitli bir proteine dönüşür. VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)’e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır.

**VEGF-C**, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16’sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol

oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak damarsal ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar. Yapılan bir deneyde, transjenik farelerin derisinde VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, bununla beraber damarsal doku oluşmadığı rapor edilmiştir. VEGF-C'nin Kaposi sarkomunda önemli oranda rol aldığı görülmüştür.

**VEGF-D**, 334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir. C-terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir. Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar.

**VEGF-E**, VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir.

**PlGF**, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni amino asitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 amino asit içeren son şekli oluşur. VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir. Sentezi, endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu arttırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır. Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir.

VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir. Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'nin demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arterioller çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir. VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming büyüme faktörü-  $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1) ve interleukin-  $\beta$ 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E2 (PGE2) gibi bazı küçük mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür.

Hipoksi, belki de, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiogenezi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin hipoksik



merkezleri oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'yi arttırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmiştir. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir. Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır.<sup>12,15</sup>

Birçok büyüme faktöründe olduğu gibi, göreceli olarak kısa biyolojik yarı ömründen dolayı VEGF nin hızlı yıkımı nedeniyle dışardan verilmesi sınırlıdır<sup>97</sup>. Sistemik uygulama ile verildiğinde, hedef organda etkin miktara ulaşamamaktadır. Yüksek dozlarda sistemik uygulandığında ise tekrarlayan hipotansiyon atakları gibi istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır<sup>98</sup>.

*Elçin ve ark.*<sup>11</sup> VEGF' nin kalsiyum aljinat mikroküreciklerinden *in-vitro* salınım davranışı ve sıçanlarda ciltaltı dokuda kontrollü salınım sisteminin lokalize damarlanma üzerine etkisini incelemişlerdir. VEGF' yi, kısa yarı ömrü ve sistemik olarak kullanıldığında istenmeyen yan etkileri bulunduğundan, lokal ve yavaş salınımını sağlamak için kalsiyum aljinat mikrokürecikler içinde çözündürerek kullanmışlardır. VEGF mikroküreciklere verilen anjiogenetik cevap, histolojik, histopatolojik ve immünboyama ile kanıtlanmıştır. Küreciklerle ciltaltı doku arayüzündeki yüksek yoğunluktaki immün boyanma VEGF salınımının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Birinci ve ikinci hafta örneklerinde immün boyanmada gözlenen belirgin artış *in vivo* salınımın, *in-vitrodan* daha uzun sürdüğünü göstermektedir.

## AMAC

Bu çalışmada, sıçan otolog yağ grefti uygulamalarında, iki farklı grupta greft ile eş zamanlı verilen VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler ile VEGF'nin kontrollü salınımı sağlanarak yağ greftinin damarlanma sürecini hızlandırmak ve önceden VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler ile prefabrike ederek, alıcı alanın damarlanmasının artırılması yoluyla, greftlerin yaşayabilirliğini arttırmak ve otolog yağ greftlerinin en sık ve en istenmeyen komplikasyonu olan geri emilimin engellenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada, ağırlıkları ortalama 340 ( $\pm$  20 ) gr., 24 adet, erkek, Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Tüm deney hayvanlarına National Institute of Health tarafından yayınlanmış olan (NIH Publication No.86-23, revisited 1985) Institute of Laboratory Animal Resources tarafından hazırlanan “Laboratuar Hayvanları Kullanımı ve Bakım Klavuzu” ve “National Society for Medical Research” tarafından düzenlenen laboratuar hayvanlarının bakım prensiplerine uygun olarak gerekli bakım uygulanmıştır.

Tüm cerrahi girişimler 0.5 ml anestezi karışımı (ketamin 100 mg/ml + ksilazine 20 mg/ml) anestezisi altında, steril koşullar altında gerçekleştirildi.

Denekler her grupta 6 hayvan olacak şekilde, 4 gruba ayrıldı.

### Mikroküreciklerin Hazırlanması

ARLAB (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı) imkanları kullanılarak mikrokürecikler hazırlandı. Sodyum aljinat (SIGMA A0682, San Diego, CA, U.S.A.) kuru tozu hassas terazi ile tartılarak 20 ml % 2'lik sodyum aljinat çözeltisi için gerekli miktar tartıldı ve 20 ml % 0.9 NaCl (Eczacıbaşı) içerisinde çözüldü. Çözünmenin tamamen gerçekleşmesi için 24 saat raf üzerinde oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan visküz sıvı 20,000x g hızla 3 saat santrifüje edildi. Süpernatant toplandı ve çökelti atıldı. Süpernatant, steril tüplerde alıkatlandı ve gece boyu (12 saat) ARLAB hücre kültür odasında, raf üzerinde, ultraviyole ışıkta bekletilerek sterilizasyon sağlandı.

Her sıçan için, 2.5  $\mu$ g VEGF<sub>165</sub> (SIGMA V7259) 0.4 ml % 0.9 NaCl içinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar, 4°C' de, 3 ml sodyum aljinat içeren steril cam kaplarda karıştırıldı. El ile hafifçe karıştırıldıktan sonra karışım 23 gauge hipodermik iğne ile kaptan alındı.

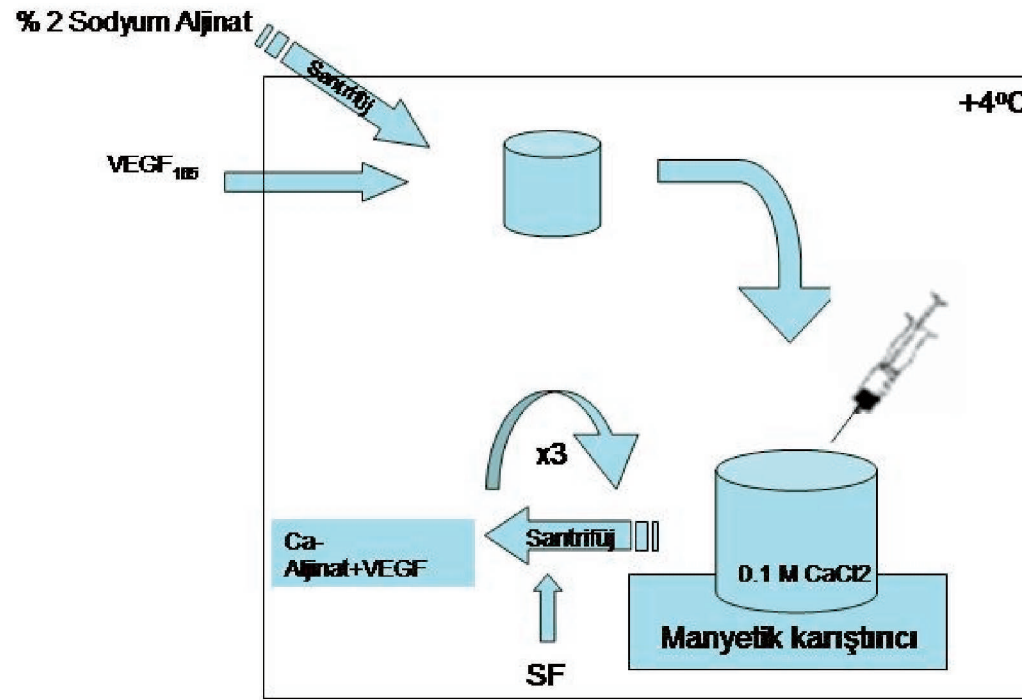
Elli ml, 0.1 M kalsiyum klorür (Sigma-Aldrich C1016) oda sıcaklığında hazırlandı. Çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde kırılmış buz içeren cam kaba damlalar halinde katıldı.

Karışım manyetik karıştırıcıda 4°C' de bir gece karıştırıldı. Karışım santrifüje edilerek kürecikler elde edildi. Küreciklerin çapları 150-700  $\mu$ m arasındaydı.

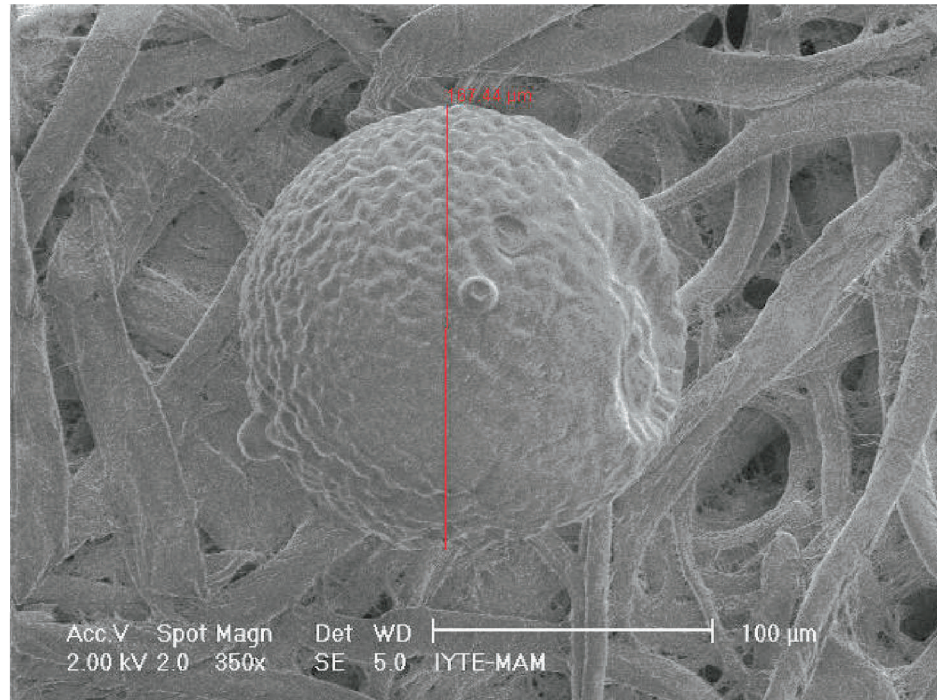
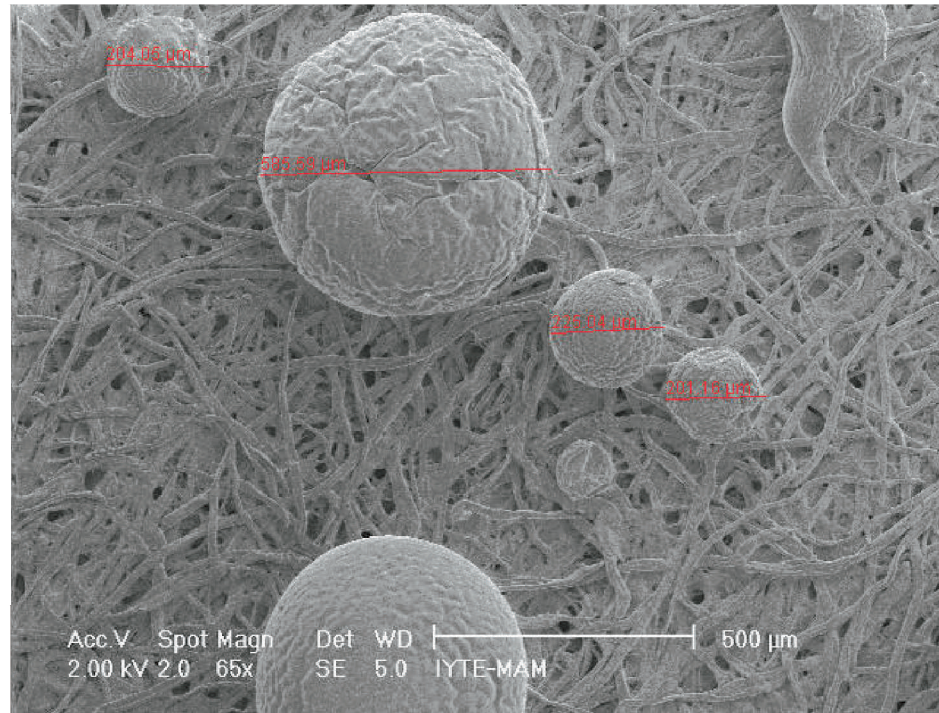
Kontrol grubunda kullanılacak kürecikler, % 0.9 NaCl ile hazırlandı.



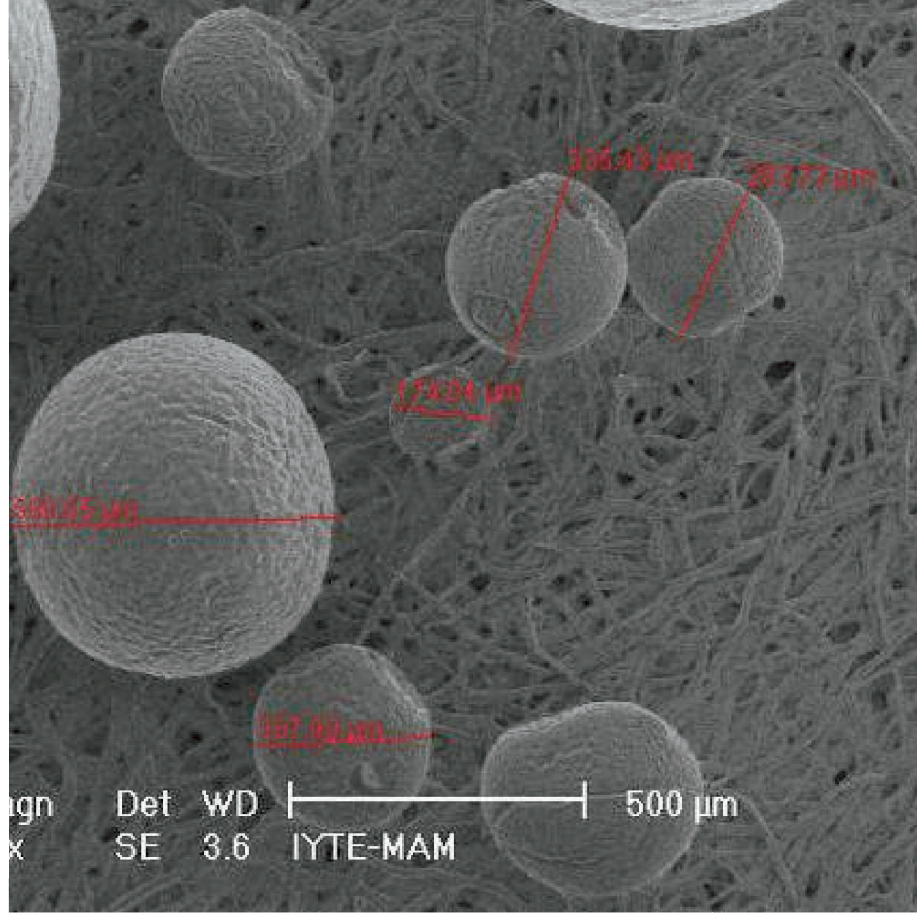
## Küreciklerin hazırlanması



Şekil II: VEGF içeren kalsiyum aljinat mikroküreciklerin hazırlanışı







Resim I-II-III: Mikroküreciklerin elektron mikroskop görüntüsü

### Gruplar

Grup I ( Prefabrikasyon grubu, n=6 )

Hazırlanan 2 µg /0,1 ml VEGF içeren kalsiyum aljinatlı mikrokürecikler, 23 gauge iğne kullanılarak deneklerin sırtında traş edilerek hazırlanan alana subdermal olarak enjekte edildi. Enjeksiyon alanına 5/0 prolene ile işaret sütürü konuldu. 21 günlük bekleme süresi sonrasında işaretli alana yağ grefti uygulaması yapıldı.

Grup II (VEGF Grubu, n = 6)

Bu gruptaki hayvanlara, greftleme ve 2 µg/ 0.1 ml VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler eşzamanlı olarak verildi.

Grup III (Boş Mikrokürecik Grubu (sham), n = 6 )

SF içeren boş mikrokürecikler, yağ grefti ile eşzamanlı olarak verildi.

Grup IV ( Kontrol Grubu, n = 6 )

Bu gruba ek bir cerrahi girişim yapılmadan, diğer gruplarla eşzamanlı yağ grefti uygulaması yapıldı.

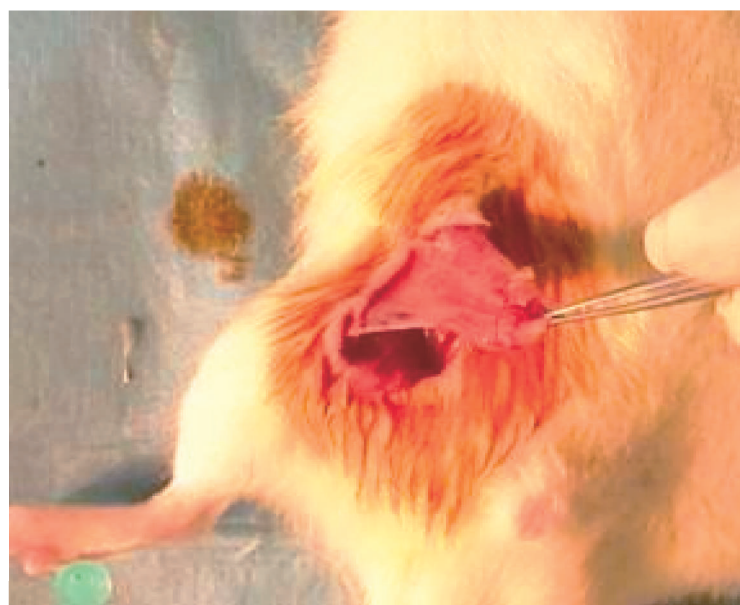


| Gruplar ve Zaman | Grup I (n=6)<br>Prefabrikasyon grubu | Grup II (n=6)<br>VEGF grubu | Grup III (n=6)<br>Boş mikrokürecik grubu | Grup IV (n=6)<br>Kontrol grubu |
|------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Başlangıç</b> | Subdermal VEGF enjeksiyonu           | Greftleme işlemi + VEGF     | Greftleme işlemi + Boş kürecik           | Greftleme işlemi               |
| <b>21. gün</b>   | Greftleme işlemi                     | -                           | -                                        | -                              |
| <b>90. gün</b>   | -                                    | Örneklerin toplanması       | Örneklerin toplanması                    | Örneklerin toplanması          |
| <b>111. gün</b>  | Örneklerin toplanması                |                             |                                          |                                |

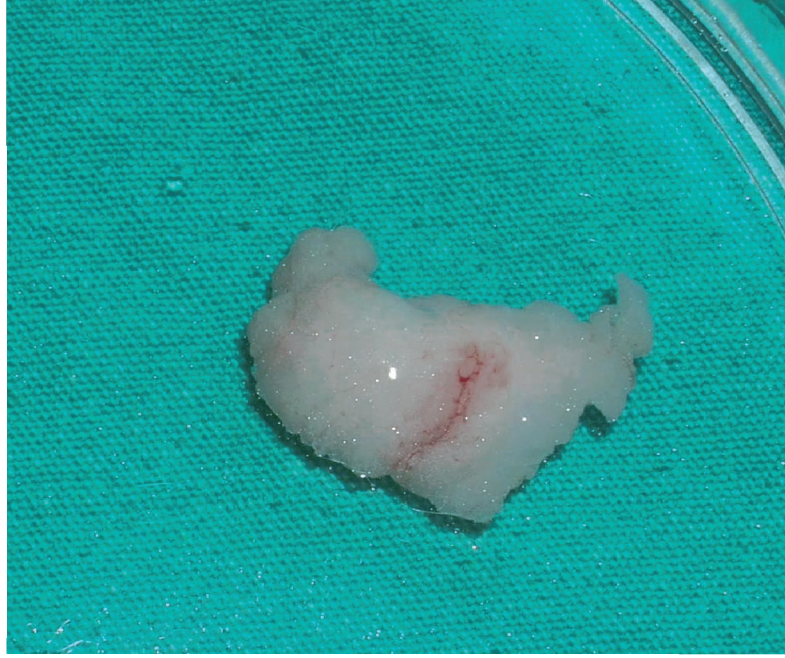
Tablo I: Gruplar, işlem zamanı ve sıralaması

### Cerrahi İşlem

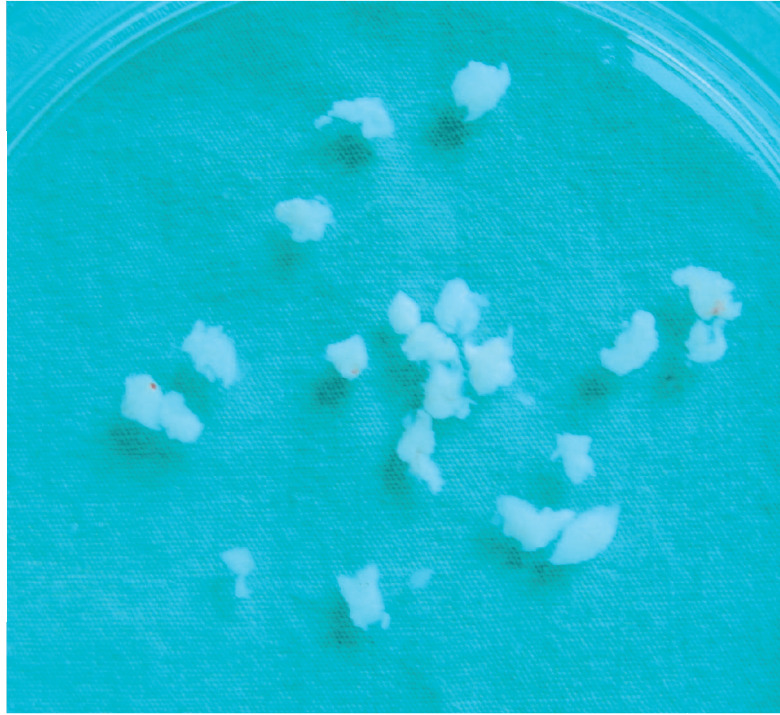
İntraperitoneal olarak verilen, 0.5 ml anestetik karışım (ketamin 100 mg/ml + ksilazine 20 mg/ml) indüksiyonu ile anestezi sağlandı. Sırtüstü tespit edilen sıçanın sağ inguinal bölgesine yaklaşık dört santimlik oblik insizyonla cilt ve pannikulus karnosus yapıları geçilerek inguinal adipofasyal flebe ulaşıldı. Flep elevasyonunun ardından inferior epigastrik arter ve ven bağlanarak, inguinal adipofasyal doku çıkarıldı. Elde edilen yağ kütlesi, 2-4 milimetrelik parçalara kesilerek ayrıldı. İki-dört mm. lik greft haline getirilen yağ dokusu % 0.09 NaCl ile yıkandıktan sonra, steril kağıtlar ile kurutuldu. Hazırlanan yağ greftlerinin ağırlıkları ortalama 0.5 gram (+/- 0.1 gram) olacak şekilde hazırlandı. Greftlerin bölünmesinde amaç, aktarılacak yağ dokusunun ağırlığını tam olarak tespit edebilme zorunluluğu ve vakumla yağ alma tekniğinin sıçanlarda zor olmasıdır. Greft verici alanı 4/0 ipek ile primer suture edildi.



Resim IV: İnguinal adipofasyal dokunun elevasyonu



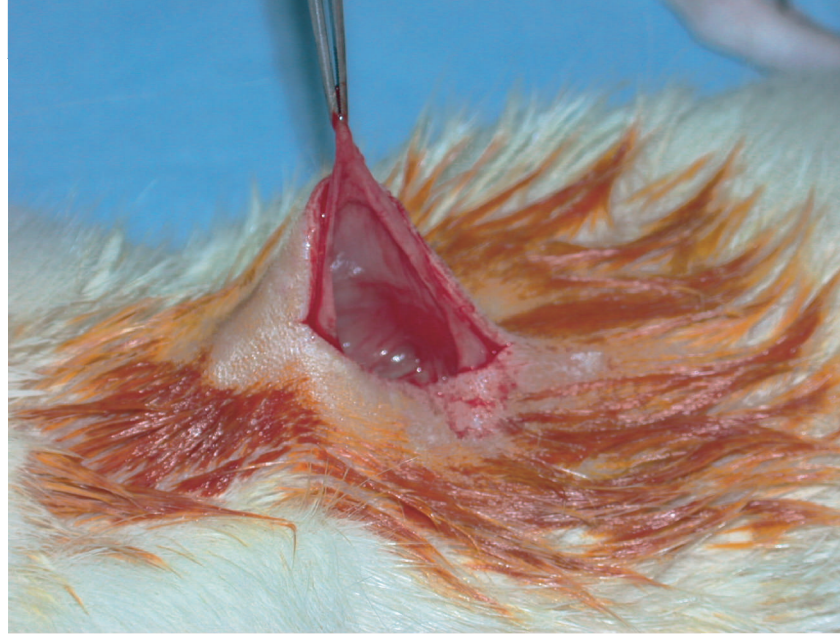
Resim V: Çıkartılan greft



Resim VI: 2-4 mm. lik parçalara ayrılmış greft

Her sıçanın sol dorsolumbar bölgede 2x2 santimetrelik alanları traş edildi. Bu alan, yağ dokusundan fakir olması ve işlem sonrası yağ greftine kolay ulaşılabilmek hedeflendiği için seçildi. Traşlı alanının medialininden yapılan insizyonla cilt ve pannikulus karnosus geçilerek alttaki gevşek areolar dokuya hazırlanmış yağ grefti ve grup 2 de VEGF içeren mikrokürecikler ve grup 3 te boş mikrokürecikler karıştırılarak yerleştirildi. Grup 1 (prefabrikasyon grubu) ve grup 4 (kontrol grubu)'e eşzamanlı mikrokürecik uygulaması yapılmadı. Pannikulus karnosus tabakası, greft çıkarılması esnasında yağ greftinin lokalizasyonunun bulunmasını kolaylaştırmak amacıyla 5/0 prolen sütür ile sütüre edildi. Greft alıcı alanının cildi 4/0 ipek ile sütüre edildi.





Resim VII: Greft alıcı alanının hazırlanması



Resim VIII: Greftin alıcı alana yerleştirilmesi

## POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME

### *1) Klinik takip ve gözlem:*

Postoperatif bakım süresince tüm denekler lokal ve sistemik enfeksiyon, seroma oluşumu, abse formasyonu, doku nekrozu açısından takip edildi. Tüm deneklerin toplam vücut ağırlıkları kaydedilerek, operasyon öncesi vücut ağırlıkları ile karşılaştırıldı.

### *2) Greftlerin Toplanması, Ağırlıklarının Ölçülmesi ve Data Analizi:*

Yağ grefti ağırlığının değerlendirilmesi, güncel literatürde hacim stabilitesinin göstergesi olarak kullanılmaktadır <sup>19-21</sup>. Yağ grefti uygulamasından 90 gün sonra tüm deneklerin yaşamları sonlandırılarak, greftler çıkarıldı. Çıkarılan greftler, yıkanıp kurutularak ağırlıkları ölçüldü. Çıkarılan greft doku ağırlığı, işlem öncesi ölçülen greft doku ağırlığına bölünerek greft yaşayabilirlik oranları belirlendi. Tüm grupların greft yaşayabilirlik oranı ortalaması hesaplandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

### *3) Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme:*

Tüm gruplarda çıkarılan yağ greftleri, %10 formol solüsyonu içinde fiske edilerek, parafin bloklara gömüldü. sekiz µm lik kesitler alınarak hemotoksilen ve eozin ile boyandı.

Örneklerin her bir kesitinde birçok alan gözlemlenerek yağ doku histolojisi değerlendirildi. Her gruptan, rastgele seçilen üç denekten alınan üç kesit, küçük büyütme altında ışık mikroskopisinde incelendi. İncelenen kesitlerin ışık mikroskobu altında dijital fotoğraflama örnekleri yapıldı.

Elde edilen dijital resimler, bilgisayar yardımlı imaj analiz programı; Image Pro Plus (Media Cybernetics) yardımıyla morfometrik olarak değerlendirilerek adiposit alan yüzdeleri hesaplandı. Morfolojik değerlendirmede, adiposit membranları içinde kalan, lipid ekstraksiyonuna uğramış parlak alanın, tüm dokuya olan oranı hesaplandı. Bu oran greftin göreceli adiposit içeriğinin indeksi olarak kabul edilmiştir<sup>22</sup>. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### ***4) İstatistiksel Değerlendirme:***

Tüm veriler bilgisayar ortamına aktarılarak SPSS 11.0 for Windows<sup>e</sup> istatistik programına yüklenerek değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark tek yönlü ANOVA post-hoc LSD testi ile belirlendi. İkili grup karşılaştırmaları için Student's *t* testinden yararlanıldı. Anlamlılık seviyesi parametrik değerlendirmede  $p<0.05$  olarak, nonparametrik değerlendirmede ise  $p<0.01$  kabul edildi.

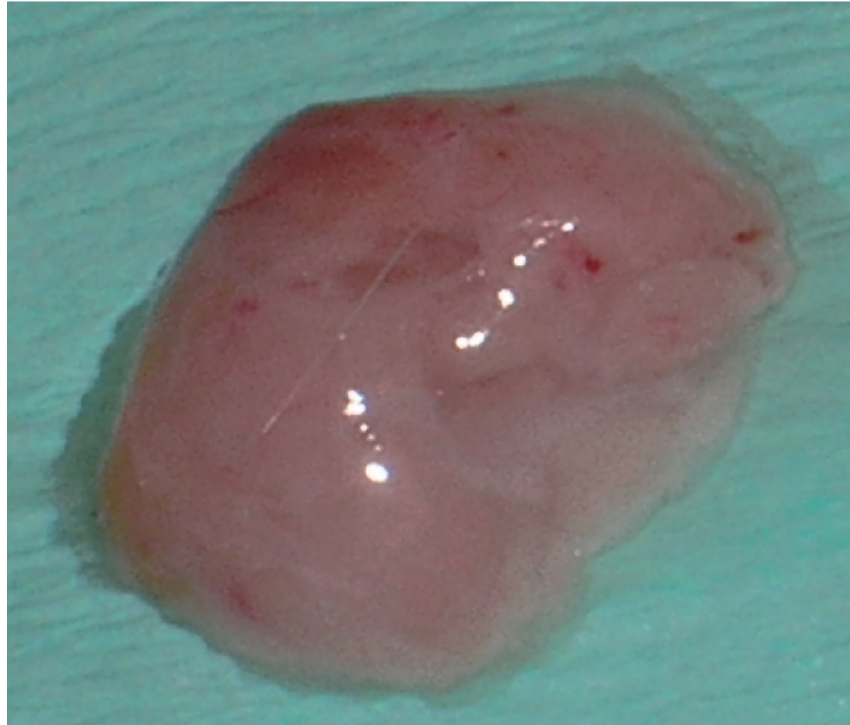
## BULGULAR

### *1) Klinik Takip ve Gözlem:*

Greftleme işlemi sonrası denekler 90 gün takip edildi. Tüm denekler, cerrahi işlemi komplikasyon olmadan tolere ettiler. Deneklerin cerrahi sonrası takiplerinde; akut inflamasyon, abse formasyonu, seroma, doku nekrozu gibi komplikasyonlar gelişmedi.

Tüm deneklerin toplam vücut ağırlıkları kaydedilerek, operasyon öncesi vücut ağırlıkları ile karşılaştırıldı. Toplam vücut ağırlıklarının artışı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tüm deneklerde, yaşam sonlandırma işlemi sonrasında alıcı alan üzerinden yapılan insizyonla cilt ve pannikül dokusu geçilerek yağ greftine ulaşıldı. Yağ grefti sınırları belirgin, kolaylıkla disseke olabilen, çevre dokudan gevşek bağ dokusu ile sınırlanmıştı.



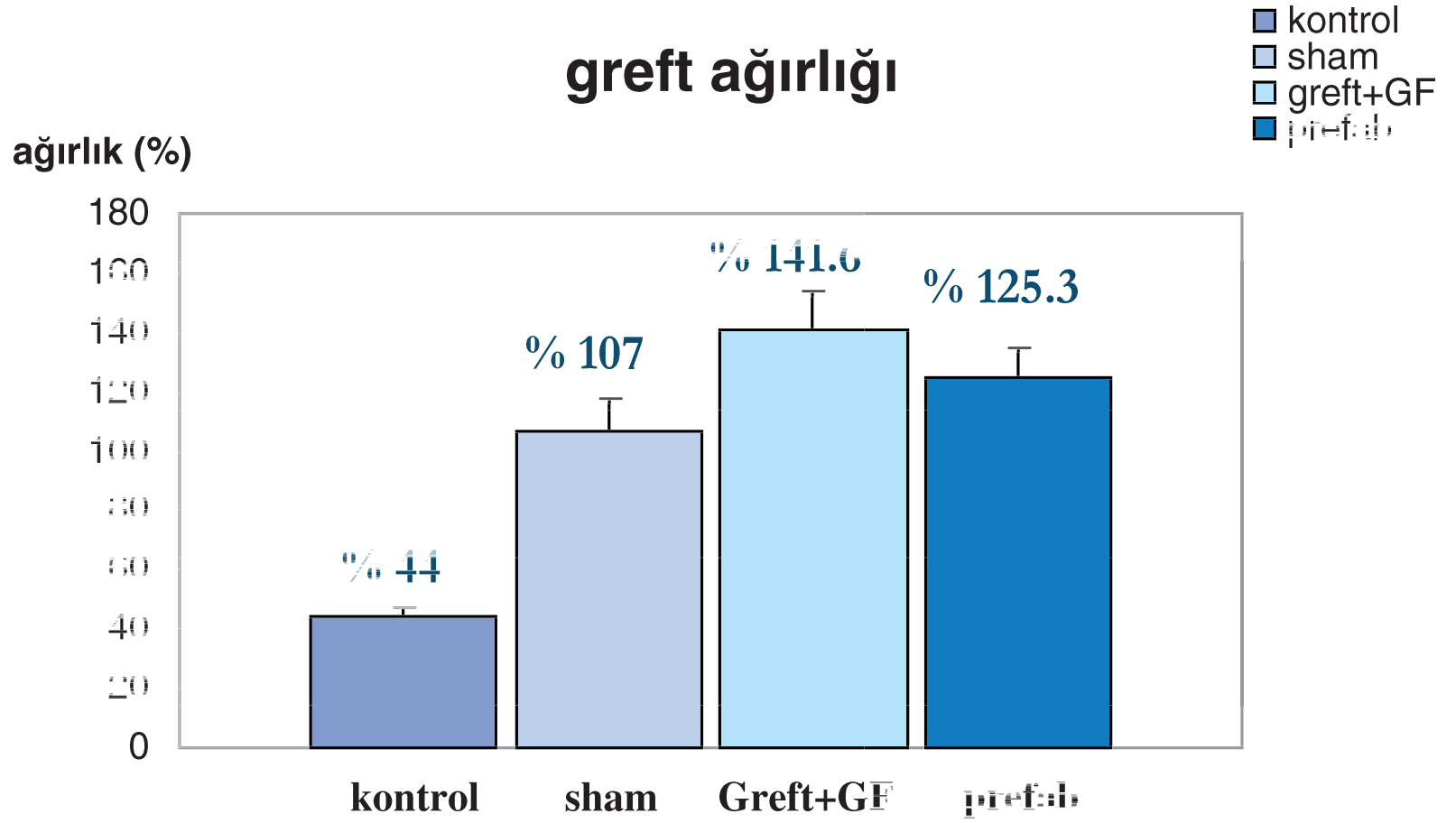
Resim IX: Postoperatif çıkarılan yağ grefti

### *2) Greftlerin Toplanması, Ağırlıklarının Ölçülmesi ve Data Analizi:*

Yağ grefti uygulamasından 90 gün sonra tüm denekler sakrifiye edilerek, greftler çıkarıldı. Çıkarılan greftler, yıkanıp kurutularak ağırlıkları ölçüldü. Çıkarılan greft doku ağırlığı, işlem öncesi ölçülen greft doku ağırlığına bölünerek greft yaşayabilirlik oranları belirlendi. Tüm grupların greft yaşayabilirlik oranı ortalaması hesaplandı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SH) olarak gösterildi. Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Tedavi (Grup I ve II) ve boş mikrokürecik (Grup III) gruplarının ortalama canlılık oranlarının kontrol grubuna (Grup IV) göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). Grup ortalamaları (ortalama  $\pm$  SH) sırasıyla; kontrol grubu (Grup IV): % 44 $\pm$ 2,9, boş mikrokürecik grubu (Grup III): % 107 $\pm$ 26 , greft + VEGF grubu (Grup



II):  $141,6 \pm 12,8$ , prefabrikasyon grubu (Grup I):  $125,3 \pm 9,9$  olarak hesaplandı (Şekil I). Her iki tedavi grubunun ağırlık ortalamalarının t-testi ile karşılaştırılması sonucu aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ( $p=0,340$ )



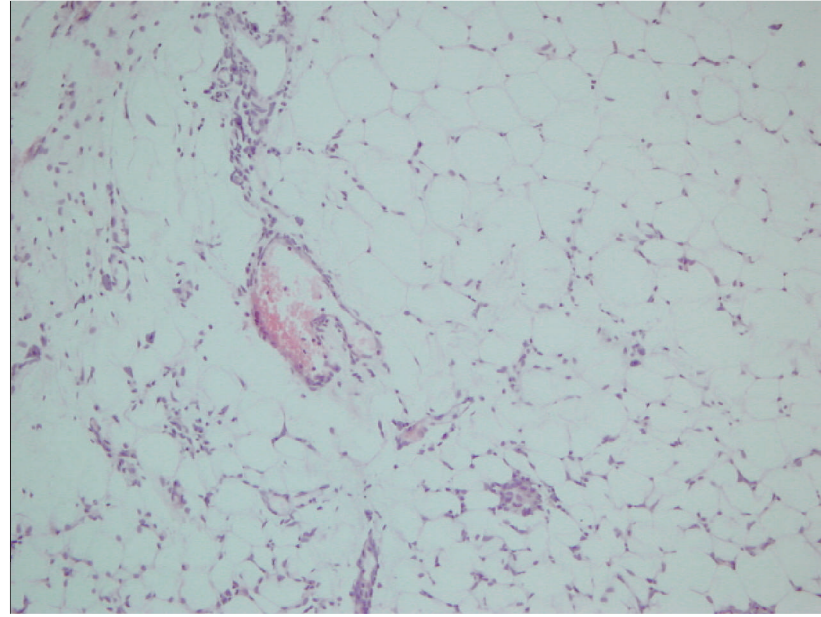
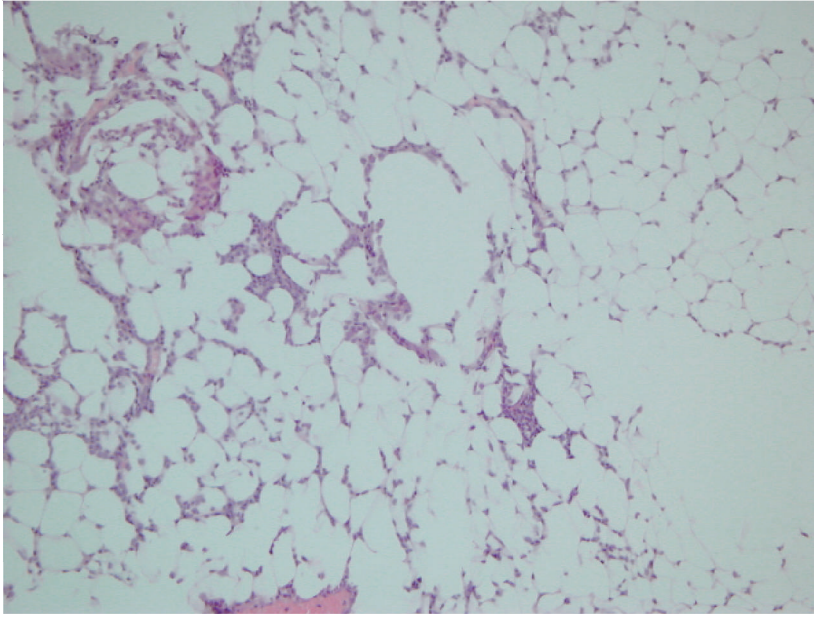
Tablo II: Tüm grupların greft postoperative ağırlıklarının, preoperative ağırlıklarına oranı.

### 3) *Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme:*

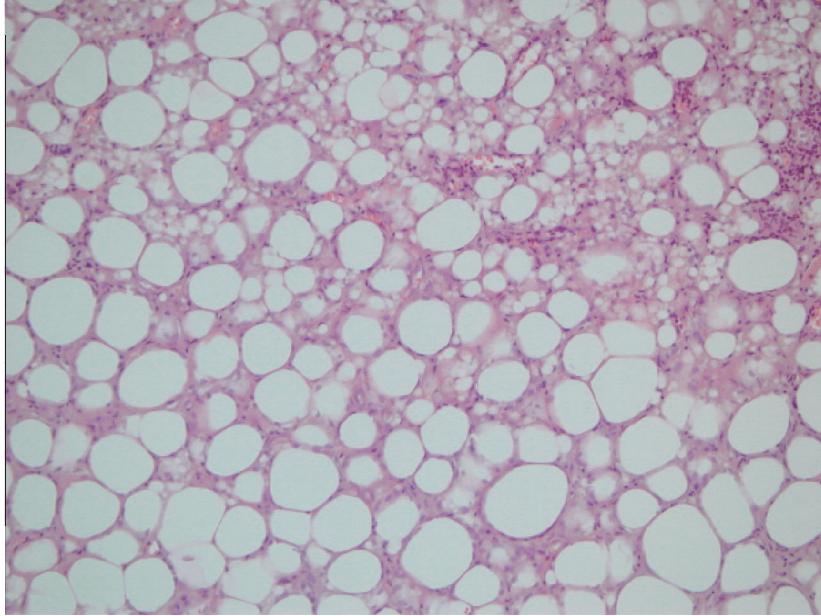
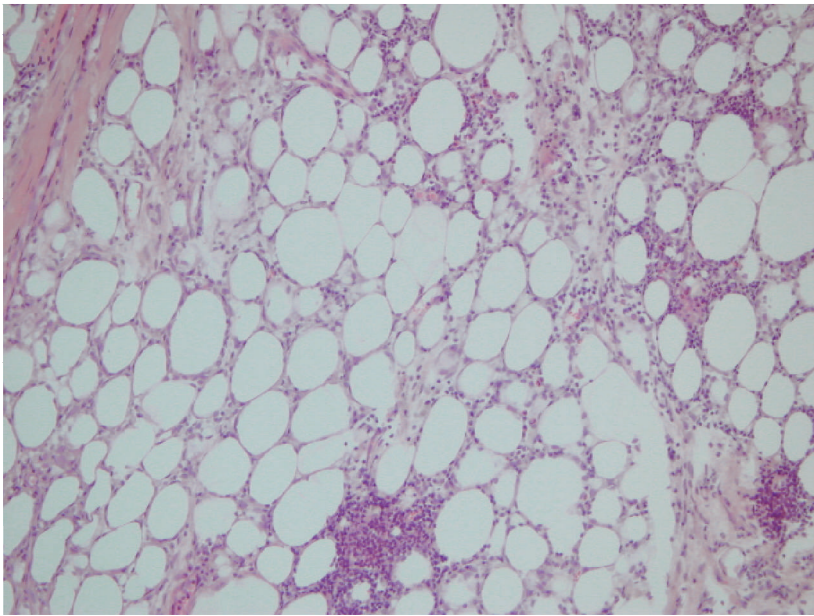
Morfolojik değerlendirmede, adiposit membranları içinde kalan, lipid ekstraksiyonuna uğramış parlak alanın, tüm dokuya olan oranı hesaplandı. Bu oran greftin göreceli adiposit içeriğinin indeksi olarak kabul edilmiştir<sup>3</sup>.

Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Prefabrikasyon grubunun total fibrotik alan yüzdesinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu ( $p=0,018$ ), boş mikrokürecik grubunun total fibrotik alan yüzdesinin ise kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ( $p=0,001$ ). Grup göreceli adiposit indeks ortalamaları (ortalama  $\pm$  SH) sırasıyla; kontrol grubu:  $80,6 \pm 4,0$ , prefabrikasyon grubu:  $94,5 \pm 1,5$ , boş mikrokürecik grubu:  $61,3 \pm 5,7$ , greft + VEGF grubu  $88,6 \pm 2,2$  olarak hesaplandı. Greft + VEGF grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda aralarında anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Tedavi (prefabrikasyon ve greft + VEGF) gruplarının karşılaştırılması sonucu aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı belirlendi ( $p=0,1$ ). Sonuç olarak VEGF + yağ grefti ve VEGF prefabrikasyonu sonrası yağ grefti uygulanan gruplar kontrol ve boş mikrokürecik grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

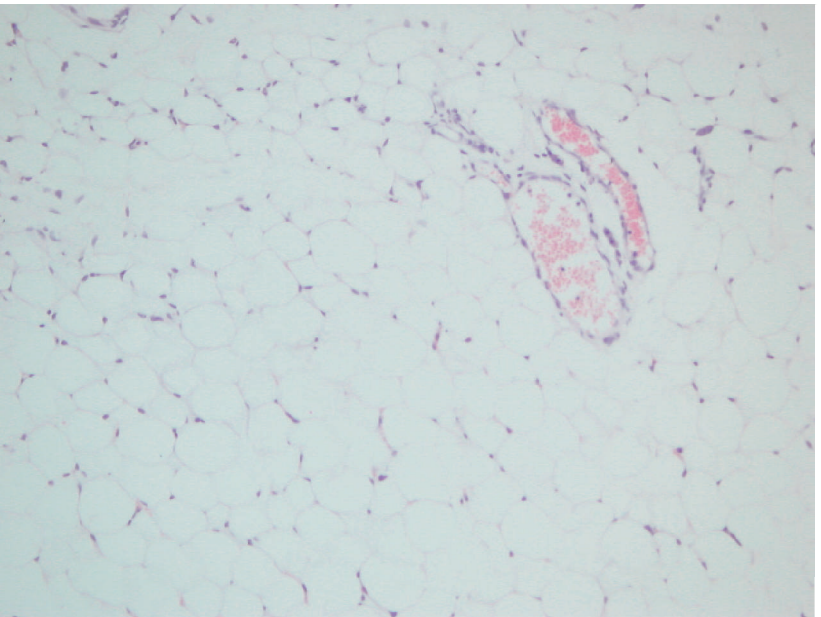
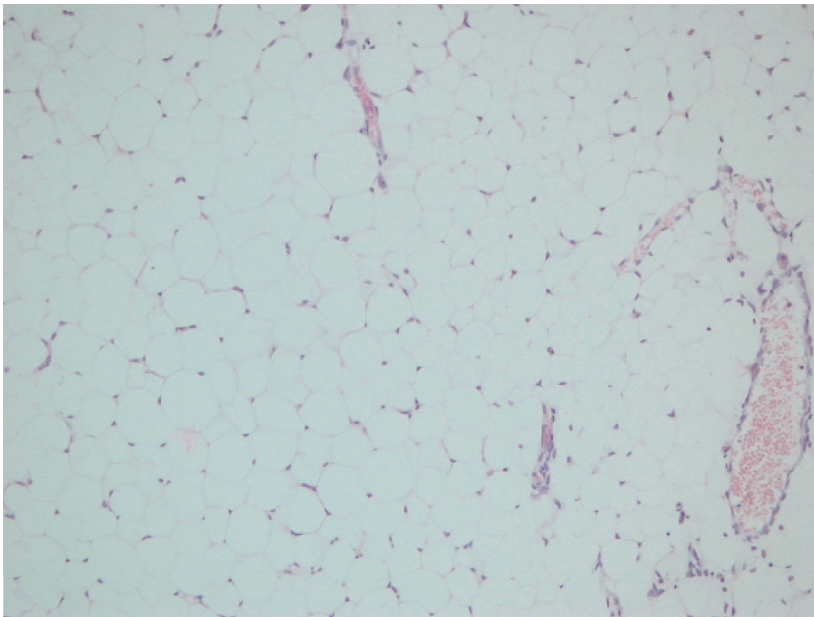




Resim X-XI: Kontrol grubu, yağ nekrozu, artmış mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrozis

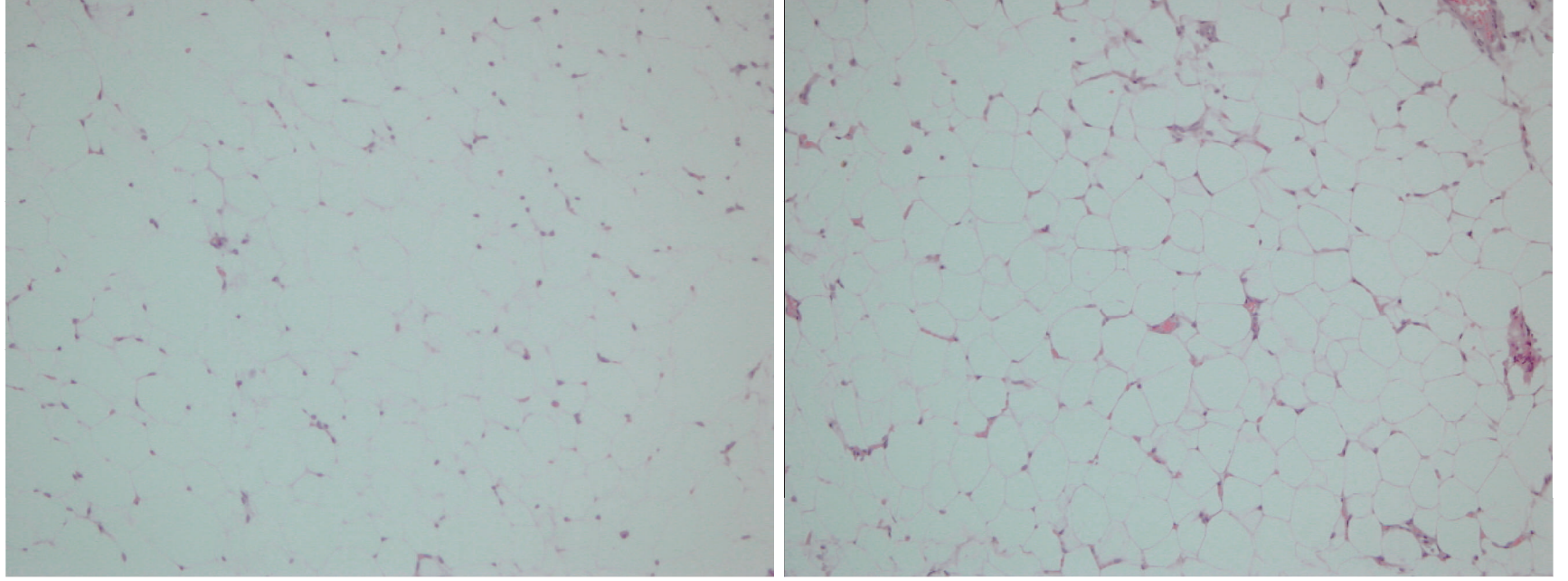


Resim XII-XIII: Boş mikrokürecik grubu, yoğun fibrozis ve mononükleer hücre infiltrasyonu

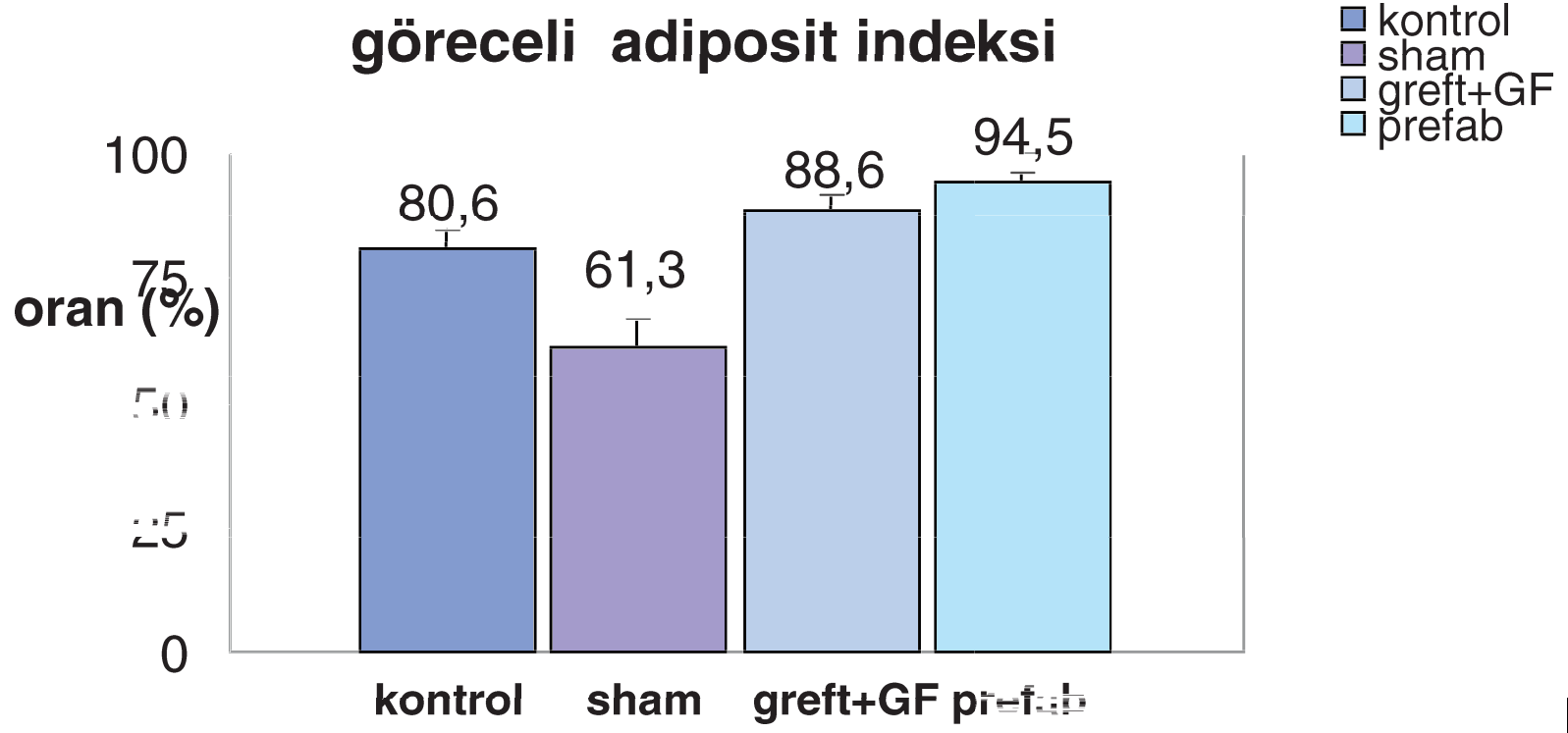


Resim XIV-XV: Prefabrikasyon grubu, normal yağ dokusu ve damarlanma artışı





Resim XVI-XVII: Graft + VEGF grubu, normal yağ dokusu



Tablo III: Tüm gruplarda greft göreceli adiposit indeksi oranları

|                                                | Grup I  | Grup II | Grup III | Grup IV |
|------------------------------------------------|---------|---------|----------|---------|
| <b>Graft Yaşayabilirlik Oranı</b>              | % 125,3 | % 141,6 | % 107    | % 44    |
| <b>Graft Adiposit Oranı/Graft Toplam Oranı</b> | % 94,5  | % 88,6  | % 61,3   | % 80,6  |

Tablo IV: Grupların ortalama greft yaşayabilirlik ve göreceli adiposit indeksi oranları

## TARTIŞMA:

Gelişimsel, anatomik ve fonksiyonel özellikler olarak yağ dokusu, metabolik aktif olan, geniş ve diffüz bağımsız bir dokudur.

Otolog yağ grefti, birçok özelliğinden dolayı ideal dolgu maddesi olarak kabul edilir. Son yıllarda yağ greftinin estetik ve rekonstrüktif cerrahinin birincil ve yardımcı uygulamalarında kullanımı artmıştır<sup>39</sup>.

Otolog yağ dokusu dışında, dolgu maddesi olarak kullanılan materyaller mevcuttur. Bunlar içinde daha sık olarak kollajen ve teflon, yumuşak doku dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Enjekte edilen kollajenin erken emilimi ve teflonun yabancı cisim granülatöz reaksiyonuna yol açması<sup>23</sup>, bu sentetik greft materyallerinin kullanım alanlarını kısıtlamaktadır.

Plastik cerrahi dışında, başka cerrahi uygulamalarda da yağ grefti kullanılmaktadır. *Shafik*<sup>88</sup>, 14 sfinkterik inkontinans hastasına, perianal submukozal yağ enjeksiyonu uygulamıştır. 18 aylık takip süresi sonucunda, 14 hastanın üçünde yeterli miktarda hacim artışı, yedisinde bir defa daha yağ enjeksiyonu ile yeterli hacim artışı, dördünde ise iki enjeksiyon sonrası yeterli hacim artışı sağladığını bildirmiştir. *Weber*<sup>17</sup>, frontal sinüs obliterasyonu tedavisinde yağ enjeksiyonu kullandığı olgularının sekiz tanesinin beşinde, altı -24 aylık takip süreleri sonucunda, yağ yaşayabilirliğinin yeterli miktarda olmadığını bildirmiştir. *Mikus ve ark.*<sup>5</sup> köpek vokal kordlarına yaptıkları enjeksiyon sonrasında, kord haciminin 12 haftada % 20 arttığını bildirmişlerdir. *Chairman*<sup>89</sup>, yağ aktarımını ayak sırtında kullanmıştır. Altı aylık takip sonucunda 50 hastanın 48' inde plantar yağ yastığında artış saptamıştır, yağ enjeksiyonu tekrarı sadece bir hastada gerekmiştir. *Gubner ve ark*<sup>90</sup>, kalp pili ile üzerindeki cilt arasındaki yetersiz ciltaltı yağ dokusuna bağlı gelişen nöraljiyi tedavi etmek amacıyla ciltaltına yağ grefti enjeksiyonu uygulamışlardır.

Yağ greftinin olumlu özelliklerinin yanında, aktarım sonrası oluşan, önceden belirlenemiyen oranda nekroz ve kist oluşumu gibi istenmiyen komplikasyonları vardır<sup>2,3,53-55</sup>. Ayrıca uzun dönem takiplerde önceden belirlenemeyen, % 20 - 50 arasında hacim kaybı görülmektedir<sup>2,3,5,23</sup>.

Yağ greftinin yaşayabilirliği ve dayanıklılığı hala tartışma konusudur.



Yağ grefti uygulamaları ile ilgili aşağıdaki sorular açıklığa kavuşturulmalıdır:

- ÷ Anestezinin rolü
- ÷ Toplama sonrası yağ hücrelerinin gördüğü hasar- yaşayan hücre
- ÷ Yağ greftini alırken ve enjekte ederken kullanılan kanülün veya iğnenin rolü
- ÷ Nakledilen yağdaki kanın rolü
- ÷ Ayırıştırma sırasındaki travma
- ÷ Hava ile temas
- ÷ Greftin kontaminasyonu
- ÷ Enjekte edilen greftin histolojik sonuçları
- ÷ Düzeltmenin dayanıklılığı
- ÷ Doldurma etkisinin devamlılığı ve yağ grefti yaşayabilirliği arasındaki ilişki

Farklı yazarlar, farklı teknikler kullandığından (yağ grefti alma, reenjeksiyon ve sonuçları değerlendirme ) çalışmaların karşılaştırılması zordur<sup>18</sup>.

### **Yağ Greft Yaşamını Etkileyen Faktörler**

#### **I) Verici Alan Anestezisi**

Her ne kadar pek çok yazar lokal anestezinin olumsuz etkilerinden sözetsse de <sup>12,23-28</sup> literatürde lokal anestezi uygulanmış ve uygulanmamış durumlarda, alınan yağ hücrelerinin yaşayabilirlikleri için benzer oranlar verilmiştir<sup>18</sup>. Lokal epinefrin uygulamasının kan akımını azaltarak greft yaşayabilirliği üzerine olumsuz etkileri olacağı savunulsa bile hiçbir klinik çalışmanın sonucu bunu desteklememektedir. Aksine, greft almadan önce vazokonstriksiyon, azalmış kanama nedeniyle doku yaşayabilirliğini korumaya katkıda bulunacaktır. Lokal epinefrin uygulamasına bağlı doku nekrozu basit eksizyonların hiçbirinde görülmemektedir ve tümesan tekniği uygulanan hastalarda cerrahi sonrasında adiposit ölümü gözlenmemiştir. *Moore ve arkadaşları*<sup>29</sup>, lidokainin adipositlerde glikoz transportunu ve lipolizi kuvvetli bir şekilde baskıladığını kültür ortamında göstermiştir. Ancak bu etki, ortamda lidokain bulunduğu sürece görülmektedir. *İnvivo* lidokain maruziyetinin benzer etkisi gösterilememiştir. Bu nedenle metabolik çalışmalar için lokal anestezi altında yağ grefti alınabilmektedir<sup>29</sup>. Son olarak amid grubu lokal anestetiklerin yara iyileşmesine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>30,31</sup>.

## **II) Toplama Sonrası Yağ Hücrelerinin Yaşayabilirliği**

Vakum yada eksizyon ile yağ toplama arasında yağ hücresi hasarı açısından fark yoktur. Bu veri, Glukoz 3 Fosfat Dehidrogenaz enzim tayini ile her iki yöntemle toplanan yağ hücrelerinin canlılığının değerlendirildiği bir çalışmada elde edilmiştir<sup>32</sup>. Bu lipojenik enzimin plazma membranından sızması, yağ hücre hasarının potansiyel bir belirtisi olabilir. *Schuller-Petrovic*<sup>33</sup> buz çözme sonrasında bile Trypan Blue boyama ile sadece birkaç ölü hücre göstermiştir. Pek çok cerrah tarafından kabul gören yağ hücrelerinin aktarım ile canlılığını koruyamadığı ve bu nedenle yağ grefti uygulamalarının yetersiz olduğu görüşü bu yeni bulgular ışığında değişmelidir.

Enjektör veya makine ile aspirasyon yöntemi ile toplanan yağ hücrelerinin canlılığı arasında fark yoktur. Enjektör içerisinde -0.6 atm., makine ile aspirasyonda maksimum -0.95 atm. basınç üretilir. Negatif basınç üretildiğinde kısmi yıkım ve yağ dokusunda parçalanma görülebilir<sup>7</sup>.

## **III) Yağ greftini alırken ve enjekte ederken kullanılan kanülün veya iğnenin rolü**

Yağ alma kanülü veya 14 gauge lik iğne arasında yağ grefti yaşayabilirliği açısından fark bulunamamıştır. Üç mm lik bir kanül ile toplanan izole adipositlerin canlılığını koruduğu glukoz transport testleri ile kanıtlanmıştır ve bu hücreler metabolik çalışmalar için kullanılabilir<sup>34</sup>.

## **IV) Nakledilen Yağdaki Kan**

Tüm yazarlar nakledilen yağdaki kanın, yağ yıkımını hızlandığı görüşündedirler. Biz de eksizyon yöntemiyle elde ettiğimiz yağ greftini % 0.09 NaCl ile yıkandıktan sonra alıcı alana yerleştirdik.

## **V) Temizlik İşlemi Sırasındaki Travma**

Yağ hücreleri pek çok cerrahın düşündüğü gibi kırılgan değildir. Her türlü toplama yöntemine dayanabilir. Santrüfuj, aşırı yıkama veya hiç yıkamama arasında fark gösterilmemiştir. İdeal teknik hala tanımlanmamıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, yağ dokusunun künt kanülle çıkarılması ve santrüfuj edilmesi, yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırmış ve normale yakın adipoz hücresel enzim aktivitesini göstermiştir<sup>40-42</sup>. Biz, deneysel modelimizde eksizyon sonrası yağ greftini küçük parçalara ayırmak yöntemiyle travma etkisini en aza indirdiğimize inanmaktayız.

## **VI) Hava ile Temas ve Greftin Kontaminasyonu**

Pek çok yazar kapalı bir tekniği benimsemiştir. Avantajları sterilitenin korunması ve hava ile temasın önlenmesidir. Yağ grefti tamamen kurumaya bırakılmamalıdır, çünkü bu adipositlerin ölümüne yol açar. Ancak, açık teknik, greft içerisindeki lifleri ve büyük parçaları

temizleyerek enjeksiyonu kolay bir greft hazırlama olanağı sunar<sup>35</sup>. Hava ile temas kontaminasyon riski getirmektedir. Her ne kadar henüz yayınlanmış bir veri yoksa da enfeksiyonun oldukça nadir görüldüğü kapalı teknikten daha fazla risk taşımamaktadır<sup>36</sup>. Biz deneysel modelimizde açık modeli kullandık ve hiçbir denekte enfeksiyon bulgusuna rastlamadık.

### **VII) Adipositlerin Dondurulması**

Alındıktan hemen sonra dokunun -20°C de yavaş dondurulması adipositler üzerinde zararlı etkiler göstermez<sup>33</sup>. Çalışmalar buzun çözülmesinden sonra bile yüksek sayıda canlı hücre varlığını göstermektedir. Altı aya kadar saklama önerilmektedir<sup>36</sup>. Yavaş dondurma canlı adipositler elde etmek açısından önerilirken, hızlı dondurma adipositlerin yok olmasına yol açmaktadır<sup>37</sup>.

### **VIII) Yağ Enjeksiyonu**

Genelde 14-25 gaugelik iğneler kullanılmaktadır. *Coleman*, yüzde, 17 gaugelik iğneyi tercih etmektedir, gözkapağında ise daha ince iğne kullanılmaktadır. İğne çapı ile etkinin süresi arasında bir ilişki yoktur<sup>39</sup>.

### **IX) Doldurma etkisinin devamlılığı**

Amaçlanan düzeltmenin devamlılığı tekniklerin geliştirilme çabalarına rağmen halen tahmin edilememektedir. En uzun süren etki skleroderma (Hemiatrofi), cerrahi veya travma sonrası atrofi ve deprese skarlarda beklenmektedir. Yaşlılık değişiklikleri için erken sonuçlar mükemmel olsa da yüksek oranda hacim kayıpları ikincil girişim gerektirmektedir. Otolog yağ transplantasyonunun 8 yıl ve daha fazla yaşadığı belgelenmiş olgular mevcuttur<sup>33</sup>.

### **Enjekte Edilen Greftin Histolojik Sonuçları**

*Schuller-Petrovic*<sup>33</sup> enjeksiyondan iki hafta sonrasında, bazıları kollaps olmuş, yaşayan yağ hücreleri bulmuşlardır. *Carpaneda*<sup>38</sup>, abdominoplasti öncesi hastaların abdominal subkutan yağ içine adipoz doku otogreftlerinde kollajen değişimlerini çalışmıştır. Abdominoplasti öncesi 5-8-12-15-21-30-60. günlerde greftler incelenmiştir. Tip I kollajenin grefti kapsül içine sarmasına ilaveten, Tip I ve Tip III kollajenin transplante doku içinde sentez, degradasyon ve yeniden yapılanmasında birçok değişimler bulmuştur. Zamanla inflamatuvar cevapta artma ve azalmanın yanı sıra, inflamatuvar olayın yerleşimi açısından periferdeki canlı bölgeden santraldeki canlı olmayan küçük psödokistler ve çekirdeksiz adipositlerin varolduğu bölgeye kayma gösterilmiştir.

*Coleman*<sup>37</sup>, mekanik olarak bütünlüğü bozulmuş adipositleri transplante etmiş ve birinci hafta sonunda enjeksiyon bölgesinde yuvarlak vakuoller bulmuştur. Açık bir şekilde hiç sağlam adiposit izlenmemiştir. Birinci ayda damarlar arası boşluklar genişlemiş ve seyrek

lenfositik infiltrat, retiküler dermis ve subkutan yağ arasında gelişen yeni bir bağdoku bölgesi gelişmiştir.

Yağ grefti yaşamındaki belirsizlik ve memnuniyetsizlik, greftin aktarım işlemi sırasında adipositlerin bütünlüğünü korumaya yönelik yeni manevraların araştırılmasına yöneltmiştir<sup>6</sup>. Bu manevralar, yağ hücresi konsantrasyon tekniklerini, grefte insülin, steroid ve E vitamini gibi farmakolojik ajanların eklenmesini içermektedir<sup>8,9</sup>. İnsülinin adipojenik etkisi, insülin enjekte edilen hayvanlarda enjeksiyon yerinde yağ hipertrofisine ait bulguların bulunması, yağ asidi sentezini kısıtlayan Asetil CoA karboksilaz enzimini insülinin stimüle edici etkisi ile ilgili kanıtları içeren tarihsel gözlemler sonucu greftin insülin içinde ıslatılması, çok iyi bir teorik görüş noktasını oluşturmaktadır<sup>19</sup>. Grefte yönelik bu manipülasyonların klinik bir yararının gösterilmesi başılamadığı için dikkatler aktarım işlemi sırasında adiposit hücresinin biyolojik özelliği üzerine yönelmiştir. *Yüksel ve ark.*<sup>22</sup> poli (laktik-ko-glikolik-asit)-polietilen glolikol (PLGA/PEG) mikrokürecik salınım sistemi kullanarak, yağ grefti yaşayabilirliği üzerinde insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve bazik fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) uzun dönem etkisini incelemişler. Kontrol ve boş mikrokürecik grubuna göre tüm büyüme faktörü içeren grupların haciminin anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir. IGF-1 ve insülin, doğrudan preadipositin adiposite farklılaşmasını uyarmasından dolayı, bFGF ise doğrudan mezenşimal kökenli hücreler üzerinde mitojen etkisi, dolaylı olarak anjiogenezi uyarmasından dolayı kullanmışlardır. Yağ greftindeki ağırlık artışının, kullanılan büyüme faktörlerinin uyarısıyla yağ grefti içinde bulunan preadipositlerin adipositlere farklılaşmasıyla olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda greftin modifikasyonu fikrinden yola çıkarak, erken dönemde yağ greftinin damarlanmasını hızlandırmak amacıyla, yağ greftini VEGF içeren kalsiyum aljinat mikrokürecikler ile eş zamanlı verdik. Sonuç olarak bu grupta greft yaşayabilirliği ve göreceli adiposit indeksini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulduk.

### **Alıcı Bölgenin Kanlanması**

Yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırmak ve emilimini azaltmak için birçok değişik teknik denenmiştir<sup>43-47</sup>. Yağ dokusunun iskemiye olan düşük toleransı çalışmalarla gösterilmiştir<sup>48,49</sup>. Adipoz dokunun iskemiye toleransını arttırmak yoluyla yaşayabilirliğini arttırmak için, yağ greftini iyi damarlanması olan bir alana yerleştirmenin olumlu sonuçlandığı gösterilmiştir<sup>12,48-50</sup>. *Guerrerosantos ve ark.*<sup>12</sup> uzun dönem takipte yaşayabilirliğini arttırmak için, yağ greftini kas içine enjekte etmişlerdir. Bu çalışmasının sonucunda, diğer deneysel çalışmalara göre yağ greftinin yaşayabilirlik oranı açık bir şekilde artmıştır. Bu çalışmaya benzer klinik bir çalışmada, gluteal bölgeye uygulanan yağ greftinin



yaşayabilirlik oranında anlamlı artış bulunmuştur<sup>51</sup>. *Karacaoğlu ve ark.* cilt altı, kas üstü ve kas altı olmak üzere üç değişik bölgeye uyguladıkları yağ greftlerinde, yaşayabilirliği en yüksek grubun kas üstü grubu olduğu belirtmişlerdir<sup>52</sup>.

*Heimburg*<sup>49</sup> yağ greftlerinin aktarılmadan önce ekspanse edilmesinin greftin yaşama şansını arttırdığını ortaya koymuştur. Ekspansiyonun damarlanmayı ve adipozitin iskemiye direncini arttırdığını ve erken yeniden damarlanmanın önemini savunmuştur.

*Eppley ve ark.*<sup>70</sup> flep olarak aktarılan yağ dokusunda hacimin korunduğunu bildirmişlerdir, ancak insanda kontur deformitelerini düzeltebilecek küçüklükte güvenilir bir damar pedikülü olan ve serbest damarlı flep olarak aktarılabilecek bir yağ dokusu yoktur.

Yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırmak için kas dokusu gibi kanlanması fazla olan bir alana yağ enjeksiyonu yapılması dışında, alıcı alanın damarlanmasını arttırmanın sonuçları da araştırılmıştır. *Baran ve ark.*<sup>10</sup> yağ grefti alıcı alana önceden yerleştirdikleri silikon blok ile oluşturdukları kapsül içine yağ grefti yerleştirerek, damarlanması artmış alanda greft yaşayabilirliğinin arttığını göstermişlerdir.

Biz de bu çalışmamızda yeni damar oluşumunda en önemli kofaktör olduğu bilinen VEGF' yi yavaş salınımını sağlamak için kalsiyum aljinat mikrokürecikler içinde greft alıcı alanına 21 gün önceden enjekte ederek alıcı alanın damarlanmasını arttırdık. Damarlanması arttırılmış ciltaltına yerleştirilen yağ greftlerinin yaşayabilirliklerini ve göreceli adiposit indeksini kontrol grubuna göre anlamlı olduğunu bulduk.

### **Yağ Greftinin Aktarım Sonrası Akibeti**

Serbest yağ grefti aktarımı sonrası, greftin hacim kaybı ile ilgili birçok değişik mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, bazı adipositlerin travmatik rüptür ve/veya avasküler nekroza maruz kalmasıdır. İkinci mekanizma, inflamasyona bağlı hücrel ölüm veya hücre dışı lipid açığa çıkmasına bağlı greftte oluşan fibrozis ve kontraksiyondur<sup>93,94</sup>. Serbest yağ grefti aktarımı sonrası hacim kaybı ile ilgili üçüncü olası mekanizma, nekrotik olmayan hacim kaybına bağlı gelişen adiposit delipidasyon veya dediferansiasyonudur. Bu hipotez, deneysel çalışmalarla kesinleşmiş olan “adipoz atrofisi” teorisine benzerdir<sup>49,94-96</sup>.

Yağ grefti aktarım sırasında damarlanması kaybolur ve kısmi travmaya uğrar. Yağ grefti aktarımından bir gün sonra alıcı alana makrofaj, histiyosit ve multinükleer dev hücrelerin göçünü takiben nötrofil infiltrasyonu olur ve hücrel artıklar temizlenir<sup>57</sup>. Yağ greftlerinde aktarımdan 2-4 gün sonra yeniden damarlanmanın başladığı gözlenmiştir<sup>3,47,54,56</sup>. Fakat bu yeniden damarlanma periferdeki hücrelerle sınırlı olarak gelişir<sup>58</sup>. Yeni damarsal ağ yeterli düzeye gelene kadar yağ hücrelerinin ölümü devam eder. İlerleyen dönemlerde fibröz doku artışı, kaybedilen hacmi tamamlayamaz.

Yağ grefti hücrelerinin uygun doku perfüzyonunu sağlamak için, bu hücrelerin oksijen ve besin ihtiyaçlarının yeterli miktarda karşılanması gereklidir<sup>12,54</sup>. Otolog yağ greftindeki adipositlerin yaşayabilirliği, erken yeniden damarlanmanın oluşmasına bağlıdır. Greft aktarımı sonrası yağ greftinde, yeni damar oluşumunun sınırlı olduğu bilinmektedir<sup>54</sup>. *Nishimura ve ark.*<sup>3</sup> yeni mikrodamar oluşumunda en önemli kofaktör olan VEGF nin, aktarım sonrası yedinci günde belirgin şekilde arttığını ve sonraki 30 günde sabit kaldığını göstermişlerdir. *Langer ve ark.*<sup>54</sup> in-situ yağ dokusunda, fonksiyonel damar yoğunluğunun, aktarım sonrası 12. gün anlamlı yüksekliğe ulaştığını ve 21. gün en yüksek seviyeye ulaştığını bulmuşlardır. Güncel çalışmalarda, fonksiyonel damar yoğunluğunun 15. gün ölçülebilir yüksekliğe ulaştığı, fonksiyonel damar yoğunluğunun artışının 60. güne kadar devam ettiği, 90-120. günlerde % 50 azaldığı belirtilmektedir.

Güncel çalışmalar sonucu oluşan genel kanı, serbest yağ greftinin yaşayabilirliğinin alıcı alandaki yeniden damarlanmanın miktarına bağlı olduğudur. *Nishimura ve ark.*<sup>3</sup>, çalışmalarında yağ grefti aktarımı sonrası yedinci gün hücreler arası alandaki mononükleer hücrelerden salınan VEGF' nin yedinci gün anlamlı düzeye geldiğini göstermişlerdir. Yağ grefti aktarım sonrası ilk dört gün beslenmesini hücreler arası akımdan sağlar. Bu zaman sürecinde, elde edilen oksijen ve besin miktarı yağ grefti yaşayabilirliği için yeterli değildir. Oksijen yetersizliği sonucunda oluşan hipoksi, anjiogenik faktörlerin salınımını artırır. Apoptozis, genetik sinyal sonucu oluşan programlı hücre ölümüdür<sup>62</sup>. *Nishimura ve ark.* yeniden damarlanma oluşuktan sonra yağ hücre sayısının azaldığını tespit etmişlerdir. Erken dönemdeki yağ grefti hacim kaybını akut nekroz, geç dönemde oluşan hacim kaybını ise apoptozise bağlı yağ hücre azalmasına bağlamışlardır. Bu durum, yeniden damarlanma oluşuktan sonra bile devam eden yağ grefti hacim azalmasını açıklar.

## VEGF

Geçmişteki yeni damar oluşumun embriyonik süreçte sınırlı kaldığı düşüncesinin aksine kemik iliği veya periferik dolaşımdaki kök hücre, endotelial hücre öncüllerinin iskemik dokularda yeni damar oluşumu yaptığı, bir çok çalışma ile gösterilmiştir<sup>63-64</sup>.

Günümüzde yeni damar oluşumu ile ilgili iki teori vardır. Birincisi anjiogenezis, ikincisi ise vaskülogenezisdir<sup>68</sup>. Anjiogenezis var olan kapiller ağın uzantısı olarak yeni mikrodamarların oluşumudur. Vaskülogenezis ise endotelial öncü hücreler tarafından yeni damar oluşumudur. *Shigeru*<sup>69</sup> kemik iliği kaynaklı öncül hücre enjeksiyonu sonrası flep yaşayabilirliğinde artış saptamış, immunohistokimyasal yöntemle damar kesitlerinde enjekte ettiği öncü hücrelerin damar endotelial hücrelerine dönüştüğünü göstermiştir.

## Özellikleri

İskemik dokulara kan akımının düzenlenmesinde aktif rolü olan anjiogenezis ve kollateral damar oluşumu, çeşitli vazoaktif ajanlara bağlıdır. Birçok çalışmada dışardan anjiogenik büyüme faktörleri verilmesinin, endotelyal hücre proliferasyonu ve migrasyonunun uyarımı ile yeni damar oluşumu ve kollaterallerin artışına neden olduğu gösterilmiştir<sup>71,84-87</sup>.

Anjiogenezis, birçok aktive eden veya inhibe eden büyüme faktörleri ile düzenlenir. Bu büyüme faktörleri içinde en önemlisi ve en çok çalışılanı VEGF dir<sup>83</sup>. VEGF, endotelyal hücrelerde mitojenik etkisi olduğu bilinen tek sitokindir ve hem fizyolojik hem de patolojik anjiogenezisin önemli bir başlatıcısıdır. VEGF<sup>59-61</sup> tümör hücreleri, makrofaj, keratinosit ve düz kas hücreleri gibi özel hücrelerden de salgınır. VEGF ekspresyonu, embriyolojik gelişim, yara iyileşmesi, kadın üreme döngüsü ve aynı zamanda tümör gelişimi ile ilişkilidir.

Birçok büyüme faktöründe olduğu gibi, göreceli olarak kısa biyolojik yarı ömründen dolayı VEGF nin hızlı yıkımı nedeniyle dışardan verilmesi sınırlıdır<sup>97</sup>. Sistemik uygulama ile verildiğinde, hedef organda etkin ve etkili miktara ulaşamamaktadır. Yüksek dozlarda sistemik uygulandığında ise tekrarlayan hipotansiyon atakları gibi istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır<sup>98</sup>.

## Kullanım Alanları

VEGF, anjiogenezisi uyarıcı etkisinden dolayı Plastik Cerrahide özellikle flep cerrahisi başta olmak üzere pekçok deneysel çalışmada araştırılmıştır. Ayrıca patolojik anjiogenezisteki rolünden dolayı onkolojik araştırmalarda ve moleküler biyolojik araştırmalarda sıklıkla çalışılmıştır.

*In-vitro* modellerde iskemik deri fleplerinin yaşayabilirliği ile yeni endotelyal hücre oluşumunun direkt ilişkili olduğu ve bu süreçte VEGF'nin birincil aracı olduğu tespit edilmiştir<sup>65</sup>. Geçmişte endotelyal öncü hücrelerin intravenöz infüzyonu ile iskemik dokularda yeni damar oluşumu sağlanmıştır<sup>66</sup>, ancak lokal enjeksiyonun intravenöz infüzyona göre bazı avantajları vardır. Hedef dokudaki endotelyal öncü hücrelerin lokal yoğunluğu artırılabilir, hücrelerin sistemik yan etkilerinden (anjiogenik hastalıklardan diabetes mellitus, romatoid artrit hatta kanser gibi hastalıkların ortaya çıkmasını kolaylaştırıcı etkilerinden) korunur. Biz de çalışmamızda lokal enjeksiyon yöntemini kullandık. Bunun yanısıra *Rehman ve ark.*<sup>67</sup> yaptıkları bir çalışmada insan ciltaltı yağ dokusundan izole ettikleri stromal hücrelerin VEGF , Hepatosit Büyüme Faktörü , ve Değiştirici Büyüme Faktörü - $\beta$  sentezlediğini ve VEGF sentezinin iskemik koşullarda 5 kat arttığını göstermişlerdir.

VEGF nin doku genişletme ve flep iskemi alanlarındaki olumlu etkisi son zamanlardaki çalışmalarla gösterilmiştir<sup>71,72,108</sup>. *Lantieri ve ark.*<sup>72</sup>, doku genişletme



alanlarından alınan insan deri örneklerinde artmış VEGF seviyeleri tespit etmişlerdir. Ekspanse olmayan deri ile karşılaştırıldığında, ekspanse deride VEGF salgılayan hücre sayısının yaklaşık beş kat fazla olduğunu bulmuşlardır. Ekspanse dokularda VEGF artışının sebebinin, damarlanma ihtiyacını karşılamaya yönelik olduğunu düşünmüşlerdir.

*Takeshita ve ark.*<sup>71</sup>, tavşanlarda yaptıkları çalışmalarında, VEGF nin iskemik arka bacak modelinde hem intramuskuler hem de intravenöz enjeksiyonunda, iskemik ekstremiteye olan kan akımını arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada VEGF nin intramuskuler olarak verildiği hayvanlarda, femoral arter ligasyonundan sonra, kontrollere göre bacak sistolik basıncı ve kapiller dansitesi daha yüksek ve daha dramatik bir klinik iyileşme göstermiştir. Benzer sonuçlar, intraarteriyal uygulamadan sonra da görülmüştür.

### **Kullanım Şekli ve Doz**

Klinikte cilt flebi yaşayabilirliğini arttırmak için cerrahi geciktirme gibi ek cerrahi protokoller kullanılmaktadır. *Hisham ve ark.*<sup>108</sup> sıçanlarda TRAM flebinde cerrahi geciktirme ile kas içine VEGF enjeksiyonu yaptıkları grupların karşılaştırmasında, geciktirme yaptıkları grupta % 83 yaşayabilirlik saptarken, VEGF enjeksiyonu yaptıkları grupta ortalama % 96,6 yaşayabilirlik saptamışlardır. Her iki grubun sonucu kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. VEGF'nin, topikal<sup>91</sup> veya intravenöz<sup>80</sup> uygulandığı takdirde de cilt flepleri dahil olmak üzere iskemik dokulardaki yeniden damarlanmayı arttırdığı gösterilmiştir.

VEGF nin doku iskemisinde tedavi etkinliği de incelenmiştir. Sıçanlarda abdominal iskemi oluşturulup, 5 µg VEGF'nin femoral damar içine uygulaması ile deney grubunda flep yaşamının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir<sup>73</sup>.

*Feng ve ark.*<sup>75</sup> sıçanlarda venöz flepte VEGF ekspresyonu ve venöz fleplerin yaşayabilirliğinde dışarıdan VEGF verilmesinin etkilerini çalışmışlardır. Flep elevasyonunun 0-6-12-24 ve 48. saatlerinde flepten biyopsi alınmış ve VEGF gen ekspresyonu ölçülmüş, ikinci aşamada 10 sıçana flep yerleştirilmesinden önce subdermal olarak 1 µg/ml VEGF verilmiş. Kontrol grubuna ise serum enjeksiyonu yapılmış. Cilt yaşayabilirliği postoperatif yedinci günde ölçülmüş. 24 ve 48 saat sonra yapılan ölçümlerde VEGF ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Ekzojen VEGF verilen grubun flep yaşayabilirliği kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada sadece bir doz enjeksiyon kullanılması ve VEGF nin yarı ömrünün kısa olmasına rağmen bu sonuçların alınması, VEGF nin anjiogenezi başlatılmasında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. VEGF nin venöz fleplerin yaşayabilirliğini arttırma mekanizmalarından biri de vazodilatasyon etkisiyle arteriyovenöz sfinkterleri açması olabileceği bildirilmiştir.



*Kryger ve ark.*<sup>79</sup>, sıçanlarda sırttan kaldırılan Mc Farlane kas-deri flebinin yaşayabilirliğine VEGF' nin sistemik, lokal (subdermal ve subfasyal) ve topikal uygulamalarının flep yaşayabilirliğine etkisini incelemişlerdir. VEGF' nin çeşitli yöntemler denenerek cilt flebinde en uygun uygulama yönteminin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada, flep yaşayabilirliğinin, 0-24 ve 48. saat sistemik VEGF uygulanan sıçanlarda % 91, tek doz sistemik VEGF uygulanan sıçanlarda % 88, subdermal VEGF uygulanan sıçanlarda % 88, subfasyal VEGF uygulanan sıçanlarda % 86 olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma VEGF nin birçok uygulama yoluyla etkili olabileceğini göstermiştir.

Başarılı hayvan çalışmalarından sonra insanlarda da gen terapisi ile VEGF uygulamaları yapılmıştır. Ekstremité iskemisi olan hastalarda VEGF kodlayan DNA nın çıplak plasmidi ile perkutanöz anjiyoplasti uygulanmış, dört haftalık tedavi sonrasında diz, tibia ortası ve ayak bileğinde anjiyogenezise ait anlamlı anjiyografik ve histolojik bulgular ortaya çıkmıştır. Bu etkiler, 12. haftada halen devam etmiştir<sup>74</sup>.

Büyüme faktörlerinin kontrollü salınımı için, birçok biyolojik yıkılabilen, kontrollü salınım sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemler ile Endotelial Hücre Büyüme Faktörü, Uterin Anjiogenik Faktör, İnsan Büyüme Faktörü, Kemik Morfogenetik Protein-2, Temel Fibroblast Büyüme Faktörü ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü için kullanılmıştır<sup>22,99-105</sup>.

*Hopkins ve ark.*<sup>92</sup> VEGF nin ozmotik pompa yardımıyla kontrollü salınımının anjiyogenezis ve damarsal akımın anlamlı derecede arttığını belirtmişlerdir.

*Elçin ve ark.*<sup>11</sup> VEGF nin kalsiyum aljinat mikroküreciklerinden *in-vitro* salınım davranışı ve sıçanlarda ciltaltı dokuda kontrollü salınım sisteminin lokalize neovaskülarizasyon üzerine etkisini incelemişlerdir. VEGF' yi, kısa yarı ömrü ve sistemik olarak kullanıldığında istenmeyen yan etkileri bulunduğundan, lokal ve yavaş salınımını sağlamak için kalsiyum aljinat mikrokürecikler içinde çözündürerek kullanmışlardır. Kalsiyum aljinat mikrokürecikler içinde ortalama 2-4 µg/ml VEGF içerecek şekilde hazırlamışlardır. İn-vitro olarak VEGF nin kalsiyum aljinat mikroküreciklerden salınım davranışı incelendiğinde, 21 günlük araştırmanın sonucunda kalsiyum aljinat mikroküreciklerden VEGF salınımının erken dönemde diğer tekniklerle (Kalsiyum aljinat, albumin- chitosan, poly laktik asid, kaprolakton ) kıyaslandığında daha yavaş olduğu saptanmıştır<sup>99,101,103,106</sup>. Üç-21 gün arasında düzenli ve sabit doku düzeyleri izlenmiştir. Erken dönemlerdeki düşük düzeyler uygulanan prosedürlere (yıkama basamakları gibi), kullanılan polimere (Sodyum aljinatın moleküler ağırlığı ve mannuronat/guluronat oranına) bağlı olarak açıklanabilir. Diğer yöntemlerde görülen erken dönem patlayıcı salınım, absorbe olan

proteinin salınması ile açıklanmaktadır. VEGF 'nin salınımı ( % 80 den fazla) aljinat ağdan zamana bağlı difüzyon şeklinde olmaktadır.

*In vitro* ortamda kalsiyum aljinat mikroküreciklerden VEGF salınımı üç hafta süreyle takip edilmiştir. Deneye 21. günde son verilmesinin nedeni VEGF konsantrasyonunun 15 ng/ 10 ml'nin altına düşmesi olmuştur (Ölçüm tekniğinin hassaslık sınırlarının altına inmesi nedeniyle). İkinci olarak da üç hafta içinde faktör etkinliğini kaybederek, çalışmaya devamı anlamsız hale getirmiştir. *In vivo* çalışmalarda üç hafta yüksek anjiyogenez elde edebilmek için yeterli VEGF içermektedir. *In vivo* çalışma sırasında, küreciklerin yerleştirildiği bölge ve çevresinden hiçbir inflamatuvar, allerjik reaksiyon gelişmemiştir. Bu da aljinatın biyouyumlu olduğunu kanıtlamaktadır. Bu çalışmada bir diğer gözlem ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VEGF içeren mikrokürecik grubunda yara iyileşmesi daha hızlı gerçekleşmiştir.

VEGF mikroküreciklere verilen anjiogenetik cevap, histolojik, histopatolojik ve immünboyama ile olarak kanıtlanmıştır. Küreciklerle ciltaltı doku arayüzündeki yüksek yoğunluktaki immün boyanma VEGF'salınımının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Birinci ve ikinci hafta örneklerinde immün boyanmada gözlenen belirgin artış *in vivo* salınımın *in-vitro*dan daha uzun sürdüğünü göstermektedir.

Biz bu çalışmamızda *Elçin'in*<sup>11</sup> tanımladığı avantajlarından dolayı, VEGF nin kontrollü salınımı amacıyla kalsiyum aljinat mikrokürecik sistemini kullandık. Çalışmamızda VEGF nin damarlanmayı arttırdığını histomorfolojik incelemeler sonucunda subjektif olarak değerlendirdik. Özellikle prefabrikasyon grubunda daha fazla alanlarda olmak üzere, her iki tedavi grubumuzda damarlanmanın arttığı gözlenmiştir. *Elçin ve ark.*<sup>11</sup> larının çalışmasındaki *invitro* sonuçları çalışmamıza referans olarak aldık. Elde ettiğimiz sonuçlar *Elçin'in*<sup>11</sup> çalışması ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Çalışmamızın amacı, literatür bilgileri ışığında yağ greftinin alıcı alan damarlanmasını arttırmak yöntemiyle yağ greftlerinin en istenmiyen etkisi olan hacim azalması ve emilimini engellemektir. Yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırmak için denenmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Güncel çalışmalar sonucu oluşan genel kanı, serbest yağ greftinin yaşayabilirliğinin, alıcı alandaki yeniden damarlanmanın miktarına bağlı olduğudur. *Guerrerosantos ve ark. ları*<sup>12</sup> uzun dönem takipte yaşayabilirliğini arttırmak için, yağ greftini kas içine enjekte etmişlerdir. Bu çalışmalrının sonucunda, diğer deneysel çalışmalara göre yağ greftinin yaşayabilirlik oranı açık bir şekilde artmıştır.

*Baran CN.*<sup>10</sup> otolog yağ greftini kas gibi damarlanması yüksek bir alana transferinin yerine, yağ greftini aktaracağı alana önceden bir silikon blok koyarak, o alanın

damarlanmasını arttırmıştır. Bu bir prefabrikasyon yöntemidir. Biz de çalışmamızda alıcı alanı, 21 gün önceden verdiğimiz bilinen en güçlü anjiogenetik ajan olan VEGF ile prefabrike ettik. VEGF'yi kalsiyum aljinat mikrokürecik salınım sistemi içinde çözerek lokal olarak verdik. Bu yöntemi, VEGF' nin, kısa yarı ömrü ve sistemik olarak kullanıldığında istenmeyen yan etkileri bulunduğundan, lokal ve yavaş salınımını sağlamak amacıyla tercih ettik. Prefabrikasyon sonrası yağ greftleme işlemi yaptığımız grupta greft yaşayabilirlik oranını % 125.3, göreceli adiposit içeriğinin indeksini ise % 94.5 olarak hesapladık. Her iki değerinde kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlıydı.

Aynı zamanda *Eppley'in*<sup>19</sup> ortaya attığı ve pekçok yazar tarafından kabul görmüş “greftlerin modifiye edilmesi” fikrinden yola çıkarak bir grubumuzda yağ grefti ile VEGF yi eşzamanlı olarak verdik. Bu grupta amacımız, aktarım sırasında damarlanması kaybolan yağ greftinin damarlanma sürecini en önemli anjiogenezis uyarıcısı olan VEGF ile kısaltmaktır. VEGF + yağ grefti uygulaması yaptığımız grupta greft yaşayabilirlik oranını %141.6, göreceli adiposit içeriğinin indeksini ise %88.6 olarak hesapladık. Her iki değerinde kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlıydı.

Yağ grefti ve SF içeren boş mikrokürecik uygulaması yaptığımız grupta, greft yaşayabilirlik oranı % 107, göreceli adiposit içeriğinin indeksini ise % 61.3 olarak hesapladık. Greft yaşayabilirlik oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı iken, göreceli adiposit içeriğinin indeksi en az olan grup, bu gruptu. Greft yaşayabilirlik oranının anlamlı olarak yükselmesini, bu grubun histolojik kesitlerinde görülen yoğun fibroze ve *Kawada ve ark.*<sup>107</sup> tarafından aljinat oligosakkaritlerinin VEGF etkinliğini artırdığını gösteren çalışmaya bağlayabiliriz.

## **Sonuç**

Bu çalışmamız, literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak, VEGF içeren kalsiyum aljinat mikroküreciklerinin alıcı alana önceden prefabrikasyonu ile yerleştirilen yağ greftlerinin yaşayabilirlikleri ve göreceli adiposit indeksi artırılmıştır. VEGF prefabrikasyonu yapılmaksızın, yağ greftleri ile eşzamanlı olarak yerleştirilen VEGF içeren kalsiyum aljinat mikroküreciklerinin de uygulanması yağ greftlerinin yaşayabilirlikleri ve göreceli adiposit indeksini arttırmıştır. Bu çalışmanın bir ileriki basamağında, zaten literatürde gösterilmiş olan<sup>11</sup> VEGF'nin damarlanmayı arttırıcı etkisinin yağ greftinde *invitro* olarak da gösterilmesi olabilir.

Bu sonuçlar ışığında, yağ greftlerinin taşınması sonrası erken dönemde damardan yoksun olması ve alıcı alanın damarlanmasının arttırılması, greft emilimi ve hacim kaybını anlamlı düzeyde azaltmaktadır. VEGF, yağ grefti damarlanmasında da etkin bir rol almaktadır.

Çalışmamızın sonuçları göz önüne alındığında literatürde daha önce karşılaşmadığımız, VEGF nin yağ greftinin hacmi ve yaşayabilirliğine olumlu etkisini gösterdik. Klinikte, VEGF' nin patolojik anjiogenezisin de en önemli uyarıcısı olması ve sistemik kullanımda oluşabilecek ciddi komplikasyonları nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Ancak insanlarda da gen terapisi ile VEGF uygulamaları yapılması ve olumlu sonuçlar alınması bu konuda daha fazla sayıda ve daha uzun takip süresi olan çalışmaların gerekliliği ortaya çıkarmıştır.



## Kaynaklar

1. Coleman SR. Structural fat grafts; the ideal filler? Clin Plast Surg 28(1):111-9, 2001
2. Kononas TC, Bucky LP. The fat of suctioned and surgically removed fat after transplantation for soft tissue augmentation: A volumetric and histologic study in the rabbit. Plast Reconstr Surg 91(5):763-8, 1993
3. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa H. Microvasculer angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. Laryngoscope 110(8), 1333 – 8, 2000
4. Fat grafts Reconstructive Plastic Surgery, Converse, 2 nd edition, p:251-261
5. Mikus JL, Kaufman JA, Kilpatrick SE. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. Laryngoscope 105(1):17-22, 1995
6. Carraway JH, Mellow CG. Syringe aspiration and fat concentration: A simple technique for autologous fat injection. Ann. Plast. Surg. 24: 293, 1990.
7. Niechajev I, Sevcuk O. Long-term results of fat transplantation: Clinical and histological studies. Plast Reconstr Surg 94(3): 496-506, 1994.
8. Ellenbogen R. Free autogenous pearl grafts in the face: A preliminary report of a rediscovered technique. Ann Plast Surg 16(3): 179-94, 1986.
9. Bircoll M, Novack BH. Autologous fat transplantation employing liposuction techniques. Ann Plast Surg 18(4): 327-9, 1987.
10. Baran CN, Celebioglu S, Sensoz O, Ulusoy G, Cıvelek B, Ortak T. The behavior of fat grafts in recipient areas with enhanced vascularity. Plast Reconstr Surg 15;109(5):1646-51; 1652, 2002
11. Elcin YM, Dixit V, Gitnick G. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. Aktif Organs 25(7):558-65. 2001
12. Guerrerosantos J, Gonzalez-Mendoza A, Masmela Y, Gonzalez MA, Deos M, Diaz P. Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. Aesthetic Plast Surg 20(5):403-8. 1996
13. Senger DR et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 25;219(4587): 983-5. 1983
14. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. Nat The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 9(6): 669-76. 2003

15. Ratner D. Skin Grafting. From here to there. *Dermatol Clin* 16(1):75-90, 1998
16. Patel PN, Patrick Jr CW. Cytocompatibility of preadipocytes in diacrylated polyethylene glycol cross- linked with various UV light photoinitiating systems. Second joint EMBS/ BMES Conference. Houston (TX): Institute of Electrical and Electronics Engineers p. 757-8. 2002
17. Klein AW, Elson ML. The history of substances for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg* 26(12): 1096-105. 2000
18. Sommer B, Sattler G. Current Concept of Fat Graft Survival: Histology of Aspirated Adipose Tissue and Review of the Literature. *Dermatol Surg* 26(12): 1159-1166. 2000
19. Eppley BL, Sidner RA, Platis JM, Sadove AM. Bioactivation of free-fat transfers: a potential new approach to improving graft survival. *Plast Reconstr Surg* 90(6):1022-30. 1992
20. Eppley BL, Snyders RV Jr, Winkelmann T, Delfino JJ. Autologous facial fat transplantation: Improved graft maintenance by microbead bioactivation. *J Oral Maxillofac Surg* 50(5): 477-82. 1992
21. Eppley BL, Sadove AM. A physicochemical approach to improving free fat survival: Preliminary observations. *Aesthetic Plast Surg* 15(3): 215-8. 1991
22. Yuksel E et al. Increased free fat-graft survival with the long-term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres *Plast Reconstr Surg* 105(5): 1712-20. 2000
23. Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long term result of vocal cord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104(11):871-4. 1995
24. Chajchir A. Fat Injection: long-term follow-Up *Aesthetic Plast Surg* 20(4):291-6. 1996
25. Gormley DE, Eremia S. Quantitative assessment of augmentation therapy. *J Dermatol Surg Oncol* 16(12):1147-51. 1990
26. Carpaneda CA. Study of aspirated adipose tissue. *Aesthetic Plast Surg* 20(5):399-402. 1996
27. Novaes F, dos Reis N, Baroidi R. Counting method of live fat cells used in lipoinjection procedures. *Aesthetic Plast Surg* 22(1):12-5. 1998
28. Horl HW, Feller AM, Biemer E. Technique for liposuction fat reimplantation and long-term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann Plast Surg* 26(3):248-58. 1991

29. Moore JH Jr, Kolaczynski JW, Morales LM, Considine RV, Pietrzkowski Z, Noto PF, Caro JF. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plast Surg* 19(4):335-9. 1995
30. Skidmore RA, Patterson JD, Tomsick RS. Local anesthetics. *Dermatol Surg* 22(6):511-22; quiz 523-4. 1996
31. Eriksson AS, Sinclair R, Cassuto J, Thomsen P. Influence of lidocaine on leukocyte function in the surgical wound. *Anesthesiology* 77(1):74-8. 1992
32. Lalikos JF, Li YQ, Roth TP, Doyle JW, Matory WE, Lawrence WT. Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. *J Surg Res* 70(1):95-100. 1997
33. Schuller-Petrovic S. Improving the aesthetic aspect of soft tissue defects on the face using autologous fat transplantation. *Facial Plast Surg* 13(2):119-24. 1997
34. Bastard JP, Cuevas J, Cohen S, Jardel C, Hainque B. Percutaneous adipose tissue biopsy by mini-liposuction for metabolic studies. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18(5):466-8. 1994
35. Sattler G, Sommer B. Liporecycling: a technique for facial rejuvenation and body contouring. *Dermatol Surg*. 26(12):1140-4. 2000
36. Drake LA, Dinehart SM, Farmer ER, et al. Guidelines of care for soft tissue augmentation: fat transplantation. American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* 34(4):690-4. 1996
37. Coleman WP III, Lawrence N, Sherman RN, Reed RJ, Pinski KS. Autologous collagen? Lipocytic dermal augmentation. A histopathologic study. *J Dermatol Surg Oncol* 19(11):1032-40. 1993
38. Carpaneda CA. Collagen alterations in adipose autografts. *Aesthetic Plast Surg* 18(1):11-5. 1994
39. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 118(3 Suppl):108S-120S. 2006
40. Von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S, et al. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 178(2):87-92. 2004
41. Wolter T, Von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N. Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. *Ann Plast Surg* 55(4):408-13. 2005

42. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: a comprehensive study. *Ann Plast Surg* 54(3):288-92; discussion 292. 2005
43. Toledo SR. Syringe liposculpture: a two-year experience. *Aesthetic Plast Surg* 15(4):321-6. 1991
44. Newman J, Ftaiha Z. The biographical history of fat transplant surgery. *Am J Cosmetic Surg* 4:85. 1987
45. Ellenbogen R. Free autogenous pearl fat grafts in the face: a preliminary report of a rediscovered technique. *Ann Plast Surg* 16(3):179. 1986
46. Illouz YG. The fat cell “graft”: a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg* 78(1):122-3. 1986
47. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, et al. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg* 85(3):378-86. 1990
48. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg* 24(2):347–67. 1997
49. von Heimburg DV, Lemperle G, Dippe B, et al. Free transplantation of fat autografts expanded by tissue expanders in rats. *Br J Plast Surg* 47(7):470–6. 1994
50. Ersek R, Chang P, Salisbury MA. Lipolayering of autologous fat: an improved technique with promising results. *Plast Reconstr Surg*; 101(3):820-6. 1998
51. Peren PA, Gomez JB, Guerrerosantos J, et al. Gluteus augmentation with fat grafting. *Aesthetic Plast Surg* 24(6):412-7. 2000
52. Karacaoglu E, Kizilkaya E, Cermik H, Zienowicz R. The Role of Recipient Sites in Fat-Graft Survival Experimental Study. *Ann Plast Surg* 55(1): 63-8. 2005
53. Har-Shai Y, Lindenbaum E, Ben-Itzhak O, Hirshowitz B. Large liponecrotic pseudocyst formation following cheek augmentation by fat injection. *Aesth Plast Surg* 20(5):417–9. 1996
54. Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K. Revascularization of transplanted adipose tissue:a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg* 48(1):53-9, 2002
55. Mandrekas AD, Zambacos GJ, Kittas C. Cyst formation after fat injection. *Plast Reconstr Surg* 102(5):17089, 1998



56. Moscona R, Shoshani O, Lichtig H, Karnielli E. Viability of adipose tissue injected and treated by different methods: an experimental study in the rat. *Ann Plast Surg* 33(5):500-6. 1994
57. Cleek R, Rege AA, Denner LA, Eskin SG, Mikos AG. Inhibition of smooth muscle cell growth in vitro by antisense oligodeoxynucleotide released from poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microparticles. *J Biomed Mater Res* 15;35(4): 525-30. 1997.
58. Bartynski J, Marion MS, Wang TD. Histopathologic evaluation of adipose autografts in a rabbit ear model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 102(4):314-21. 1990.
59. Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 15;195(2):1005-10. 1993
60. Partovian C, Adnot S, Eddahibi S, et al. Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 275(6 Pt 2):H1948-56. 1998
61. Hang J, Kong L, Gu J, Adair TH. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 269(5 Pt 2):H1827-31. 1995
62. Kojima H, Tanaka Y, Toshihide T, et al. Cell proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124(3):261-4. 1998
63. Shimada K, Kawamoto A, et al. Normal and abnormal aging of cardiovascular system. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 28(3):302-7. 1991
64. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*; 9(6): 702-12. 2003
65. Zacchigna S, Papa G, Antonini A, Novati F, Moimas S, Carrer A, Arsic N, Zentilin L, Visintini V, Pascone M, Giacca M. Improved survival of ischemic cutaneous and musculocutaneous flaps after vascular endothelial growth factor gene transfer using adeno-associated virus vectors. *Am J Pathol* 167(4):981-91. 2005
66. Asahara T, Murohara T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 14;275(5302):964-7. 1997

67. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 16;109(10):1292-8. Epub 2004 Mar 1. 2004
68. Duttaroy S. Transplantation of autologous endothelial cells and endothelial progenitor cells for angiogenesis. *Dan Med Bull* 52(4):259. 2005
69. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone Marrow Cell Implantation Improves Flap Viability After Ischemia-Reperfusion Injury. *An of Plast Surg* 52(4):414-8. 2004
70. Eppley BL, Smith PG, Sadove AM, Delfino JJ. Experimental effects of graft revascularization and consistency on cervicofacial fat transplant survival. *J Oral Maxillofac Surg* 48(1): 54-62. 1990
71. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 93(2): 662-70. 1994
72. Lantieri LA, Martin-Garcia N, Wechsler J, Mitrofanoff M, Raulo Y, Baruch JP. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue: A possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. *Plast Reconstr Surg* 101(2): 392-8. 1998
73. Padubidri A, Browne E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg* 37(6): 604-11. 1996
74. Isner JM., Walsh K, Symes JF, et al. Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther* 20;7(8): 959-88. 1996
75. Zhang F et al. Improvement of Venous Flap Survival by Application of Vascular Endothelial Growth Factor in a Rat Model *Ann Plast Surg* 56(6):670-3. 2006
76. Lu WW, Ip WY, Jing WM, et al. Biomechanical properties of thin skin flap after basic fibroblast growth factor (bFGF) administration. *Br J Plast Surg* 53(3):225-29. 2000
77. Im MJ, Kim YS, Edwards RJ, et al. The effect of bovine basic fibroblast growth factor on skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg* 28(3): 242-5. 1992
78. Zhang F, Oswald T, Lin S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg* 56(7):653-9. 2003

79. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, et al. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg* 53(3):234-9. 2000
80. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, et al. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 46(3):314-9. 2001
81. Zhang F, Richards L, Angel MF, et al. Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg* 55(1):59-63. 2002
82. Pang Y, Lineaweaver WC, Lei MP, et al. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. *Plast Reconstr Surg* 112(2):556-564. 2003
83. Riley CM, Fuegy PW, Firpo MA, Zheng Shu X. Stimulation of in vivo angiogenesis using dual growth factor-loaded crosslinked glycosaminoglycan hydrogels 27(35):5935-43. 2006
84. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*;246(4935):1306-9. 1989
85. Takeshita S, Isshiki T, Sato T. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest* 74(6):1061-5. 1996
86. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92(9):365-71. 1995
87. Yuan F, Yu GR, Chang SM, Lineaweaver WC, Zhang F. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor augmenting collateral circulation in a rat hindlimb replantation model. *J Reconstr Microsurg* 22(2):129-36. 2006
88. Shafik A. Perianal injection of autologous fat for treatment of sphincteric incontinence. *Dis Colon Rectum* 38(6):583-7. 1995
89. Chairman EL. Restoration of the plantar fat pad with autolipotransplantation. *J Foot Ankle Surg* 33(4):373-9. 1994
90. Gubner RE, Sands MP, Gross JR. Lipoinjection as a treatment of pacemaker pocket neuralgia. *Pacing Clin Electrophysiol* 21(3): 624-6. 1998

91. Li QF, Reis ED, Zhang WX et al. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg* 16(1):45-9. 2000
92. Hopkins SP, Bulgrin JP Sims RL, et al. Controlled delivery of vascular endothelial growth factor promotes neovascularization and maintains limb function in a rabbit model of ischemia. *J Vasc Surg* 27(5): 886-94. 1998
93. Tholpady SS. et al. The cellular plasticity of human adipocytes. *Ann Plast Surg* 54(6):651-6. 2005
94. Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 83(2):368-81. 1989
95. Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 31(1):42-9. 1986
96. Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Toda S. Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J Lipid Res* 28(9):1038-45. 1987
97. Langer R, Moses M. Biocompatible controlled release polymers for delivery of polypeptides and growth factors. *J Cell Biochem* 45(4):340-5. 1991
98. Arras M et al. The delivery of angiogenic factors to the heart by microsphere therapy. *Nat Biotechnol* 16(2):159-62. 1998
99. Elcin YM, Dixit V, Gitnick G. Controlled release of endothelial cell growth factor from chitosan-albumin microspheres for localized angiogenesis: in vitro and in vivo studies. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 24(3):257-71. 1996
100. Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 18(18):1201-25. 1997
101. Ko C, Dixit V, Shaw W, Gitnick G. In vitro slow release profile of endothelial cell growth factor immobilized within calcium alginate microbeads. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 23(2): 143-51. 1995
102. Lindenbaum ES, Kaufman T, Beach D, Maroudas NG. Uterine angiogenic factor induces vascularization of collagen sponges in guinea-pigs. *Burns* 15(4):225-9. 1989
103. Goodwin CJ, Braden M, Downes S, Marshall NJ. Release of bioactive human growth hormone from a biodegradable material: poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Mater Res* 40(2):204-13. 1998



104. Kenley R, Marden L, Turek T, Jin L, Ron E, Hollinger JO. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Biomed Mater Res* 28(10):1139-47. 1994
105. Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R, Klagsbrun M. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 12(7):619-26. 1991
106. Peters MC, Icenberg BC, Rowley JA, Mooney DJ. Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 9(12):1267-78. 1998
107. Kawada A, Hiura N, Tajima S, Takahara H. Alginate oligosaccharides stimulate VEGF-mediated growth and migration of human endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 291(10):542-7. 1999
108. Seify H, Bilkay U, Jones G. Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg* 15;112(4):1032-9. 2003
109. Erol OO. Facial autologous soft-tissue contouring by adjunction of tissue cocktail injection (micrograft and minigraft mixture of dermis, fascia, and fat). *Plast Reconstr Surg* 106(6): 1375-87. 2000