



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA ADİPOZ KAYNAKLI KÖK HÜCRE,
ADSC STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON, SVF YAĞ
GREFTİ VE DOKU KOKTEYLİNİN DONDURMA
İŞLEMİ SONRASINDA SAĞKALIMLARININ VE YAĞ
DOKUSUNA KATKILARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sinem ÇİLİNGİR

Antalya, 2021



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA ADİPOZ KAYNAKLI KÖK HÜCRE,
ADSC STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON, SVF YAĞ
GREFTİ VE DOKU KOKTEYLİNİN DONDURMA
İŞLEMİ SONRASINDA SAĞKALIMLARININ VE YAĞ
DOKUSUNA KATKILARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sinem ÇİLİNGİR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlenen ÖZKAN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2021

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2021-5705)

TEŞEKKÜR

Küçükken okuduğum kitaptaki bir karakterle beni çok etkileyen ve o zamandan sonra gelecek hayallerime yerleşen cerrahlığa, kısa bir süre içinde ilk adımlarımı atacağım. Bu hayalimi Akdeniz Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ailesinin önderliğinde gerçekleştiriyor olmaktan dolayı geleceğime dair inanılmaz bir motivasyon, heves ve mutluluk duyuyorum.

Asistanlık hayatımın başladığı günden beri, hocam olarak bilgi ve becerisiyle mesleki anlamda beni eğiten ayrıca güçlü bir kadın cerrahın bana nasıl olacağını göstererek de kişiliğimde rehber aldığım, bugüne kadar kendisinden çok şey öğrendiğim ve hayatımda öğrenmeye devam edeceğim değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. Özlenen Özkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Dünyanın değerli sayılı cerrahlarından biri olan ve öğrencisi olmanın büyük bir lütuf olduğuna inandığım, fikirleri ve yaptığı ameliyatlar sayesinde asistanlık sürecimde çok az meslektaşımın sahip olabileceği tecrübeler edinme şansını sağlayan, daimi ustam, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ömer Özkan'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez sürecimde deneysel ve istatistiksel olarak büyük katkıları ve rehberliği olan sayın Uzm. Dr. Gökhan Ertosun'a ve Uzm. Dr. Mehmet Tapan'a teşekkürlerimi sunarım.

Beraber uzun saatlerimizin geçtiği yorulduğumuz, uykusuz kaldığımız, paniklediğimiz, koştığımız, güldüğümüz, evdeki ailelerimizden çok burada birlikte saatler geçirdiğimiz, Akdeniz Üniversitesi'ni benim için bir ev ve aile kılan, abilerim Dr. Polat Biçici, Dr. Mehmet Can Ubur, Dr. Serkan İlhan, Dr. Onur Oğan, Dr. Adil Cümşüdoğ, Dr. Hasan Tuna Türkmen, Dr. Yalçın Leymunçiceği ve kardeşlerim Dr. Bilgehan Sarı, Dr. Yunus Emre Şeker, Dr. Cihan Zöhre, Dr. Vedat Can İşler, Dr. Ege Bora Özpar, Dr. Furkan Akman ve Dr. Mertcan Karagül sizlerden ayrı ayrı hem kişilik olarak hem mesleki anlamda çok şey öğrendim, hepinize çok teşekkür ederim.

Ayrıca çömezliğimden bu yana, sağlık sisteminde ekip olduğumuzun bilinciyle, destekleriyle ve tecrübeleriyle, beraber çalışmaktan keyif aldığım klinik ve ameliyathane hemşirelerimiz, tüm sekreterlerimiz, personellerimiz, anestezi ekibimiz, sizlere teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, her zaman yanımda olan, hayatım boyunca benden desteklerini ve sevgilerini eksik etmeyen, eğitim ve öğrenim hayatımda hep ellerinden gelenin en iyisini vermeye çalışan sevgili annem ve babam, varlığınız ve tüm emekleriniz için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vii
Çizelgeler Dizini	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yağ (Adipoz) Dokusu	4
2.1.1. Yağ Dokusunun Anatomisi	4
2.1.2. Yağ Dokusu Embriyolojisi	5
2.1.3. Adipogenezis	6
2.1.4. Yağ Dokusunun Histolojisi	8
2.2. Kök Hücreler	10
2.2.1. Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücreler	11
2.2.1.a. Hücre destekli yağ transferi (Cell-Assisted Lipotransfer – CAL)	15
2.3. Yağ Greftleri	15
2.3.1. Yağ Greftinin Temelleri	15
2.3.1.a. Yağ greftinin alındığı bölge	16
2.3.1.b. Yağ greftinin boyutu	17
2.3.1.c. Nakledilen yağ greftinin kanlanması	20
2.3.2. Yağ Grefti ve Kök Hücre	20
2.4. Doku Kokteyli	21
2.5. Kryoprezervasyon (Dondurarak Saklama)	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deney Etik Kurul	26
3.2. İnguinal Yağ Dokusunun Çıkarılması	27
3.3. Stromal Vasküler Fraksiyon Eldesi	28
3.4. Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu	29
3.5. Doku Kokteyli Hazırlanması	31
3.6. Yağ Greftinin Hazırlanması	32

3.7. Dondurarak Saklama (Kryoprezervasyon) Protokolü	33
3.8. Gruplar ve AKKH, SVF, Yağ Grefti, Doku Kokteylinin Verilmesi	33
3.9. Dokuların Çıkarılması	34
3.10. Dokuların Morfolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemesi	34
3.10.a. Boyanma ve Skorelama Kriterleri	36
3.11. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Grupların Görsel ve Morfolojik Değerlendirilmesi	37
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	39
4.2.a. VEGF ile Anjiogenez Değerlendirmesi	39
4.2.b. Ki67 ile Proliferasyon Değerlendirmesi	39
4.3. Grupların 4. ve 8. Hafta Karşılaştırılmaları	41
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	62
7. ÖZET	63
8. ABSTRACT	65
9. KAYNAKLAR	67
10. EKLER	82
Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKKH	Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre
ATP	Adenozin 3'-Trifosfat
BAD	Beyaz Yağ Dokusu
BeiAD	Bej Yağ Dokusu
CAL	Cell Assisted Lipotransfer
CD	Cluster of Differentiation
CEBPa	CCAAT Arttırıcı Bağlayıcı Protein Alfa
CFU	Colony Forming Unit
DAB	Diamino Benzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
FFU	Fibroblast Forming Unit
GVHD	Graft Versus Host Disease
H&E	Hematoksilen Eozin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Streptavidin Peroksidaz
HSP	Heat Shock Protein
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL 10	İnterlökin 10
IL-6	İnterlökin 6

INF-γ	İnterferon-Gama
KAD	Kahverengi Yağ Dokusu
KPA	Kryoprotektif Ajan
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide Testi
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PPAR	Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TNFα	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UCP1	Uncoupling Protein 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide Testi
YKH	Yetişkin Kök Hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Subkutan yağ dokusunun anatomik görünümü ve bölümleri	4
2.2. Adipogenezin temel basamakları	6
2.3. Adiposit tipleri	8
2.4. Adipoz doku ışık mikroskobu altında, H&E boyama ile görünümü	9
2.5. Kök hücrelerin kökeni ve gelişimi	10
2.6. Adipoz doku kaynaklı kök hücre - AKKH (ışık mikroskobu x 100)	12
2.7. SVF ve AKKH ayrımı	13
2.8. Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin, farklı doku hücrelerine differensiyasyonu	14
2.9. Yağ grefti boyutları	17
2.10. Yağ damlacığının çapının, merkezi alandaki doku nekrozu ile ilişkisi	18
2.11. Yağ greftinin çapının, merkezi alandaki oksijen miktarı ve hücre/doku sağ kalımı ile olan ilişkisi	19
2.12. Kryoprezervasyonun hücre üzerindeki etkisi ve basamakları	23
3.1. Çalışmanın genel şeması	26
3.2. Çıkarılan inguinal yağ dokusunun görüntüsü	28
3.3. Steril kabin içerisinde, komponentlerin elde edilmesi için yağ dokusunun hazırlanması	29
3.4. Elde edilen AKKH'nin ışık mikroskobu altında görüntüsü	30
3.5. Doku kokteylinin hazırlanması	32

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6. İnguinal yağ dokusunun üçlü musluktan geçirilerek basınç oluşturulmasıyla parçalanması sonucu yağ grefti elde edilmesi	32
4.1. İnguinal yağ dokusu üzerinde yeni oluşumu izlenen adipoz yapılar	37
4.2. Kontrol grubunda izlenen inguinal yağ dokusu kesiti, H&E x100 ile boyama	44
4.3. Yağ grefti nakledilen grupta inguinal yağ dokusu, H&E x100 ile boyama	44
4.4. Doku kokteyli nakledilen grupta adipositlerin nekrozu sonucu oluşan yağ vakuolleri, ‘crown-like structure’ görünümü, H&E x100 ile boyama	45
4.5. Stromal vasküler fraksiyon nakledilen grupta, nakil alanında yeni adipoz doku, H&E x100 boyama	46
4.6. AKKH ve SVF’nin beraber nakledildiği inguinal yağ dokusunda yeni damar oluşumları ve ödem, H&E x100 ile boyama	47
4.7. SVF nakledilen grupta yeni damar yapıları, H&E x100 ile boyama	47
4.8. Yağ grefti nakledilen grupta, yağ vakuolleri, yoğun inflamasyon, dev hücreler, H&E x100 ile boyama	48
4.9. Yeni damar oluşumları, VEGF x200 ile boyama	48
4.10. Hücrel proliferasyon alanları, Ki67 x400 boyama	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Adipoz doku kaynaklı kök hücrenin ve SVF'nin klinik uygulama alanları	13
4.1. VEGF ve Ki67 immünohistokimyasal boyamaları ile H&E boyamada incelenen ödem, yangı, nekroz ve fibrozis değerlendirmesinin deneklerde ayrıntılı gösterim tablosu	38
4.2. VEGF ve Ki67 boyamasının gruplar arasında ortalamalarının grafiksel gösterimi	40
4.3. VEGF istatistiksel verilerinin değerlendirilmesi	41
4.4. Ki67 istatistiksel verilerin değerlendirilmesi	41
4.5. Grupların 4. ve 8. hafta arasındaki dokularında oluşan farklıların sayısal olarak karşılaştırılması	42
4.6. Deneklerin vücut ağırlıkları, ilk çıkarılan inguinal yağ dokusunun ağırlığı ve kryoprezervasyon işlemi uygulanan komponentin nakli sonrasındaki inguinal yağ dokusunun ağırlıklarını gösteren tablosu	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest yağ dokusunun transplantasyonu, 1893 yılında Neuber ve ark.'nın ilk tanımlamalarından sonra 1920 ve 1930'lu yıllarda zirveye ulaşmıştır (1). 2007 yılında Sidney Coleman'ın serbest otolog yağ transplantasyonu ile meme büyütme sonuçlarını yayınlamasından sonra konuya ilgi daha da artmış olup o zamandan beri, bu yöntem güvenilir teknikler kullanılarak plastik cerrahi alanında gerek rekonstrüksiyon, revitalizasyon ve estetik işlemlerde kullanılmasıyla vazgeçilmez bir işlem haline gelmiştir (2). Fakat buna rağmen aktarılan dokunun kısmi nekrozuyla nakledilen dokudaki hücre sağ kalımının azalması gibi problemler mevcuttur (3-5).

Adipositler lokal iskemiye hassas olmaları nedeniyle, nakledilirken hücrelerin sağ kalım miktarı azalır ve nakledilen yağın hacim kaybına neden olabilir. Literatürde, yağ dokusunda bulunan ve nakledildikleri bölgede değişikliklere neden olan hücreler, transplante edilen dokunun sağ kalımındaki etkileri incelenmiştir. Bu noktada karşımıza başlıca adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AKKH), yağ dokusundan elde edilen heterojen hücre topluluğuna sahip stromal vasküler fraksiyon (SVF) çıkmıştır.

Adipoz doku kaynaklı kök hücreler, yağ dokusunda tanımlanan mezenkimal kök hücrelerdir. Dokuda hasarlı yapılara farklılaşabilmeleri ile beraber aynı zamanda dokunun, hücrelerin rejenerasyonunda da görev alırlar. AKKH'lerin yağ greftinin sağ kalımını arttırmak için nakledilen dokuya eklenmesi düşünülmüştür. Bunun nedeni, AKKH'in apoptozu önleyici olarak hareket eden ve inflamasyonu düzenlerken bir yandan anjiyogenezi teşvik edebilen ve bu sayede yeni oluşturulan kan akımını sağlayan bir dizi büyüme faktörü salgılamasıdır. Öte yandan, AKKH, adipositlere farklılaşmalarıyla kaybedilen adipositlerin yerine geçerek greftin hacmini korumasına yardımcı olabilir. Bu amaçla kullanımları, hücre destekli yağ transferi (CAL- cell assisted lipotransfer) olarak adlandırılmıştır. Nakledilen yağ dokusuna, AKKH eklenmesiyle greft sağ kalımını arttırmak için kök hücrelerin kullanılmasını belirtir. Yoshimura ve ark. tarafından, hücre destekli yağ transferi, ilk kez klinik olarak kullanılmıştır (6, 7).

Bir diğerkomponent ise stromal vasküler fraksiyon (SVF) olup, enzimatik ya da mekanik parçalanma ile, yağ dokusundan izole edilen, heterojen hücre topluluğudur. Günümüzde kök hücre kaynağı olarak deneysel ve klinik alanda kullanılmaktadır. Stromal vasküler fraksiyonun potansiyelini değerlendiren denemelerde, SVF'nin radyasyon hasarında, yanık yaralarında ve diyabete bağlı gelişen ülserlerin tedavisinde karşılaştırılabilir şekilde etkili olduğunu göstermektedir (8, 9). Ayrıca kronik koşullardaki kullanımının yanı sıra, yağ greftlerinin SVF ile zenginleştirilmesinin, yağ greftinin hacminin ve canlılığının korunmasında da kullanılabileceğini göstermiştir (10).

Yağ greftlerinin, mevcut dokuya hacim sağlamanın ötesinde nakledildiğidokuda yaptığı, rejuvenatif ve rejeneratif değişiklikler dikkat çekmeye başlamıştır. İn vitro örneklerle yapılan çalışmalarda yağ greftinin sağ kalımı ve dokuya etkisi taslak halindeki mekanizmalarla anlaşılmış olmakla beraber; böylesine yüksek potansiyelli bir maddenin in vivo alandaki sağ kalımı hakkında halen daha yeterli bilgiye sahip olunamamıştır. Şimdiye kadar, yağ grefti uygulanmasından sonra istenilen, elde edilen hacmi korumanın getirdiği olumlu sonuçların önündeki ana engel, hacim kaybı nedeniyle dokuda öngöremediğimiz uzun vadeli sonuçlardır ve genellikle dolgu istenen alanda aşırı düzeltmeyi ya da tekrarlayan prosedürleri gerektirir. Bu da hastanın rahatsızlığına, istenilen görünümünden daha azına, yüksek maliyete ve ek morbiditeye neden olmaktadır. Tekrarlayan işlemlerden kaçınmak adına, hastanın yağ toplama işlemi sırasında elde edilen fazla yağ dokusunu saklamak ve tekrar yağ greftine ihtiyaç duyulduğunda saklanan dokuyu kullanabilmek, mantıklı olacaktır.

Yağ dokusunun kryoprezervasyonu, yağ grefti uygulamasının artması ile beraber gündeme gelmeye başlamış, oldukça yeni bir alandır. Deneysel ve klinik anlamda pek çok çalışmayla denenmiş olmasıyla birlikte, kryoprezervasyon için dondurma protokolü, depolama şekli, saklama süresi, saklanan yağın ve yağdan elde edilen komponentlerin çözünme sonrası sağ kalımı, alıcı dokuya verildikten sonra gelişen süreçler hakkında çok farklı sonuçlar elde edilmiş ve bir fikir birliğine varılamamıştır. Biz, kliniğimizde oluşturduğumuz dondurarak saklama protokolü ile, yağ dokusunun ve yağ dokusundan elde edeceğimiz alt birim komponentlerinin (AKKH, SVF, doku kokteyli) belirli bir süre saklanmaları ve çözünmeleri sonrası

sağ kalımlarını incelemeyi ve karşılaştırmayı planladık. Ayrıca bu komponentlerin in vivo ortamda, nakledildikleri dokuda oluşturdıkları hacim değişikliğini ve dokuda gerçekleştirdikleri immünohistokimyasal değişiklikleri karşılaştırmayı amaçladık. Bu anlamda, literatüre, yağ dokusu kryoprezervasyonu için, hangi yağ dokusu komponentinin depolanmasının daha etkili olabileceğini tartışabileceğimizi hem de protokolümüzle beraber bilgi katkısı yapabileceğimizi düşünöyoruz.

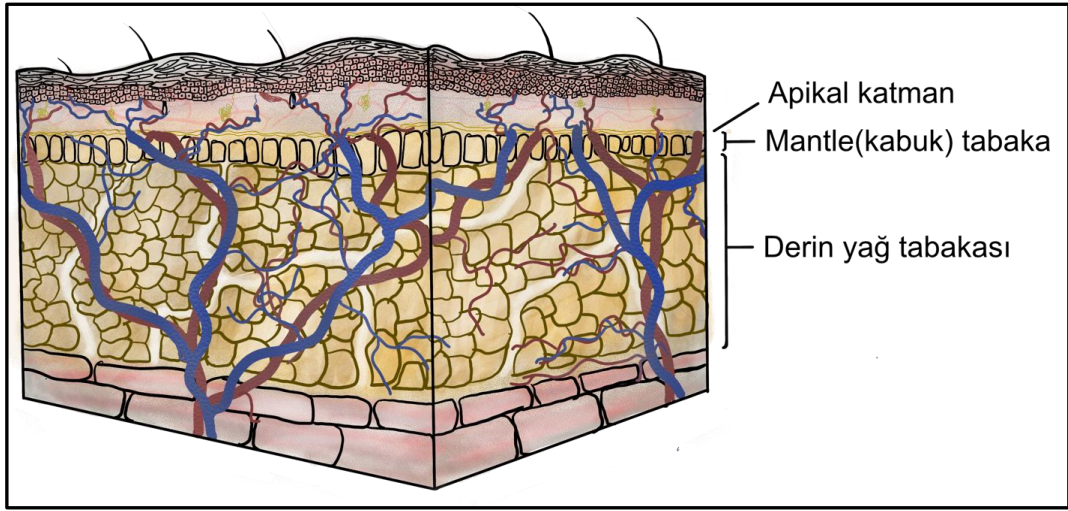


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ (Adipoz) Dokusu

Yağ (adipoz) dokusu, cilt altında (subkutan yağ), iç organların çevresinde (visseral yağ), kemik iliğinde (sarı kemik iliği) ve meme dokusunda bulunan bir yağ dokusu türüdür. İnsanlarda mevcut olan en büyük doku olup -yetişkin insan vücut kütlelerinin en az %4'ü- vücudun enerji dengesinin düzenlenmesinde de merkezi rolü üstlenir.

2.1.1. Yağ Dokusunun Anatomisi



Şekil 2.1. Subkutan yağ dokusunun anatomik görünümü ve bölümleri

Subkutan yağ dokusu temel olarak 3 bölümden oluşmaktadır:

- *Apikal Tabaka*, retiküler dermis altında yerleşim gösterir. Tekal ya da periadnexial katman olarak da adlandırılan bu yağ dokusu tabakası, ter bezleri ve kıl folliküllerini çevreler. Daha derinde, vasküler ve lenfatik yapıların etrafında yer alır.
- *Mantle (Kabuk) Tabaka*, apikal tabakanın derininde, dermal yapıları çevreleyen ve daha çok kolumnar şekilli adipositlerden oluşan yüzeyel yağ dokusu katmanıdır. Derin yağ dokusundan fasya benzeri fibröz doku ile ayrılır. Travmaya karşı cilt direncini ve dışarıdan cilde gelen basıncın daha

geniş bir alana yayılmasını sağlamaktadır. Bu tabaka, göz kapakları, tırnak yatağı, burun sırtı ve peniste bulunmaz.

- *Derin Yağ Tabakası*, mantle tabaka ile daha derinde yer alan kas fasyası arasında yerleşim gösterir. Derin yağ tabakasının şekli ve kalınlığı, cinsiyete, genetiğe ve bireyin beslenme şekline bağlıdır.

Yağ hücreleri, adipositler, dokuda globüler yapılar halinde bulunurlar. Bu globüler yapıdaki katmanlar arasında da, oblik ve tanjansiyel seyir izleyen fibröz yapıda septalar bulunmaktadır. Tanjansiyel planda yerleşim gösteren fibröz septalar yağ dokusunun altında bulunan kasın fasyasına paralel yapıdayken oblik planda yerleşim gösteren septalar daha ince olup tanjansiyel yerleşimli septalarla bağlantılıdır.

2.1.2. Yağ Dokusu Embriyolojisi

Poissonnet ve ark. (11), yaşına göre gelişimi normal olan 488 fetüste yaptıkları histolojik çalışmada yağ dokusunun ilk izlerinin gebeliğin 14. ve 16. haftaları arasında saptanabildiğini ve bu alanlardan, yağ dokusunun giderek geliştiğini göstermişlerdir. Doğum sonrasında da aynı bölgelerde yağ birikimi gerçekleşmeye devam etmiş olup; fetal yaşamdaki yağ dokusunun dağılımında cinsiyete dayalı farklılık bulunmamıştır (12).

Gebeliğin ikinci trimesteri, adipogenezde kritik bir dönem olarak görülüp; bu zaman diliminde, mezenkimal kök hücrelerin topluluk oluşturmaya başlaması ve bu topluluklara bitişik yeni kan damarlarının oluşumu, insanlarda adipogenezin ilk belirtileri olarak nitelendirilmiştir (12).

Gebeliğin 23. haftasından sonra, yağ dokusunun, toplandığı bölgelerdeki oluşturduğu lobüllerin sayısı sabit kalır ve takip eden haftalarda bu lobüllerin boyutları büyürken adipoz dokunun multiloküler görünümü ortaya çıkar (11-13).

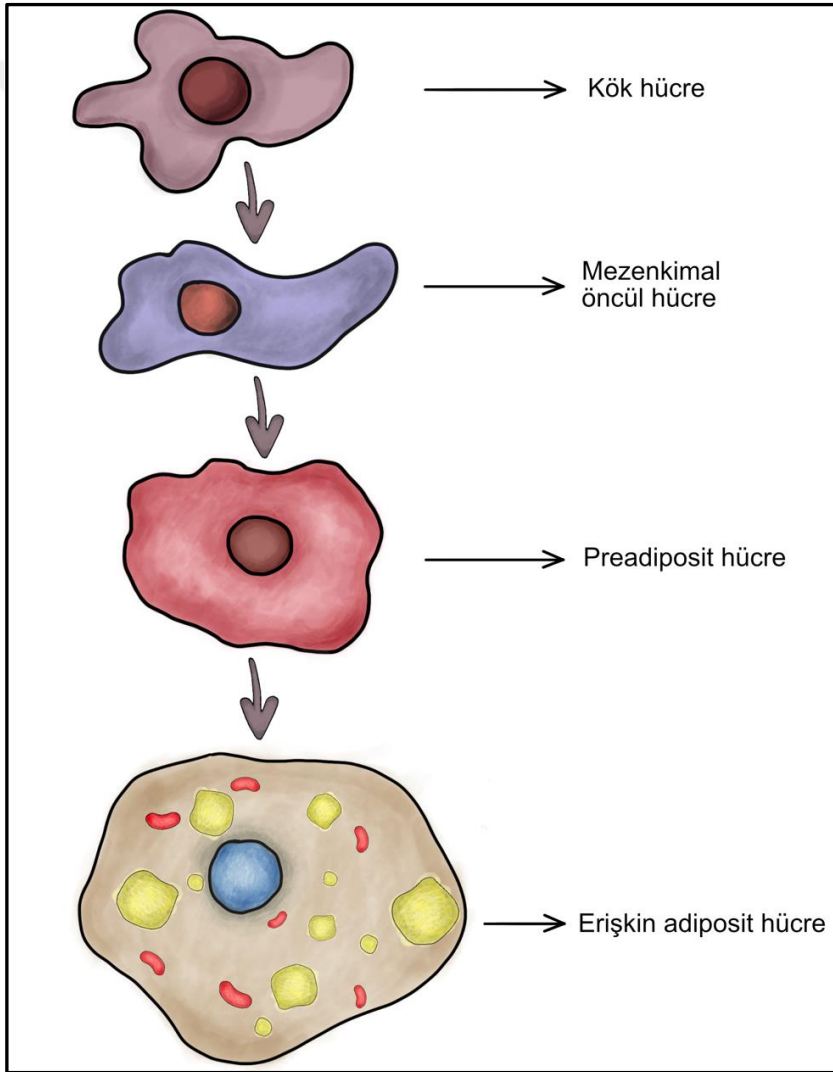
Doğumdaki yağ dokusu, vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturur ve bu dönemde alınan biyopsi örneklerine göre, yaşamın ilk 12 ayında, vücut yağ ağırlığındaki 0,7 kg'dan 2,8 kg'a olan artışın, hücre boyutundaki büyümeden kaynaklandığı, hücrelerin sayılarının değişmediği gösterilmiştir.

İlerleyen zamanda, subkutan yağ dokusu yaşamın 9. ayında tepe noktasına ulaşır ve 6 yıl içinde azalma gösterir. Ergenlik öncesi döneme ulaşıldığındaysa

cinsiyet farklılıklarının belirgin hale geldiği "yağ fişkırması" diye nitelendirebileceğimiz dönem ile artış gösterir. İnsan hayatında, sonrasında, yağ dokusunun değişimindeki en önemli etmen beslenme olmaktadır.

2.1.3. Adipogenezis

Adipogenez genel tanımıyla, fibroblast benzeri progenitor hücrelerin birçok sinyal ve yolak aracılığıyla adipojenik farklılaşma yoluna giderek matür adipositlere dönüşmesidir.



Şekil 2.2. Adipogenezin temel basamakları

Bunu iki aşamalı bir süreç olarak düşünebiliriz. İlk adımda, mezenkimal öncü olan fibroblast benzeri progenitor hücre -adipoblast-, adipojenik yolak ile farklılaşarak preadipositi oluşturur ve daha sonra bu adımı, belirli preadipositlerin büyümeyi durdurarak lipid depoladığı ve insüline yanıt veren matür, fonksiyonel adipositleri oluşturduğu ikinci basamak takip eder.

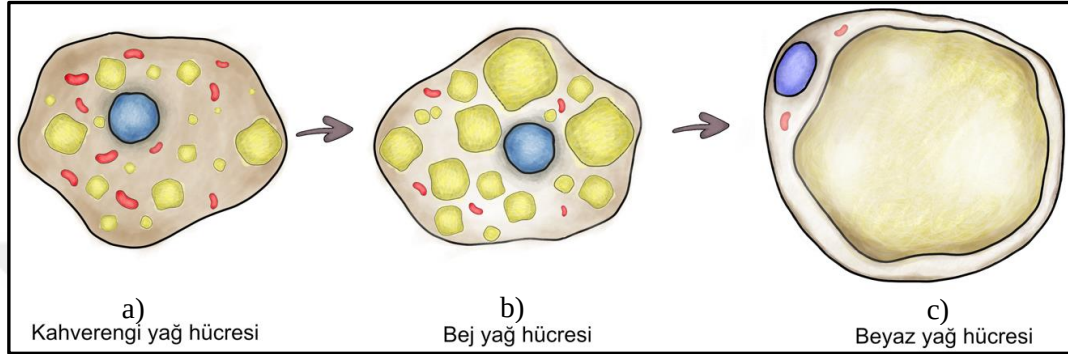
Bu süreçteki değişiklikler çeşitli hormonlarla ilişkilendirilmiştir. Katekolaminler, β -adrenoreseptör ajanları, tiroid hormonları, insülin, büyüme hormonu, glukokortikoidler ve seks steroidlerinin hepsinin adiposit farklılaşmasına yol açan sinyallere katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Farklılaşma süreci, adipoblasttan preadiposite, sonrasında olgunlaşmamış bir adipoz hücreğine, en nihayetinde adiposit olarak adlandırılan olgun bir adipoz hücreğine değişim gösterir. Peroksizom proliferatör aktivatörü gama (PPAR- γ) gibi düzenleyici genlerin ve faktörlerin ortaya çıkması ve translokaz vasıtasıyla uzun zincirli yağ asitlerinin seçici alımı hormondan bağımsızdır, fakat son basamak farklılaşma için hormonlar gereklidir. Yağ asitlerinin sentezi ve esterifikasyonu için gerekli enzimler, immatür adipositlerin farklılaşmasında önemlidir. Gliserol 3-fosfat dehidrogenazın ortaya çıkması ve hücrenin triaçilgliserol biriktirme yeteneği, bir hücrenin bir adiposit halinde tam farklılaşmış olduğunu gösterir. Terminal farklılaşma sürecini tetiklemek için birçok adipojenik faktör ya da indüksiyona ihtiyaç duyulurken, anti-adipojenik faktörler de etkilere karşı koyabilir. Adiposit gen transkripsiyonunun 'ana düzenleyicileri' arasında ilk tanımlanan CEBPa'dır. CEBPa ve PPAR gen düzenleyici ailelerin yağ hücrelerinin farklılaşması için çok önemli olduğu düşünülmektedir.

Adipogenezin moleküler mekanizmalarıyla ilgili bilgilerimizin çoğu, büyüme faktörlerine otokrin, parakrin etkilere ve hormonal uyarılara yanıt olarak, adiposit oluşturmak üzere farklılaşan fare ve sıçandan elde edilen bir dizi hücre kültürü modelinden oluşmaktadır. İn vitro ortamdaki adiposit farklılaşmasıyla ilgili edindiğimiz bilgiler sonucu in vivo olarak yapılan uygulamalardan biliyoruz ki, bu süreç, şu anki bilgilerimiz kadar basit işleyişe sahip olmayarak halen tamamlanması gereken basamaklar içermektedir.

2.1.4. Yağ Dokusunun Histolojisi

Yağ dokusu, özelleşmiş bir bağ dokusudur ve üç tipi bulunmaktadır:

1. Beyaz Yağ Dokusu (BAD),
2. Kahverengi Yağ Dokusu (KAD),
3. Bej -beige- Yağ Dokusu (BeiAD).



Şekil 2.3. Adiposit tipleri; **a)** Kahverengi yağ hücresi, kahverengi adipoz dokuda (KAD) bulunur, **b)** Bej yağ hücresi, tün adipoz dokularda bulunur, **c)** Beyaz yağ hücresi, beyaz adipoz dokuda (BAD) bulunur.

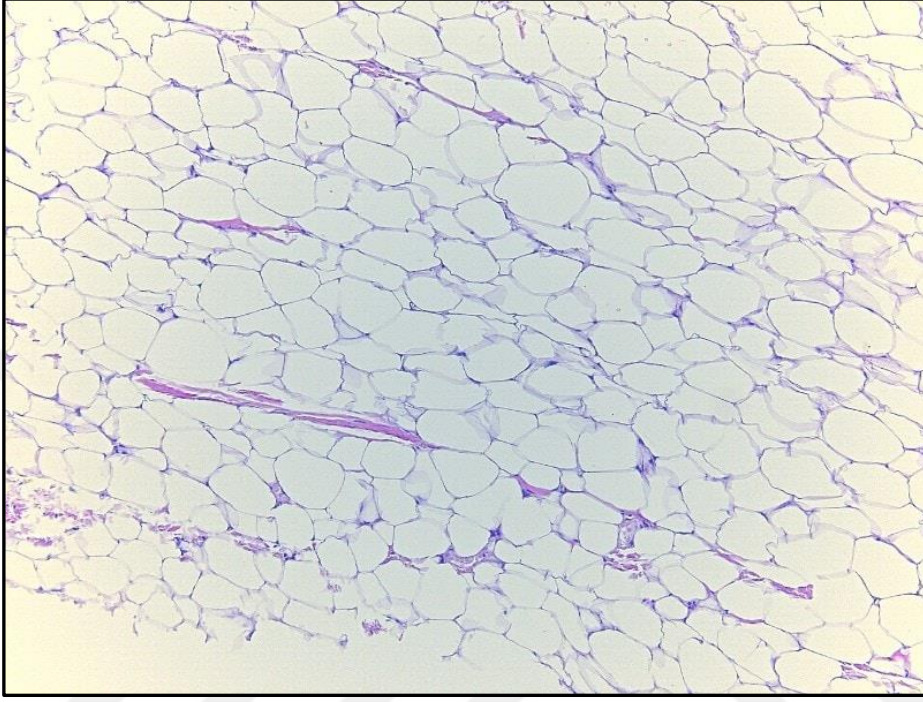
KAD, depolanan enerjinin harcanması yoluyla ısı üreterek vücut sıcaklığını düzenlerken, BAD, enerjinin lipidler halinde depolama organıdır.

Bu dokularda bulunan ve her bir dokunun kendi için özelleştirdiği hücreler olan beyaz ve kahverengi adipositlerin morfolojisi birbirlerinden oldukça farklıdır. Beyaz adipositler uniloküler, kahverengi adipositler multiloküler karakterdedir (14). Kahverengi adipositlerde çok sayıda mitokondri bulunur ve ATP sentezinden oksidatif fosforilasyonu ayırabilen, ısı üretimine neden olan uncoupling protein 1 (UCP1) ile karakterize edilirler (15).

Fakat, UCP-1'e karşı olan immün-reaktiflik tüm yağ dokusu çeşitlerinde izlenir. Bunun nedeni ise, beyaz yağ dokusu içerisinde bulunan bej adipositlerdir. Bu hücrelerin, kahverengi adipositlerden farklı olarak beyaz adipositlerin kökenine daha yakın olabilen öncül hücrelerden geliştikleri düşünülmüştür (16, 17).

Yağ dokusu içerisinde adipositler bir arada, polihedral ya da oval görünümündedirler. Geniş boyutları, hücre içerisinde biriken lipid içeriğine bağlıdır. Beyaz yağ dokusundaki uniloküler adipositler, 100 μm 'dan başlayarak daha büyük boyutlara ulaşabilir. Lipid içerikleri sebebiyle nükleusları yassılaştırmış ve hücre

membranının kenarında izlenmektedir. Rutin histolojik kesitlerde, organik çözücülere bağlı olarak lipid kaybolur ve adipoz doku poligonal şekilli bir ağ yapısı şeklinde gözlenir (Bkz. Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Adipoz doku ışık mikroskobu altında, H&E boyama ile görünümü (Adipositler dokunun genelini oluşturur).

Bağ dokusundan oluşan stroma içerisindeki adipositler, yağ dokusunun büyük bir kısmını oluşturur. Stromanın içeriğinde ise:

- . Fibroblastlar,
- . Preadipositler,
- . Endotelial hücreler,
- . Düz kas hücreleri,
- . Perisitler bulunur.

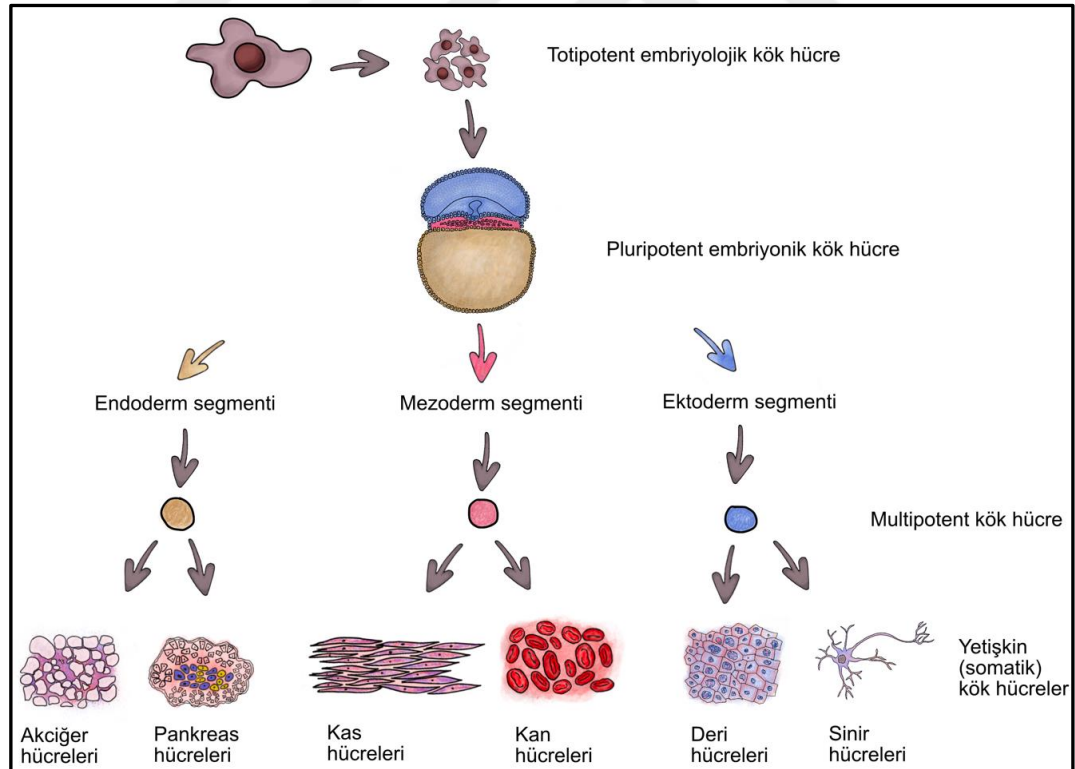
Genel olarak bu bağ dokusu, stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak adlandırılır. İlk olarak, 1964 yılında, Rodbell tarafından adipoz dokunun enzimlerle ayrıştırılması sonucu elde edilmiştir. Yağ dokusunun bu enzimatik sindirimi sonrasında santrifüj işlemiyle elde ettiğimiz pellet kısmı SVF'dir ve mezenkimal kök hücre, endotel öncülleri ve monosit/makrofajları içeren heterojen popülasyona

sahiptir. Bu yapıdaki makrofajlar ve mast hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücreleri, sadece vasküler fonksiyonları değil, aynı zamanda yağ hücrelerini bir arada tutan bağ dokusunun yeni oluşumunu da düzenler. Stroma içerisindeki tüm hücrelerin sayısı adipositlerin miktarından fazladır.

2.2. Kök Hücreler

Kök hücreler, uygun uyarılar ve çevrenin varlığında daha özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesinde olan primitif hücrelerdir. Farklılaşma potansiyellerine bağlı olarak kök hücreler 4 ana gruba ayrılabilirler (18);

1. Totipotent,
2. Pluripotent,
3. Multipotent,
4. Unipotent.



Şekil 2.5. Kök hücrelerin kökeni ve gelişimi

Totipotent hücreler, plasenta ve embriyonik membranlar da dahil olmak üzere insan vücudunu oluşturan tüm hücre tiplerine diferansiye olabilirler.

Pluripotent hücreler, blastokist içerisindeki hücrelerden oluşurlar ve 3 germ yaprağına da (ektoderm, mezoderm ve endoderm) farklılaşabilirler. Bu hücreler aynı morfolojide olup yüksek oranlarda proliferasyon kapasitesine sahiptirler ve teratom oluşturabilirler.

Multipotent hücreler, tek bir germ yaprağına ait farklı hücre tiplerine dönüşebilirken, *unipotent hücreler*, bir germ yaprağına ait sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilirler.

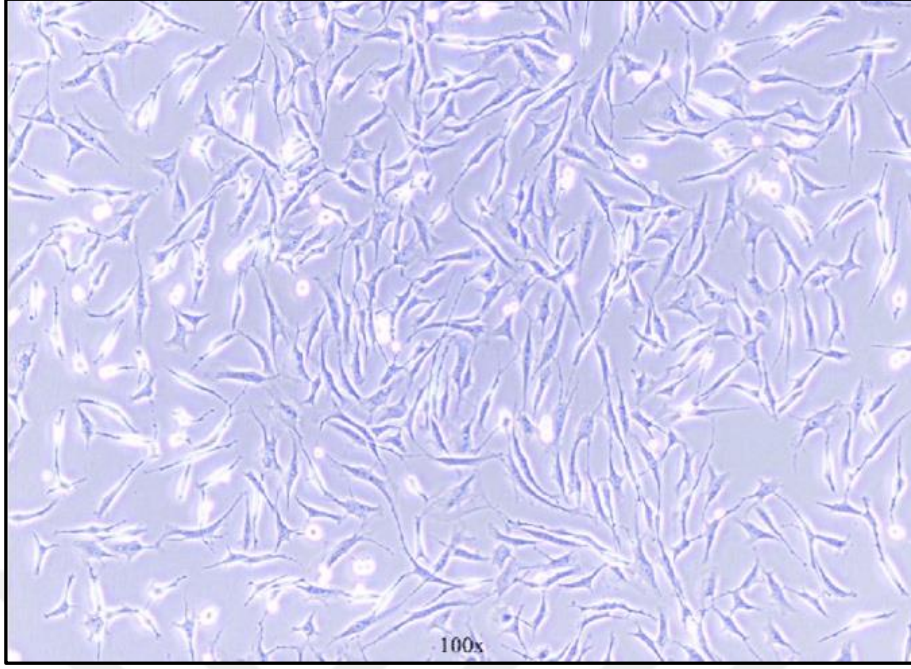
Embriyonik kök hücreler (totipotent/ pluripotent) ve yetişkin kök hücreler arasındaki temel farklılık, embriyonik kök hücreler, tüm germ tabakalarına ait hücre tiplerine farklılaşabilirken, yetişkin kök hücrelerinin (YKH), bu farklılaşma kapasitesi sınırlıdır (18, 19).

Yetişkin kök hücreleri, başlıca kemik iliği, umbilikal kord, yağ dokusu ve diş pulpası gibi vücudun farklı dokularından izole edilebilir. Temel olarak bu hücreler, matürasyon, yaşlanma ve hasarlanma sonrası yok olan hücrelerin yerine yenilerinin gelmesini sağlayarak, doku rejenerasyonu ve onarımında rol oynarlar.

Bir yetişkin kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler, mezodermal (adipositler, osteositler ve kondrositler), ektodermal (nörositler) ve endodermal (hepatositler) farklılaşma yeteneğine sahip pluripotent kök hücreler olarak tanımlanabilirler. Umbilikal kord, kemik iliği, adipoz doku gibi hastanın kendi dokularından elde edilmesinin yanı sıra in vitro ortamda çoğalabilmesi sayesinde az miktarda örneğin yeterli olması ile birçok deneysel ve klinik çalışmada kullanılmaktadırlar.

2.2.1. Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücreler

Yapılan çalışmalarla beraber mezenkimal kök hücrelerin aktarıldıkları dokuyu yenilemelerinden başlayarak, hastalıkların tedavisinde intravasküler uygulamalarına kadar olabilecek kullanım alanı gün geçtikçe artmaktadır. Adipoz dokunun bu rejeneratif potansiyeli yüksek yetişkin mezenkimal kök hücreler açısından zengin bir kaynak olduğu keşfedilmiştir ve bu kök hücreler adipoz doku kaynaklı kök hücre olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.6. Adipoz doku kaynaklı kök hücre - AKKH (ışık mikroskobu x 100)

Adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AKKH), kıl foliküllerinde (dermal papilla hücreleri), dermal tabakalarda, interfoliküler dermiste ve hipodermis dokusunda tanımlanan mezenkimal kök hücrelerdir. AKKH'lerin ciltte ve cilt altı yağ dokusunda bulunan hasarlı veya ölü hücreleri onarmak için çoğaldığı ve cilt hücrelerine farklılaştığı bilinmektedir; aynı zamanda hücre yenilenmesini ve iyileşme sürecini aktive etmek için otokrin ve parakrin yollarla da hareket ederler (20-22). Yara iyileşmesinde, hasarlı bölgeye, dermal fibroblastlara, endotelial hücrelere ve keratinositlere (23) farklılaşmak amacıyla göç ederler ve cilt hücreleriyle olan etkileşimleri, homeostazın düzenlenmesinde ve yara iyileşmesinde rol alır.

Yapılan çalışmalarda, AKKH sekretomları (24-28):

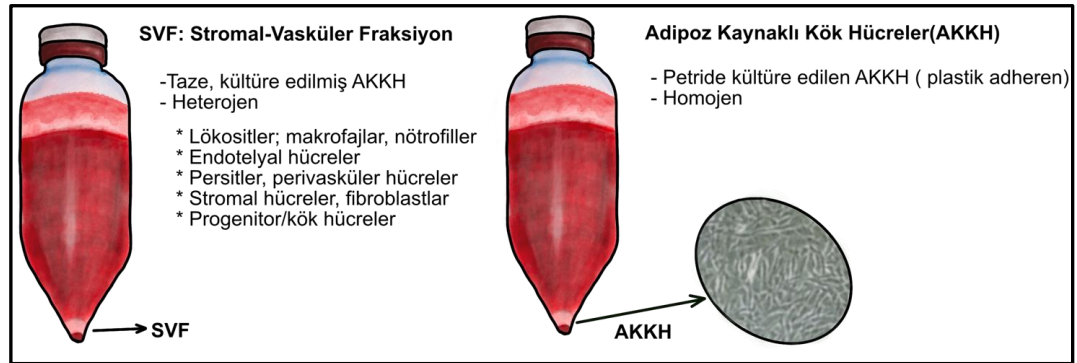
- Makrofajların inflamatuvar süreçte düzenlenmesinde,
- Anjiogenezi destekleyerek yeni damar oluşturulmasında,
- Endotelial hücre farklılaşması ve hücrelerin migrasyonunda,
- Granulasyon dokusunun olgunlaşmasında, ekstrasellüler matriks üretimi ve cilt hücrelerine farklılaşmada rol oynar.

Bu özellikler ile AKKH, yara iyileşmesi ve cilt yaşlanmasının tedavisinde faydasının yanı sıra birçok deneysel, klinik araştırma için de ayrıca yol açıcı olmuştur (29).

Çizelge 2.1. Adipoz doku kaynaklı kök hücrenin ve SVF'nin klinik uygulama alanları

Hedef Doku	Yumuşak doku rekonstrüksiyonu	Meme rekonstrüksiyonu ve augmentasyonu, bası ülseri, fasiyal atrofi, enterokutan/ rektovajinal fistül
	Sert doku rekonstrüksiyonu	Osteoarttiküler (osteoartrit, dejeneratif disk hastalığı, osteoporotik fraktürler, genu varum
Hastalıklar	Nörolojik	Parkinson hastalığı, multipl skleroz, otizm
	Dolaşım ve kardiyovasküler	İnme, kronik iskemi kalp hastalıkları, akut miyokard infarktüsü, kritik ekstremité iskemisi, iskemik nöropatisi
	Metabolik ve otoimmün	Tip 1 ve 2 diabet, siroz

Yağ dokusunun mekanik veya enzimatik yolla hücrelerinden ayrılması ile, geride kalan bağ dokusu yani stromal vasküler fraksiyon (SVF) elde edilir. SVF çok sayıda ve çeşitli hücre topluluğu içermekle beraber aynı zamanda zengin bir AKKH kaynağıdır; bu hücrelerin bir diğer özelliği de plastiğe olan yapışma (adhezyon) kabiliyetleridir(30). Bu adhezyon, petri kabına ekimlerinden sonra saatler içerisinde gerçekleşmektedir. Günümüzde AKKH'lerin hızlı adhezyonu diğer hücrelerden ayrıştırılabilimleri açısından önem kazanmaktadır ve kültürlerde iğsi hücreler şeklinde görülebilmektedirler.



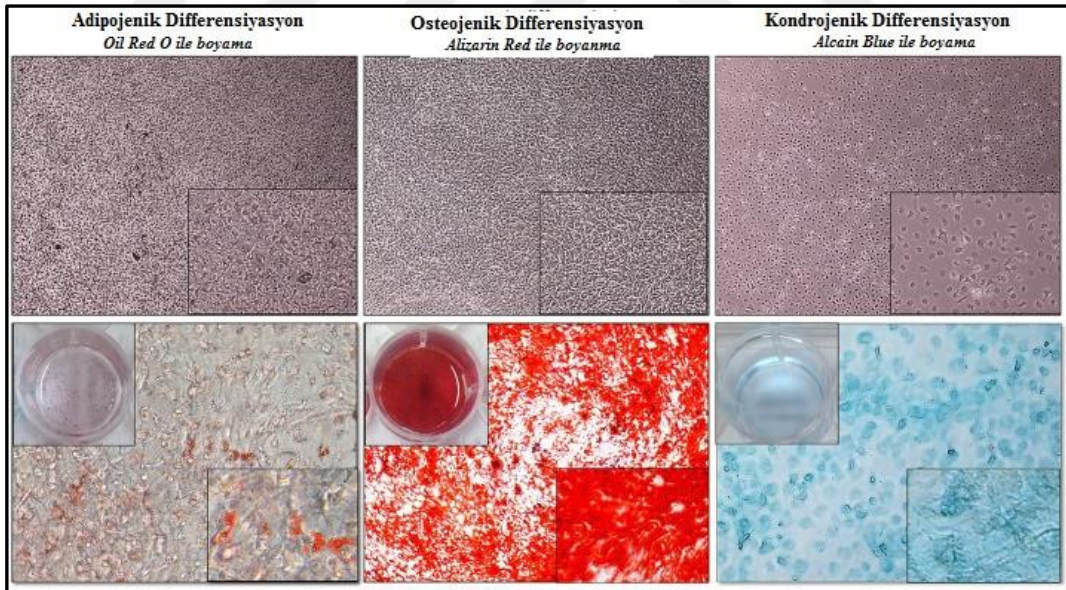
Şekil 2.7. SVF ve AKKH ayrımı

AKKH'ler CD45 (lökositler) ve CD31 (endotelyal) yüzey belirteçlerini taşımazlar. Bunların yerine immünohistokimyasal olarak CD44, CD73, CD90 ve CD105 ile ayırt edilebilirler (31-34).

AKHH'ler;

- Osteoblastlara,
- Kondrositlere,
- Adipositlere,
- Düz Kas Hücrelerine,
- İskelet Kası Hücrelerine,
- Sinirlere,
- Perisitlere farklılaşabilirler (35, 36).

Bu özellikleri ile, kolay elde edilebilmeleri ve doku oluşumunda doku yenilenmesindeki farklılaşma yetenekleri ile kök hücre tedavilerinde kullanılmaları için onları ideal hücreler haline getirmektedir (37).



Şekil 2.8. Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin, farklı doku hücrelerine differensiyasyonu (38)

2.2.1.a. Hücre destekli yağ transferi (Cell-Assisted Lipotransfer – CAL)

Adipoz doku naklinin ilk zamanında, yağ hücrelerinin hayatta kalması difüzyona bağlıdır. Hücreler iskemiye hassas olup, ölümleri, nakledilen yağ dokusunda hacim kaybına neden olur. Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin, inflamasyon düzenlenmesi, anjiyogenezin desteklenmesi ve yeni oluşan kan akımını stabilize edebilen bir dizi büyüme faktörü salgılaması ile öte yandan adipositlere farklılaşmaları yoluyla greftin hacmini stabilize edebilmeleri yağ greftinin sağ kalımında destekleyici olarak kullanımlarında mantıklı bir yol olarak görülmüştür.

Hücre destekli yağ transferi, greftin sağ kalımını optimize etmeyi amaçlamaktadır (39-43). İlk olarak, bağıışıklığı baskılanmış kemirgenlerde yapılan çalışmalarda, insandan elde edilen ve nakledilen yağ greftlerine kök hücrelerin eklenmesi ile yağ dokusunun sağ kalımının arttığı ve anjiogenez sayesinde yeni damar oluşumlarının geliştiğı gösterilmiştir (43). Sonrasında ise, hücre destekli yağ transferi adı verilen bu yöntemin klinik kullanımı ilk olarak Yoshimura ve arkadaşları (6, 7) tarafından gerçekleştirilmiştir (44-47).

2.3. Yağ Greftleri

2.3.1. Yağ Greftinin Temelleri

Yağ, insan vücudunda kolayca bulunabilen ve kısa bir işlemle elde edilebilen, kişinin kendisinden alındığı için de biyoyumlu bir materyaldir. Vücudun farklı bölgelerinden alınabildiğı gibi, tekrardan vücudun farklı alanlarında dolgu maddesi olarak kullanılabilmesiyle estetik ve rekonstrüktif cerrahide temel bir konuma sahip olmuştur. Ayrıca nadir olsa da HIV kaynaklı yüz atrofisi (48), rizartrit, sfinter yetmezliğı nedeniyle idrar kaçırma, velofarigeal yetmezlik gibi durumlarda da kullanımı gösterilmiştir.

Yağ dokusunun elde edilmesinden, işlenmesine ve nakledilmesine kadar dikkat edilmesi gereken basamaklar ve yapılan prosedürler çok çeşitlidir. Bu prosedürlerin farklı kombinasyonlarda uygulanması her klinikte uygulamada değişiklik gösterebilmektedir. Bu yüzden temel işlemler haricinde, ideal yağ grefti uygulama prosedürü için herhangi bir ortak görüş yoktur. Otolog yağ grefti transplantasyonunda dikkat edilmesi gereken basamaklar sırasıyla:

- Liposuction solüsyonunun içeriği,
- Liposuction solüsyonunun infiltrasyon şekli ve miktarı,
- Liposuction yapılacak bölge,
- Liposuction yöntemi (power-assisted, ultrason, radyofrekans vb.)
- Toplanan yağa, lipooaspirata, uygulanan işlemler,
- İşlenen yağın verilme şekli,
- Yağın nakledildiği bölge,
- Postoperatif takip ve bakım süreci

Yağ dokusundan elde edilen greft içeriğinde, dar bir sitoplazmik sınır ile birbirinden ayrılan 120 µm çapa ulaşan adipositlerin yanı sıra, yine pre-adipositler, endotelial hücrelerden oluşan stromal vasküler fraksiyon hücreleri, monositler, makrofajlar, granülositler, lenfositler ve yağ dokusunun kök hücreleri bulunmaktadır.

Geçmişte yağ greftleri yağ dokusunun eksizyonu ile elde edilirken, günümüzde greftler liposuction kanülleri aracılığıyla toplanmaktadır. Toplanan yağın çapı, kullanılan kanülün çapına, uygulanan basınç ve akış hızının oluşturduğu kesme kuvvetine bağlıdır. Dokuyu çekmek için gerekli olan vakum basıncının gereğinden fazla olması greft hücrelerinin hasarlanmasına sebep olup (49); artan basınç ile daha dar bir alana çekilen greftin hızının artması sonucu kesme kuvvetinin çoğalması olarak nedenini açıklayabiliriz.

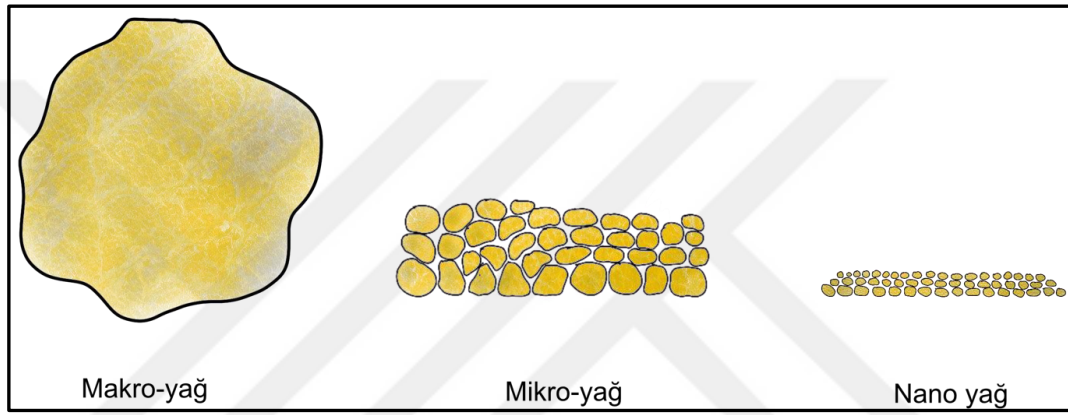
2.3.1.a. Yağ greftinin alındığı bölge

Yağın toplanacağı alan hastanın beden yapısına bağlı olarak değişiklik göstermekle beraber mümkün olduğunca morbiditenin az olacağı bölgeler seçilmelidir. Dikkat edilmesi gereken bir diğer konu ise bölgeden bölgeye kök hücre miktarı farklılık göstermektedir.

Fraser ve ark., kalça bölgesindeki yağ dokusunun karın bölgesine göre iki ila üç kat daha fazla fibroblast oluşturma birimine (fibroblast forming unit - FFU) ve yedi kat daha fazla alkaline fosfat pozitif koloni oluşturma birimine (colony forming unit - CFU) sahip olduğunu bildirmiştir (50).

2.3.1.b. Yağ greftinin boyutu

Zamanla yapılan uygulamalarda yağ grefti boyutlarının, nakledilen yağın sağ kalımı üzerine belirleyici bir etkisi olduğu görülmüştür. Bir yağ grefti damlacığının yarıçapı, yüzeyiyle dolaylı olarak orantılıdır ve ideal olarak tek hücre büyüklüğündeki greftler, -nakledilen greftlerin başta difüzyon yoluyla besleneceğini düşünürsek- daha yüksek bir sağ kalım potansiyeline sahip olacaktır(51). Öte yandan, büyük greftler merkezlerini difüzyon ile besleyemeyeceklerinden greftin içinde kalan hücreler olumsuz yönde etkilenir.

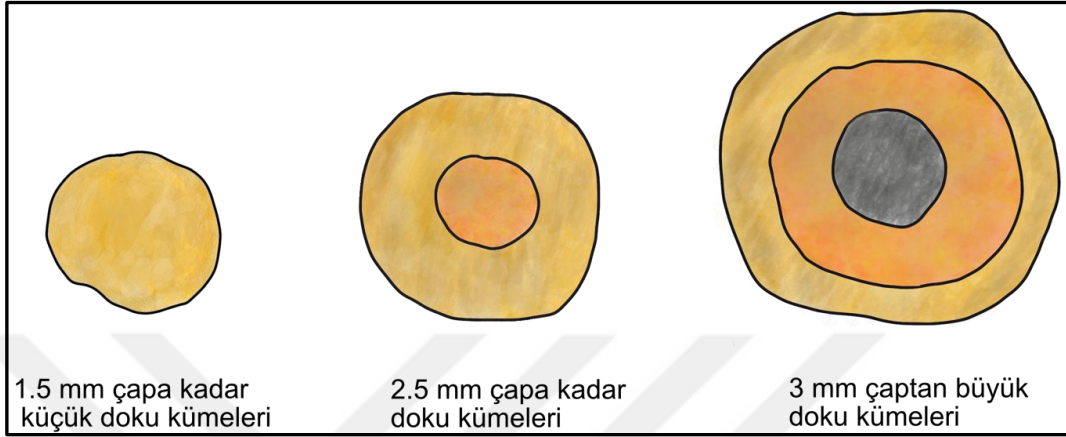


Şekil 2.9. Yağ grefti boyutları

Günümüzde üç farklı greft boyutunu görebiliriz:

- *Makroyağ (macrofat)*, toplanma ve verilme sırasında çapı geniş, künt kanüller kullanılan genellikle büyük hacim oluşturmak için kullanılan yağ grefti çeşididir.
- *Mikroyağ (microfat)*, özellikle yüzdeki hassas alanlara yapılan greft uygulamasında, örneğin göz kapakları veya dudaklar için tercihen 0,7-0,9 mm çapında künt kanüllerin kullanıldığı daha küçük çaplı yağ greftidir.
- *Nanoyağ (nanofat)*, kanül çapının en küçük olduğu (27 G'ye kadar) ve bununla orantılı olarak greft verilmesi sonrasında pürüzsüz bir yüzey elde etmek amacıyla yağı işleminden geçirerek elde edilen grefttir. Nanoyağ greftinde adiposit bulunmaması nedeniyle hacimsel olarak aktarıldığı dokuda farklılık yaratmasa da dokunun rejenerasyonu ve cildin rejuvenasyonunda kullanımı mevcuttur (52).

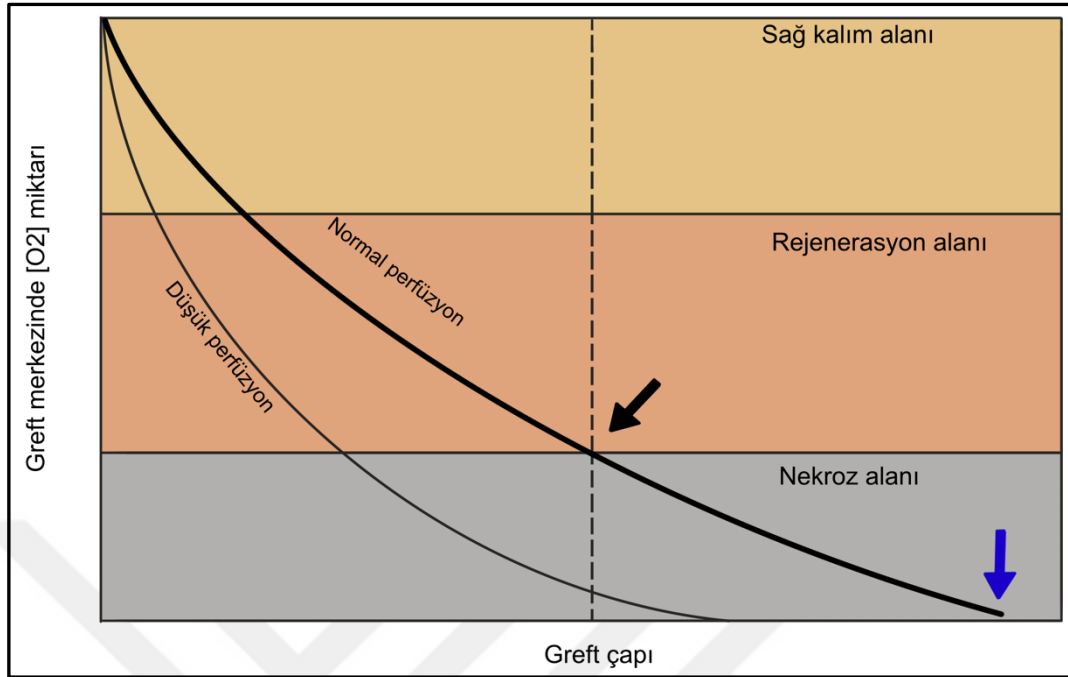
Bu 3 yağ greftinin, literatürde, içeriklerindeki adiposit ve kök hücre sayısının değişkenlik gösterdiği, ayrıca bu hücrelerin sağ kalımları açısından farklılıklar olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Yağ damlacığının çapının, merkezi alandaki doku nekrozu ile ilişkisi

Difüzyon yoluyla beslenen yağ greftlerinin, damlacıkların 2 mm'den daha büyük olmayacak şekilde küçük birimler halinde yerleştirilmesine dikkat edilmelidir (53). Daha küçük birimlerin dağılımı, greftin difüzyon alanını ve erken inoskulyasyonu artırır ve sonraki başarılı neovaskülarizasyonu da destekler (53, 54).

Vaskülarizasyon başarılı olmazsa, greftin merkezinde nekroz oluşur (51, 55, 56). Greftin dikkatli bir şekilde dağıtılması, çevre doku ile olan temasının artırılması için büyük önem taşımaktadır. Ancak alıcı dokuda, greftin düzgün ve dikkatli dağılımı yapıldığında bile, doku tarafından kabul edilebilecek hacmin hala bir sınırı vardır. Belirli bir miktarda enjekte edilen hacim sonrasında, alıcı dokunun kompliyansı azalır ve interstisyel basıncı yükselir. Basıncın yükselmesi ile de kapiller dolaşımında azalma görülür ve bu, dokunun beslenmesinin azalmasına dolayısıyla greftin sağ kalımında azalmaya neden olur (57, 58).



Şekil 2.11. Yağ greftinin çapının, merkezi alandaki oksijen miktarı ve hücre/doku sağ kalımı ile olan ilişkisi. Greft çapı arttıkça, nakledilen dokunun merkezi alanı beslemesi azalır ve sonucunda hücre/doku nekrozu oluşur, uzun süreli hacim kaybı gelişir (Siyah ok. Rejenerasyon alanından nekroz alanına geçişteki uç nokta greft çapı. Mavi ok. Nakledilen greftin çevre dokuya basısı sonucu tamamen nekroza uğrayacağı çap).

Yağ greftinin sağ kalımı ile ilgili alternatif bir teori, Hofer ve ark. (59) tarafından 'iskele teorisi' veya 'matriks teorisi' olarak adlandırılmıştır; bu teori Peers'in konak değiştirme teorisi'nden türemiştir (60). Bu teoride, nakledilen yağ greftinin içindeki adipositlerin hepsinin aslında ölü olduğunu ve geride kalan ekstrasellüler matriks yapısının bir iskele oluşturmasıyla yeni dokunun oluşumuna imkan sağladığını varsaymaktadır. Makrofajlar ve kök hücreler tarafından başlatılan anjiyogenez ve adipogenez ile de bu teori desteklenirken; canlı ve ölü hücreler ile, greft ve alıcı hücreler arasındaki sitokinler yoluyla başlatılan hücrelerel sinyaller bu teoride belirleyici bir rol oynamaktadır (61).

2.3.1.c. Nakledilen yağ greftinin kanlanması

Yağ grefti yukarıda da bahsettiğimiz üzere önce difüzyon ile sonrasında inoskulasyon ve vaskülarizasyon sayesinde beslenir (62). Nakil sonrası yedinci günden itibaren damarlanmanın arttığı, otuzuncu günde platoya ulaştığı gösterilmiştir. Langer ve ark. (63), 12 günlük bir süre sonrasında yağ greftinde yeni ve olgunlaşmış kan damarlarını tespit edebilmişlerdir. Yağ dokusunun iskemiye karşı düşük toleransının nedeni, insan vücudundaki doğal yağ dokusunda bulunan her bir adipositin en az bir kapiller tarafından direk olarak beslenmesinden kaynaklanmaktadır; bu da yağ greftinin sağ kalımı için beslenmesinin önemini vurgulamaktadır.

2.3.2. YAĞ Grefti ve Kök Hücre

Teknoloji ile beraber gelişen enjeksiyon tekniklerine ve en son işleme yöntemlerine rağmen, yağ greftinin hacim kaybı sorun olmaya devam etmektedir. Greft işlemi sonrasında ilk 3 ayda özellikle görülür. Bu sorunun nedeni, fizyolojik yağ dokusuna oranla yağ greftinde bulunan adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin azlığı da olabileceği düşünülmüştür. Çünkü AKKH'ler yoğun olarak damar yapılarının etrafında bulunurlar ve liposuction yöntemiyle kök hücrelerini damarların yakınında toplamak zor bir işlem olacağından, doğal olarak yeterli miktarda elde edilemeyeceği düşünülür. Ayrıca yağ greftinin hazırlanması sırasında bile kök hücre kaybı yaşanır.

AKKH miktarının azlığı, önceden bahsedildiği üzere kök hücre destekli yağ transferi ile yağ greftine daha fazla kök hücrenin eklenmesiyle telafi edilebilir. Prosedürün bir parçası olarak, SVF elde etmek için toplanan lipoaspiratın yaklaşık yarısı işlenirken, diğer yarısı lipoaspiratla beraber nakledilir. Böylelikle, mililitre başına AKKH miktarı arttırılır (64). Her 1 ml AKKH suspansiyonu, 4-5 ml'lik yağ dokusuna aktarılmış olur ki bu da dokuda kök hücrelerde %20-40 oranında bir artış sağlar (65, 66).

Yöntemin etkileri dikkate değerdir ve büyük ölçüde stromal vasküler fraksiyonda bulunan kök hücrelere dayanmaktadır.

SVF, lokal inflamatuvar süreçleri baskılamaya potansiyeline sahiptir. Lökosit infiltrasyonunda azalmaya ve IL-10, prostaglandinler, INF-gama ve HGF gibi anti-inflamatuvarların ekspresyonunda artışa sebep olurken; ayrıca TNF- α , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını da sağlamaktadır (67, 68). SVF, büyüme faktörlerinin salgılanmasıyla ve hücreler arası etkileşim yoluyla apoptozun önlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Wang ve ark., Zhu ve ark. (42, 69) yaptıkları çalışmalarda, VEGF, HGF ve IGF-1'in stromal vasküler fraksiyon tarafından salgılandığını göstermiştir. Bu apoptoz karşıtı etki ile SVF doku greftlerini hipoksik koşullardan koruyabilir ve dokuda oluşan hasarı sınırlayabilir.

AKKH, adipositlere farklılaşma ve böylece nakledilen greftin hacim kaybını azaltabilme özelliğine sahiptir ve aynı zamanda anjiyogenezi de teşvik eder. Kendilerini endotelial hücrelere farklılaştırabilirler; endotelial büyüme faktörlerinin dağılımını desteklerler (22, 70). Fakat farklılaşma potansiyeli, donör değişkenliği gösterir. Ayrıca, kök hücrelerin kalitesi için;

- Anatomik lokalizasyon,
- Liposuction yöntemi,
- Toplanan yağın saklama koşulları,
- Kolajenin enzimatik parçalanması,
- Santrifüjleme işlemi,
- Hastanın yaşı,
- Hastanın ek morbiditeleri de önemlidir.

2.4. Doku Kokteyli

Doku kokteyli, nakledilecek yağ greftinin içerisine hastanın yine kendisinden elde edilen başta dermis ve fasya olmak üzere başka dokuların da eklenmesiyle oluşturulan kompozit doku grefti çeşididir. İlk kez 1989 yılında Onur Erol tarafından kullanılmıştı. Doku kokteyli yağ greftinin, greft sağ kalımında ve uzun süreli nakledilen hacmin korumasında tek başına bir yağ greftinden daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır (71, 72).

2.5. Kryoprezervasyon (Dondurarak Saklama)

Kryoprezervasyon, canlı hücrelerin, dokuların yapılarını koruyarak, uzun süreler saklamak için çok düşük sıcaklıkların kullanılmasıdır. Farklı memeli türleri arasında hücre tiplerine bağlı olarak, donma ve çözünme döngüsü sırasında, hücrelerin, verdikleri tepkilerde ve sağ kalımlarında büyük farklılıklar izlenmiştir.

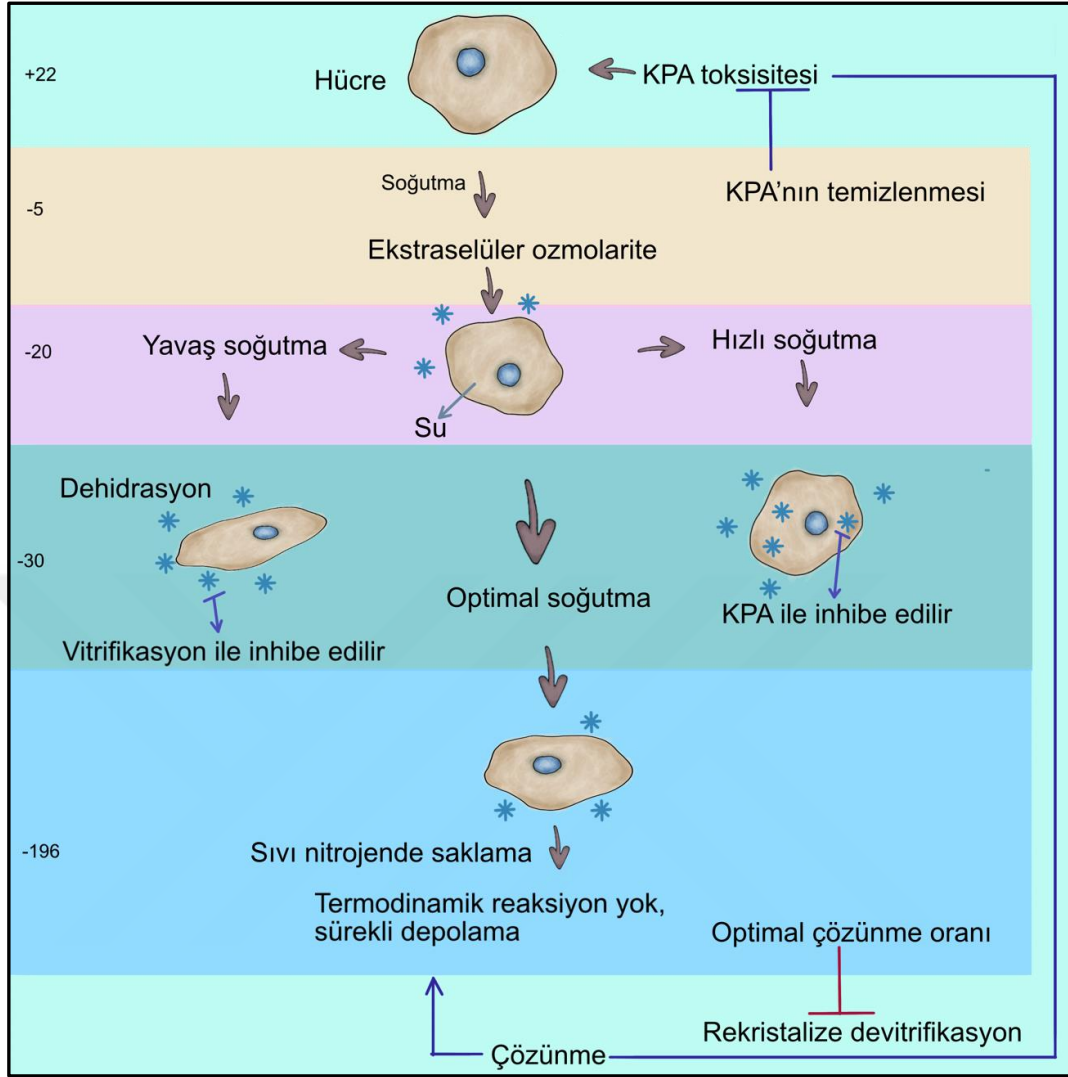
Kryoprezervasyon çeşitleri:

- Dondurma,
- Vitrifikasyon, -hücrenin sıvı bazlı ortamının kristalleşmemiş camsı faza dönüşümü-
- 0°C altında hücrenin donmamış fazı,
- Kuru fazda depolanma'dır.

Genel olarak, memeli hücrelerinin kuru fazda depolanması, disakkarit trehaloz ve amino asitlerin hücre içi bölgeye geçememesinden dolayı kullanılmamaktadır.

Memeli hücrelerinin kryoprezervasyonundaki başlıca adımlar:

1. Kryoprotektan ajanın (KPA) hücre ortamına uygulanması,
2. Hücrelerin depolanacağı soğukluğa getirilmesi,
3. Hücrelerin belirlenen derecede ve sürede saklanması,
4. Kullanılmak üzere hücrelerin çözündürülmesi,
5. Çözünme sonrasında hücre ortamından kryoprotektan ajanın uzaklaştırılması.



Şekil 2.12. Kryoprezervasyonun hücre üzerindeki etkisi ve basamakları (Hücre ortamı suyun donma sıcaklığının altına indirildikçe, ekstrasellüler ortamda buz kristalleri oluşmaya başlar. Buz kristalleri ozmolarite artışı sonucu, hücreden dış ortama su çıkışına neden olur. İdealden daha yavaş soğutma dehidratasyon ile hücre ölümüne, daha hızlı soğutma ise hücre içi buz kristali oluşumu ile hücre zarı parçalanmasına neden olur. Hücre sağ kalımı açısından optimal soğutma protokolünün uygulanması önemlidir).

Spallanzani, mikroskobun keşfinden sonra, 1761’de spermin soğuk hava koşullarına rağmen hareketliliğini koruduğunu gözlemlemiştir. Bu keşifle beraber, kryoprezervasyon alanında canlı dokularda (eritrositler ve spermatozoalar) yapılan araştırmalar, 1800’lerin sonuna doğru giderek artış göstermiştir.

1950’lerde James Lovelock, kryoprezervasyonun, eritrositlerdeki hücre içi sıvıyı anında dondurarak buz kristali oluşumuyla hücrede ozmotik strese neden

olduğunu keşfettiğinde bu alanda büyük bir ilerleme gerçekleşmiştir (73-81). Fakat esas olarak 1963 yılında Mazur (82), hücre ortamındaki sıcaklık değişim hızının, suyun, hücre zarı boyunca hareketini ve dolayısıyla hücre içi donma sürecini kontrol ettiğini gösterdiğinde bahsedilen süreci karakterize etmiştir. Bu iki gelişme ile, kryoprezervasyon işleminin ana hatları daha iyi anlaşılmıştır.

80'li yıllarda, kryoprezervasyon araştırmaları, donma ve çözünme sürecinin gerçekleştiği hızın, hücrelerin hayatta kalmasını belirleyen en önemli faktör olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hem donma hem de çözünme sürecindeki küçük ve yavaş artışların, hücre zarına zarar veren buz kristallerinin oluşumunu engellediği gösterilmiştir.

Kryoprezervasyon için iki yöntem tanımlanmıştır: yavaş dondurma ve vitrifikasyon. Yavaş dondurma, hücre içi buz oluşumunu azaltmak için hücreleri dakikada yaklaşık 1°C azalan şekilde yavaşça soğutur. Bu tekniğin dezavantajı, ozmotik strese ve deformasyona yol açan hücrenin dehidratasyonuna neden olabilmesidir. Vitrifikasyon ise buz kristalleri oluşmadan hızlı soğutmayı içerir. Her iki yöntem de soğutmadan önce yağ dokusuna kryoprotektan eklenmesini gerektirir. Bu adım hücrelerin optimal dondurularak korunmasında kritik bir adımdır.

Kryoprotektan ajanların kullanımı ilk olarak 1940'ların sonlarında araştırmacıların hücre ortamı olarak 'gliserol' kullanmasının, -70°C sıcaklıkta spermatozoanın sağ kalımını arttırdığını keşfettikleri zaman gerçekleşmiştir. Kryoprotektanlar ikiye ayrılırlar; hücre içine geçebilenler (DMSO, gliserol, 1,2 propanediol) ve hücre içine geçemeyenler (2-metil-2,4-pentanediol, polimerler, hidroksietil nişasta). DMSO, AKKH'lerin ve yağ dokusunun kryoprezervasyonunda en yaygın kullanılan kryoprotektandır. Çözücü aktivitesi sayesinde hücre zarını kolayca geçebilirken, hücre içi buz kristali oluşumunu engeller. Dokuyu donmanın etkilerinden korur, çözünme işlemi sırasında maksimum hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur. Fakat, DMSO oda sıcaklığında hücreler için toksik bir ajandır ve hücrelerden uzaklaştırmak için saklanan doku çözündükten sonra yıkanarak ajandan arındırılması gerekir. Günümüzde, halen daha ideal kryoprotektan ajan için fikir birliği bulunmamaktadır.

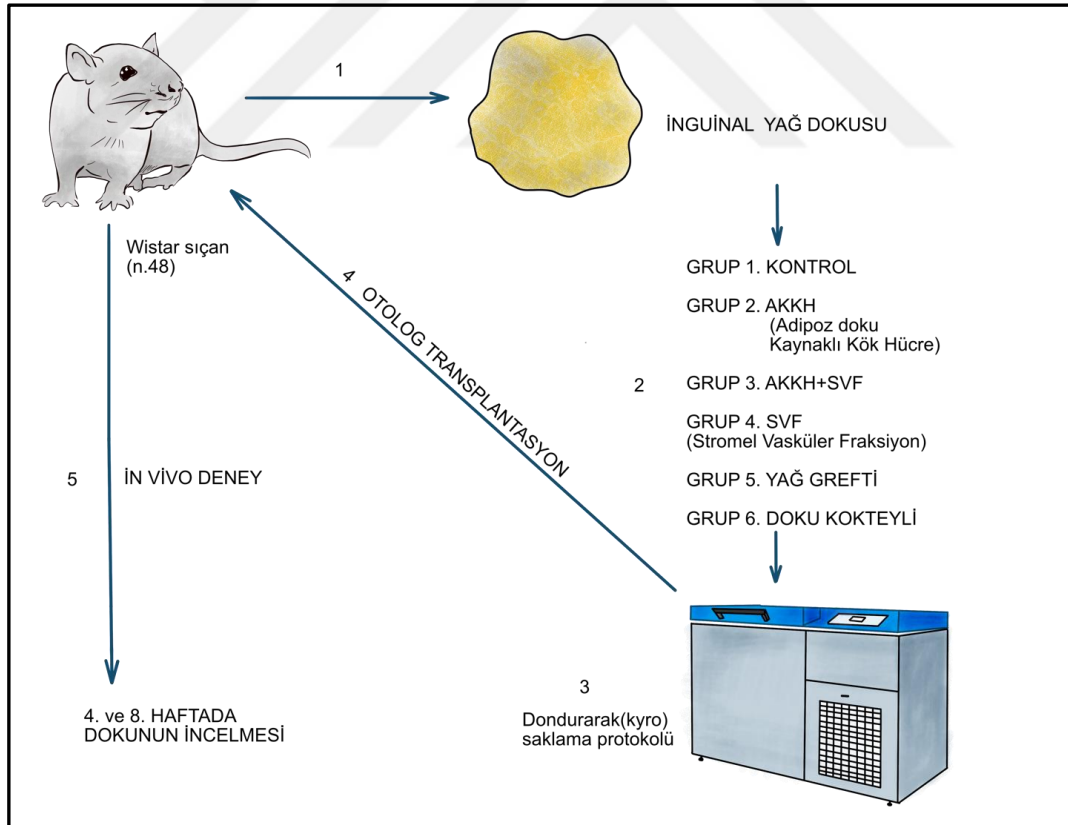
Kök hücre temelli tedaviler yaygın hale geldikçe, laboratuvarlarda, hücrelerin ve dokuların daha iyi şekilde üretimine, daha iyi saklama koşullarında tutulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Kryoprezervasyon, bu amaçla geçmişte olduğu kadar günümüzde ve gelecekte gelişime açık, talep edilen bir işlem olacaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Etik Kurul

T.C. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan B.30.2.AKD.0.05.07.00/54 sayılı etik kurul onayı (Ek-1) doğrultusunda, çalışmamızda ağırlıkları 200- 500 gr arasında değişkenlik gösteren Wistar cinsi 48 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Tüm hayvanlar CITIES Yönergesine göre bakımları ve beslenmeleri yapılmış olup; gündüz ve gece sikluslarına uyacak şekilde aydınlık ve karanlık maruziyetleri sağlanmıştır. Çalışmada herhangi bir zaman diliminde anestezi indüksiyonu sonrasında exitus olan denekler çalışmadan çıkarılmıştır. Tüm hayvanlara 2 defa cerrahi işlem uygulanmıştır. İlk cerrahi işlem inguinal yağ dokusunun çıkarılması olup, ikinci cerrahi işlem ise her sıçanın kendi dokusundan elde edilen materyalin kontralateral inguinal yağ dokusuna nakledilmesidir.



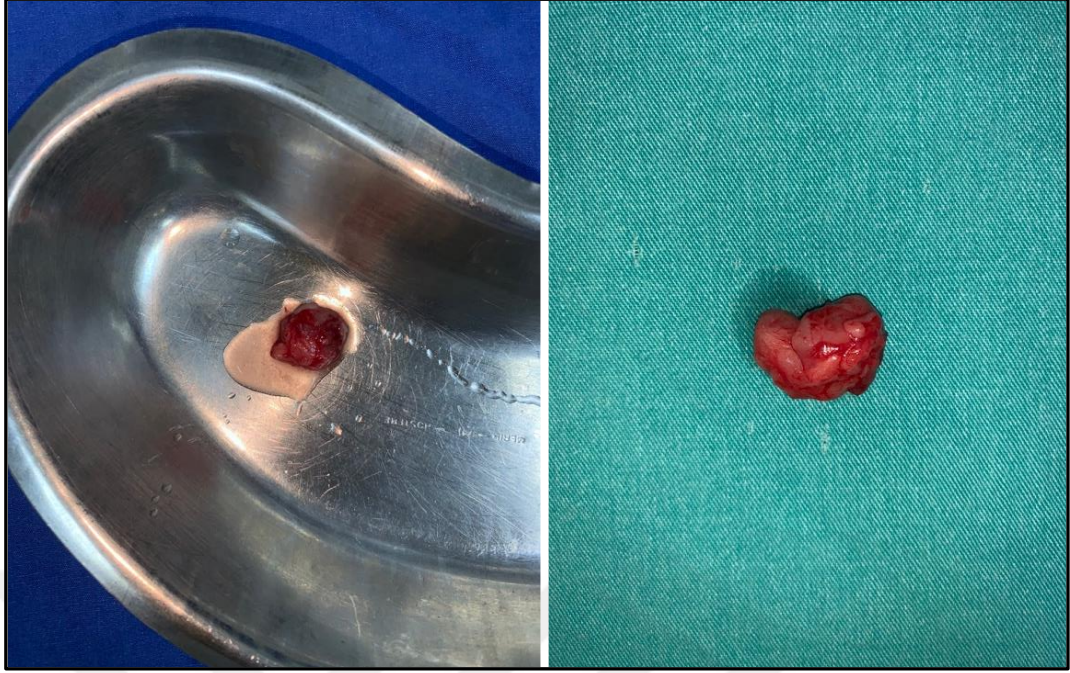
Şekil 3.1. Çalışmanın genel şeması

Çalışmanın Basamakları;

- a. Deneklerin sol inguinal yağ dokusunun çıkarılması,
- b. Yağ dokusundan AKKH, SVF, yağ grefti ve doku kokteyli elde edilmesi,
- c. Dondurarak saklama (kryoprezervasyon) protokolünde 3 ay saklanması,
- d. Dokuların ve hücrelerin kullanılmak üzere hızlıca çözündürülmesi,
- e. Çözünen materyalin kontralateral inguinal yağ dokusuna nakledilmesi,
- f. 4. ve 8. haftada gruplarda, morfolojik ve immünohistokimyasal değişikliklerin incelenmesi.

3.2. İnguinal Yağ Dokusunun Çıkarılması

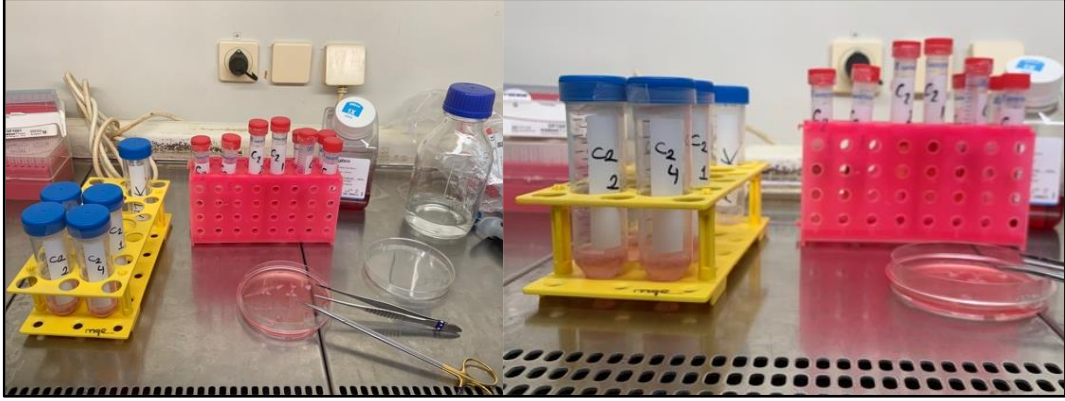
Deneklere uygulanacak işlem için 75 mg/kg dozda ketamin ve 15 mg/kg dozda ksilazin karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanan genel anestezi sonrası sol inguinal bölge tıraşlanmış ve uygun steril saha izolasyonu yapılmıştır. Sıçanların sol inguinal ligaman 0.5 cm inferolateralinden yapılan, ligamana paralel 1.5 cm'lik insizyonla inguinal yağ dokusuna ulaşılmıştır. Bu yağ dokusunu besleyen superficial inferior epigastrik arter ve ven bipolar koter yardımı ile koagüle edilerek inguinal yağ dokusu çıkarılmıştır. İşlem esnasında minimal kanama olmasına özen gösterilmiştir. Çıkarılan yağ dokusu, sıçan numarası ile uyumlu şekilde numaralandırılmış transfer solüsyonları ile AKKH, SVF elde edilmek üzere laboratuvara nakledilmiştir. Doku kokteyli ve yağ grefti hazırlanması eksizyon sonrası aynı ortamda gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olan Grup 1'de ise cerrahi süreci ve işlemi taklit etmek amacı ile sol inguinal yağ dokusu eksizyonları yapılmış ama çıkarılan doku herhangi bir işleme tabi tutulmamıştır. Tüm cilt insizyonları 4.0 ipek dikiş materyaliyle basit suture tekniği ile onarılmıştır. Tüm hayvanlar ilk cerrahi sonrasında ayrı kafeslere yerleştirilerek 500 mg parasetamol – 500 cc su karışımı olacak şekilde içme sularına analjezik konulmuştur. Otofajiyi önlemek amacı ile rodentlere uygun Elizabeth Yakalığı takılıp, yakalık postoperatif üçüncü günde çıkarılmıştır.



Şekil 3.2. Çıkarılan inguinal yağ dokusunun görüntüsü

3.3. Stromal Vasküler Fraksiyon Eldesi

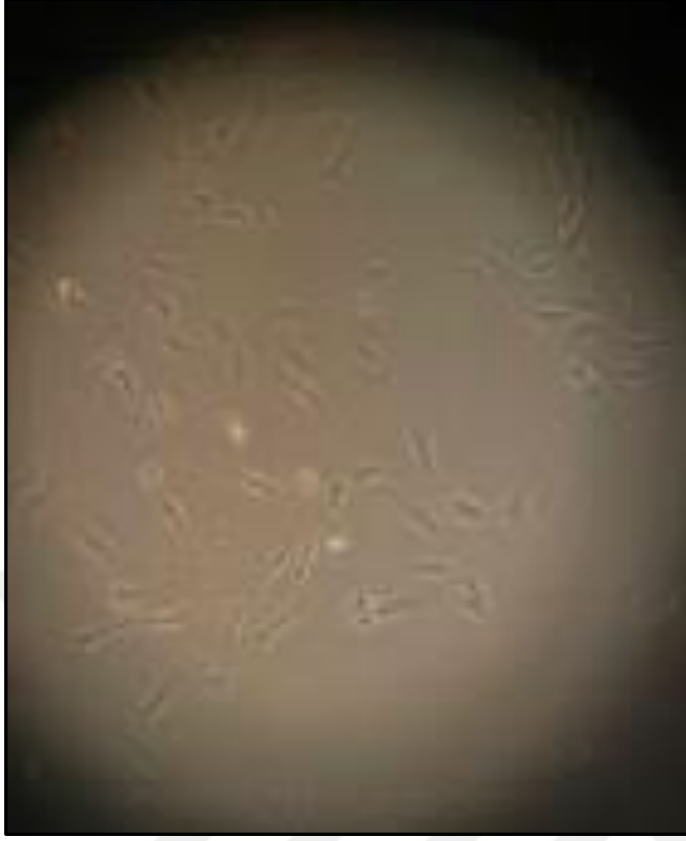
Cerrahi yolla elde edilen inguinal yağ dokusu antibiyotik içerikli transfer besiyeri ile laboratuvar ortamına taşındı. Laboratuvar ortamında steril kabin içerisinde yağ yastıkçıları/fat-padler cerrahi makas yardımıyla mekanik parçalanmaya uğratıldı. 1X PBS ile yıkanan makas ile mekanik parçalanmaya tabii tutulan yağ dokusu %0,75 Kollajenaz Tip 1 ile 37°C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 mikronluk meshden geçirilen yağ dokusu kimyasal parçalanmanın ardından ikinci kez mekanik parçalanmaya tabii tutuldu. Üzerine %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek 1600 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemine tabii tutuldu. Kimyasal hücre ayrışması sonucu elde edilen tüp içeriği santrifigasyon işlemi ile gradient ayrışmasına uğratılmış olundu. 50 ml’lik falkon tüp içerisinde santrifüj sonrası oluşan pellet Stromal Vasküler Fraksiyon olarak kullanıldı.



Şekil 3.3. Steril kabin içerisinde, komponentlerin elde edilmesi için yağ dokusunun hazırlanması

3.4. Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu

Cerrahi yolla elde edilen yağ yastıkçıkları antibiyotik içerikli transfer besiyeri ile laboratuvar ortamına taşındı. Laboratuvar ortamında steril kabin içerisinde yağ yastıkçıkları/fat-padler cerrahi makas yardımıyla mekanik parçalanmaya uğratıldı. 1X PBS ile yıkanan makas ile mekanik parçalanmaya tabii tutulan yağ dokusu %0.75 Kollajenaz Tip 1 ile 37°C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 mikronluk meshden geçirilen yağ dokusu kimyasal parçalanmanın ardından ikinci kez mekanik parçalanmaya tabii tutuldu. Üzerine %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek 1600 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemine tabii tutuldu. Kimyasal hücre ayrışması sonucu elde edilen tüp içeriği santrifigasyon işlemi ile gradient ayrışmasına uğratılmış olundu. 50 ml’lik falkon tüp içerisinde santrifüj sonrası oluşan pellet Stromal Vasküler Fraksiyon %10 FBS içeren DMEM ile süzülerek petrilere ekildi ve 37°C’de %5’lik CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı. İki gün sonra tutunan hücrelerin (adipoz doku kaynaklı kök hücre) gün ardışık besiyeri değiştirilerek çoğalması sağlandı. İki kere %0.25’lik tripsin solüsyonu ile pasajlanan hücrelerin pasaj sayısı üçü bulduğunda nakledilecek hücre sayısının elde edilmesi sağlandı. Gerekli sayıya ulaşan hücreler (1x100000 hücre/100 ul/sıçan) 1X HBSS (Sigma, Cat: 55021C) içerisinde çözülerek insülin iğnelerine ekilerek enjekte edilebilir hale getirildi.



Şekil 3.4. Elde edilen AKKH'nin ışık mikroskobu altında görüntüsü

Kök Hücre Eldesinde Kullanılan Gereç ve Yöntemler:

1. Hücre Kültürü

Hücrelerin tamamı L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Dana Serum (FBS-Biochrom cat. No: S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfotersin B (BI-03 033 113) ve gentamisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modifeid Eagle Medium – Biochrom FG0415) içinde monolayer kültürler %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

2. PBS Hazırlanması

5X PBS: 40 gr NaCl, 1gr KCl, 7,2 gr Na² HPO₄, 1,2gr KH₂ PO₄ tartılıp, 800 ml bidistile su içerisinde çözöldü. NaOH ve HCl ile pH 7.4'e ayarlandı. Hacim 1 litreye tamamlandı ve otoklavlandı. 1X PBS: 200 ml, 5X PBS, 800 ml bidistile su ile 1 litreye tamamlandı.

3. %0.75 Kollajenaz Tip 1 Solüsyonunun Hazırlanması

Toz şeklinde ticari olarak alınan Kollajenaz Tip 1 (Sigma; Cat:C3867) kimyasalı 1 X PBS içerisinde çözündürülerek w/v oranı %0.75 olacak şekilde hazırlandı ve kullanım zamanına kadar -20°C’de saklandı.

4. AKKH Karakterizasyonunun İmmünofloresan ile Doğrulanması

Lameller, 5 dakika boyunca poli-L-lisin (No. P8920; Sigma) ile kaplandı ve ardından ultraviyole ışıkla sterilize edildi. Steril lameller daha sonra 6 delikli plakalara yerleştirildi ve her alana kök hücreler ekildi. Kök hücre biyobelirteçlerini göstermek için immünofloresan yöntemi uygulandı. Deliklerdeki hücre ortamı çıkarıldı, ardından bağlanan hücrelerin olduğu lameller 1 x PBS ile yıkandı. Hücreler daha sonra %4 paraformaldehit ile sabitlendi ve deliklere bloke edici solüsyon (1.5 g bovin serum albümini, 0.134 g amonyum klorür, 0.375 g glisin ve 50 mL PBS) ilave edildi. Birincil antikor (SantaCruz, Santa Cruz, CA, ABD’den CD29 [sc-9970]; Abcam, Cambridge, MA, ABD’den CD90 [ab225]; Abcam’dan CD105 [ab11414]; Abcam’dan CD45 [ab10558]; ve CD34 [ab81289]) Abcam’dan lameller üzerine damlatıldı ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra ikincil antikor (ab150077, Abcam’dan ab150117) lamellerin üzerine damlatıldı. Sekonder antikorlarla inkübasyondan sonra, lameller yıkandı ve DAPI (No. H-1200; Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, ABD) ile inkübe edildi. Son adım için, lameller lamaların üzerine ters çevrildi ve bir floresan mikroskobu altında analiz gerçekleştirildi.

3.5. Doku Kokteyli Hazırlanması

Sol inguinal yağ dokusunun eksizyonu sırasında, insizyon hattının etrafından dermis eksize edilmiştir. Ayrıca grasilis ve vastus medialis kaslarının fasyaları da eksizyon materyaline dahil edilmiştir. Elde edilen dokular 11 no’lu bisturi yardımıyla mikrogreft haline getirilmiştir ve sonuçta 0.5 cc doku kokteyli elde edilmiştir. Donma protokolü uygulanması için transfer solüsyonlarında laboratuvara nakledilmiştir.



Şekil 3.5. Doku kokteylinin hazırlanması; **a.** *İnguinal yağ dokusu ile çevresinden çıkarılan fasya ve dermisin 11 nolu bistüri yardımıyla greft haline getirilmesi, b.* 0.5cc enjektörlerde doku kokteyli

3.6. Yağ Greftinin Hazırlanması

Çıkarılan inguinal yağ dokusu, 2.5 cc enjektörlere konulmuştur. Boş bir 2.5 cc enjektör daha 3'lü kateter musluğu ile dokunun olduğu enjektöre bağlanmış ve enjektörden enjektöre aktarımı tekrarlayan şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu sayede uygulanan basınç nedeniyle yağ dokusunda parçalanma olmuş, istenilen likefaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yağ greftinin 0.5 cc'si transfer solüsyonlarında donma protokolü uygulanması için laboratuvara nakledilmiştir.



Şekil 3.6. İnguinal yağ dokusunun üçlü musluktan geçirilerek basınç oluşturulmasıyla parçalanması sonucu yağ grefti elde edilmesi

3.7. Dondurarak Saklama (Kryoprezervasyon) Protokolü

Her bir gruptan elde edilen komponent, kliniğimizce literatür göz önünde bulundurularak geliştirilen dondurma protokolüne tabi tutulmuştur. Öncelikle her bir doku %10 DMSO+FBS içerisindeyken 43°C’de %5 CO₂ ile 1 saat süreyle ısı şoku uygulaması gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, 37°C’lik hücre kültürü inkübatörlerinde 3 saat dinlendirilmeye bırakılmış ve ilk önce 4°C’de 10 dakika bekletilerek sonrasında her dakika 1°C soğutulacak şekilde depolama ısısı olan -80°C’de 3 ay süresince saklanmıştır. Çözünme zamanında materyaller, 37°C’lik sıcak su banyosunda hızlıca çözündürülmüşlerdir.

3.8. Gruplar ve AKKH, SVF, Yağ Grefti, Doku Kokteylinin Verilmesi

48 adet Wistar sıçan her grupta 8’er adet denek olacak şekilde 6 gruba bölünmüştür. Genel anestezileri gerçekleştirilerek sağ inguinal bölge tıraşlanmış ve uygun steril saha izolasyonu yapılmıştır. Sıçanların sağ inguinal ligaman 0.5 cm inferolateralinden, ligamana paralel 3 ila 4 mm’lik insizyon ile inguinal yağ dokusu ekspozite edilmiş ve 1 cc’lik enjektörlerde nakledilecek materyaller, inguinal yağ kapsül fasyasını geçerek, yağ dokusuna implante edilmiştir. İnsizyon hattı 1 adet 4.0 ipek ile basit sütür onarımı gerçekleştirilmiştir. Denekler işlem sonrasında ayrı kafeslere yerleştirilmiş; 500 mg parasetamol – 500 cc su karışım oranı ile analjezileri sağlanmıştır.

Grup A. Kontrol: Sadece inguinal yağ dokusunun çıkarıldığı ve kontralateral inguinal yağ dokusuna uygulama sırasında 0.5cc Serum Fizyolojik (%0.09) enjekte edilen grup (n=8).

Grup B. AKKH: Bir taraftaki inguinal yağ dokusunun tamamından elde edilen AKKH, dondurma protokolünde 3 ay bekletilmesi sonrasında çözündürülerek kontralateral inguinal yağ dokusuna 0.5cc enjekte edilen grup (n=8).

Grup C. SVF: Bir taraftaki inguinal yağ dokusunun tamamından elde edilen SVF’nun, dondurma protokolünde 3 ay bekletilmesi sonrasında çözündürülerek kontralateral inguinal yağ dokusuna 0.5cc enjekte edilen grup (n=8).

Grup D. AKKH + SVF: Bir taraftaki inguinal yağ dokusunun yarısından elde edilen AKKH miktarı ile diğer yarısından elde edilen SVF'nun birleştirilerek, dondurma protokolünde 3 ay bekletilmesi sonrasında çözündürülüp beraber kontralateral inguinal yağ dokusuna 0.5cc enjekte edilen grup (n=8).

Grup E. Yağ Grefti: Bir taraftaki inguinal yağ dokusunun tamamından mekanik parçalanmayla elde edilen 0.5 cc yağ greftinin dondurma protokolünde 3 ay bekletilmesi sonrasında çözündürülerek kontralateral inguinal yağ dokusuna 0.5cc enjekte edilen grup (n=8).

Grup F. Doku Kokteyli: Bir taraftaki inguinal yağ dokusunun tamamının cerrahi işlem sırasında kesi bölgesinden alınan dermis ve fasya eklenerek mekanik parçalanma ile oluşturulan 0.5 cc doku kokteylinin dondurma protokolünde 3 ay bekletilmesi sonrası çözündürülerek kontralateral inguinal yağ dokusuna 0.5cc enjekte edilen grup (n=8).

3.9. Dokuların Çıkarılması

Her grubun önce bir yarısı dokuları incelenmek üzere 4. Haftada, sonra kalan yarısı ise 8. Haftada sakrifiye edilmiş ve komponentlerin nakledildiği inguinal yağ dokusu, inguinal ligamana paralel insizyon yapılarak ekspozite edilmiş ve çıkarılmıştır. Çıkarılan materyal özel taşıma solüsyonu içerisinde patolojik ve immünohistokimyasal inceleme amacıyla laboratuvara nakledilmiştir.

3.10. Dokuların Morfolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemesi

Çalışmaya dahil edilen deneklerin Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Arşivi'nde bulunan parafin bloklarının 4 mikronluk kesitleri hematoxilen eozin (H&E) ile boyanarak, Patoloji Anabilim Dalının mikroskopları ile (Olimpus) iki Patolog tarafından incelenerek çalışma parametreleri açısından değerlendirildi. Aşağıda, maddeler halinde basamakları belirtildiği şekilde immünohistokimya prosedürü uygulandı;

- İşaretlenen preparatların ait oldukları bloklardan immünohistokimyasal değerlendirme için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim

Dalı'na ait mikrotom cihazları kullanılarak, pozitif şarjlı lama 5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

- Alınan kesitler 50°C'de hibridizer cihazda bir gece boyunca bekletildi.
- Kesitlere, iki seri halinde 10'ar dakika ksilol, 5 dakika %100'lük alkol, 5 dakika %85'lik alkol, 5 dakika da %75'lik alkol ile muamele edildi ve deparafinizasyon işlemi yapıldı.
- Deparafinize edilen kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitler, 90°C'ye kadar ısıtılmış uygun antijen retrieval solüsyonda önce 20 dakika süre ile sonra iki defa 5'er dakika süre ile kaynatıldı.
- Kaynatma işleminden sonra, kesitler 30 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.
- Soğuma işlemi bittikten sonra kesitler tekrar distile su ve PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Kesitler endojen peroksit blokajının yapılması için hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonunda 1 dakika bekletildi.
- Peroksit ile muamele sonunda tekrar distile su ve PBS solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Boyama için kullanılacak olan primer antikor VEGF antikor poliklonal 1/100 oranında ve Ki-67 poliklonal 1/100 oranında dilüe edildi.
- Uygun şekilde dilüe edilen VEGF ve KI-67 primer antikorları kesitlerin üzerine damlatıldı ve kesitler nemli ortamda 1 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda kesitler üzerine sekonder antikor damlatıldı ve 10 dakika beklendi.
- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler üzerine HRP (Streptavidin Peroksidaz) damlatılarak 10 dakika beklendi.
- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler üzerine DAB (Diamino Benzidine Solüsyonu) solüsyonu damlatılarak 2 dakika daha beklendi.
- Bekleme süresinin sonunda kesitler tekrar distile su ve PBS ile yıkandı.
- Kesitler şale içine alınarak Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika bekletildi.

- Süre sonunda çeşme suyunda yıkama yapıldı.
- Kesitler, %80 alkolde 5 dakika, %96 alkolde 5 dakika, %100 alkolde 5 dakika ve iki seri halinde ksilolde 5'er dakika daha bekletilerek dehidratasyon işlemi yapıldı.
- Dehidratasyonun tamamlanmasının ardından kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi ve her bir antikor için aşağıda belirtildiği şekilde skorelama yapıldı.

3.10.a. Boyanma ve Skorelama Kriterleri

VEGF için: Sitoplazmik ve membranöz boyanma varlığı, parafin kesitteki nakil edilen doku damar yapılarının alanının yüzde olarak boyanma oranı değerlendirildi. 6 adet x200 büyütme alanında damar sayıldı ve ortalaması alındı.

Ki67 için: Nükleer boyanma varlığı, parafin kesitteki nakil edilen dokuda proliferen hücreler yüzde olarak boyanma oranı değerlendirildi. 10 adet x400 büyütme alanında sayıldı ve ortalaması alındı.

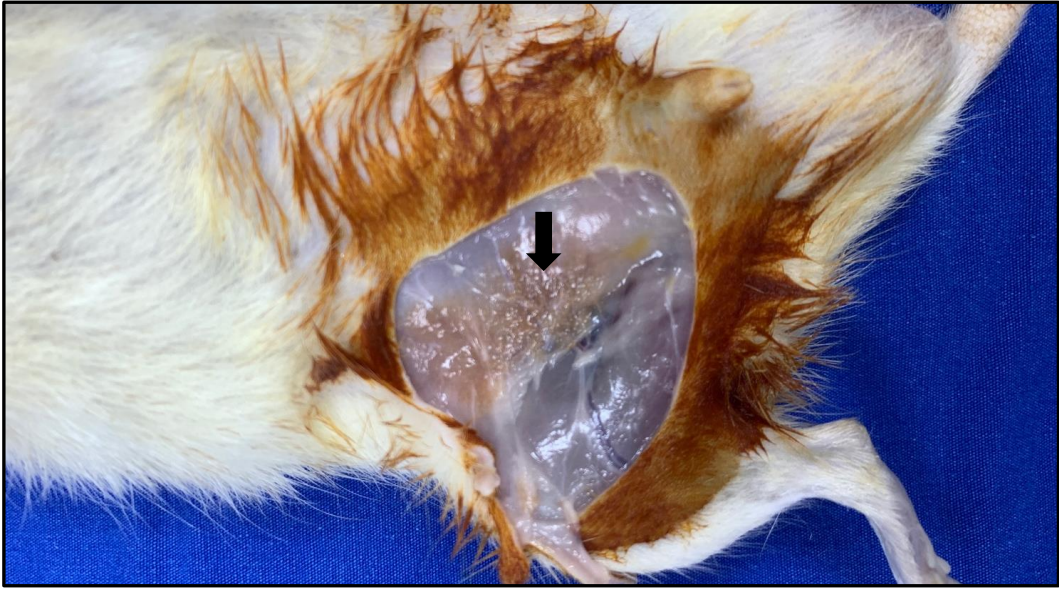
3.11. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi İstatistik Danışma Merkezi tarafından SPSS Paket Programı v20 (IBM, ABD) ile yapıldı. Çalışmada elde edilen veriler, ortalama±standart sapma ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grupların karşılaştırılmasında One-way ANOVA kullanılmış olup, bu yöntem ve grafiklerin eldesi için Graghpad Prism (Ver. 8) kullanılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda 0,05'ten daha düşük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Görsel ve Morfolojik Değerlendirilmesi

Gruplar arasında inguinal yağ dokusu çıkarılırken yapılan değerlendirmelerde volüm ve ağırlık açısından majör farklılık izlenmemiştir (Bkz. Çizelge 4.6). AKKH ve SVF gruplarında diğer gruplarda olmayan, yeni adipoz yapılar izlenmiştir.



Şekil 4.1. İnguinal yağ dokusu üzerinde yeni oluşumu izlenen adipoz yapılar (Siyah ok)

Işık mikroskobu ile yapılan, H&E boyama ile gerçekleştirilen değerlendirmelerde grupların yağ dokusunun histolojik ve ultrastrüktürel yapısının korunduğu izlenmiştir. Grup B, C ve D’de adipositlerin tüm alanlarda doğal şekillerini korudukları izlenmiştir. Aynı zamanda kesitlerde yeni, küçük adiposit oluşumları (adipoblastlar) ve yeni damar oluşumları görülmüş olup; inflamatuvar hücre sayısında belirgin artış fark edilmiştir.

Grup E ve F’de, kesitlerde hücre yoğunluğunun ve miktarının diğer gruplara oranla daha da fazla olduğu izlenmiştir. Ayrıca bu kesitlerde, çoklu adiposit ölümü nedeniyle görebileceğimiz büyük yağ vakuelleri belirgin olup, Grup A, B, C, D’den farklı olarak Grup E ve F’de nekroz izlenmiştir. Makrofajların, şiddetli ve uzayan inflamasyona cevaben oluşturdukları dev hücreler de yine diğer gruplardan farklı olarak ilk, E ve F’de görülmüştür.

Çizelge 4.1. VEGF ve Ki67 immünohistokimyasal boyamaları ile H&E boyamada incelenen ödem, yangı, nekroz ve fibrozis değerlendirmesinin deneklerde ayrıntılı gösterim tablosu

Denek No.	VEGF	Ki67	Ödem	Yangı	Nekroz	Fibrozis
A1-1	2	1	+	+	-	+
A1-2	3	3	++	+	-	++
A1-3	1	1	+	+	-	+
A1-4	2	1	+	+	-	+
A2-1	2	1	+	+	-	+
A2-2	2	1	+	+	-	+
A2-3	2	1	+	+	-	+
A2-4	2	1	+	+	-	+
B1-1	6	1	+	+	-	++
B1-2	6	2	++	+	-	++
B1-3	5	3	++	+	-	++
B1-4	3	2	++	+	-	++
B2-1	1	3	++	+	-	+
B2-2	5	3	+	++	-	++
B2-3	6	3	++	++	-	+
B2-4	6	2	++	++	-	+
C1-1	6	2	++	++	-	++
C1-2	6	2	++	+	-	++
C1-3	6	1	++	++	-	+
C1-4	7	2	++	++	-	+
C2-1	2	3	++	+	-	++
C2-2	6	3	++	+	-	++
C2-3	5	2	++	+	-	++
C2-4	4	2	++	++	-	++
D1-1	6	3	+	+	-	+
D1-2	6	3	+	+	-	++
D1-3	6	2	++	+	-	+
D1-4	6	3	++	+	-	++
D2-1	4	4	++	+	-	++
D2-2	6	3	++	++	-	++
D2-3	6	3	++	+	-	++
D2-4	7	6	++	+	-	++
E1-1	8	6	+++	+++	+	+++
E1-2	0	0	-	-	-	-
E1-3	10	5	+++	+++	+	+++
E1-4	8	7	+++	+++	+	+++
E2-1	9	4	+++	+++	+	+++
E2-2	8	6	+++	+++	+	+++
E2-3	9	6	+++	+++	+	+++
E2-4	8	7	+++	+++	+	+++

Çizelge 4.1 (Devam). VEGF ve Ki67 immünohistokimyasal boyamaları ile H&E boyamada incelenen ödem, yangı, nekroz ve fibrozis değerlendirmesinin deneklerde ayrıntılı gösterim tablosu

Denek No.	VEGF	Ki67	Ödem	Yangı	Nekroz	Fibrozis
F1-1	6	4	++	+	+	+++
F1-2	0	0	-	-	-	-
F1-3	7	3	++	+	+	++
F1-4	5	6	+++	+++	+	++
F2-1	8	5	+++	+++	+	+++
F2-2	6	4	+++	+++	+	+++
F2-3	10	6	+++	+++	+	+++
F2-4	10	6	+++	+++	+	+++

VEGF değerlendirmesi için x200 büyütme ile 6 alanda sayılan boyanan yeni damar oluşumlarının ortalaması alınmıştır. Ki67 değerlendirmesi için x400 büyütme ile 10 alanda sayılan boyanan proliferen hücrelerin ortalaması alınmıştır. Ödem, yangı, fibrozis ve nekroz için her iki patoloğun subjektif değerlendirmeleri baz alınmıştır (+1,+2,+3,+4 derecelendirme) (*Kırmızı boyanan alanlar exitus denekleri göstermektedir*).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

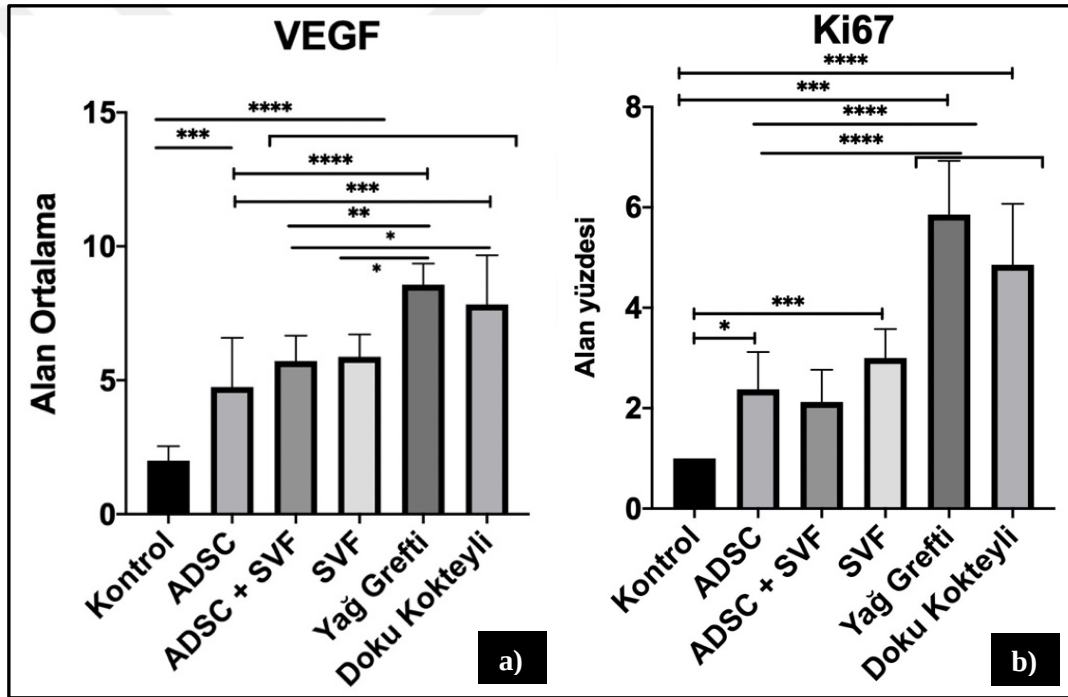
4.2.a. VEGF ile Anjiogenez Değerlendirmesi

Çizelge 4.2.a'da görebileceğimiz üzere, VEGF ile değerlendirdiğimiz yeni damar yapılarını, grupların hepsinde kontrol grubuna göre daha fazla boyandığını bulduk ($p<0.0001$). Grup B, C, D arasında farklılık izlenmezken, kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklılıkları mevcuttu ($p<0.0001$) Bu sonucumuzu B, C ve D gruplarını, H&E incelemede gördüğümüz yeni damar oluşumlarıyla da desteklemiş olduk. Yağ grefti ve doku kokteyli grupları VEGF ile diğer tüm gruplara göre daha yüksek boyanma gösteren gruplar oldular; birbirleri arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$). Bu gruplar üzerinde H&E ile yaptığımız incelemelerimizde hücre yoğunluğunun şiddetli inflamasyona bağlı olarak çok fazla ve düzensiz yapıda olduğunu; fakat bu durumun yeni damar ve doku oluşumuna katkıda bulunmadığını gördük.

4.2.b. Ki67 ile Proliferasyon Değerlendirmesi

Çizelge 4.2.b.'de görebileceğimiz üzere Ki67 ile değerlendirdiğimiz proliferasyon, kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.0001$). Birbirleriyle idantik olarak, VEGF ile yaptığımız inceleme de bu gruplarda beklenen düzeyin üzerindeydi. Grup B, C, D'de Ki67 boyaması,

kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı bulunurken ($p<0.0001$) grupların kendi aralarında yapılan karşılaştırmada herhangi bir farklılık izlenmedi. H&E ile yapılan değerlendirmede B, C, D gruplarının kesitlerinde yeni adiposit oluşumları ve damar oluşumları ile düzenli doku yapısı izlenmiştir. Bu iki bulgu ışığında Ki67 boyamasının yüksek olması anlamlıdır. Ki67 boyanmasının diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında en fazla yağ grefti ve doku kokteyli gruplarında olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Bu gruplarda H&E ile yaptığımız incelemelerde yeni doku ve damar oluşumunun B, C, D grubuna kıyasla daha az olduğu boyanma artışının şiddetli inflamasyona sekonder hücre artışına bağlı geliştiği görülmüştür.



Çizelge 4.2. VEGF ve Ki67 boyamasının gruplar arasında ortalamalarının grafiksel gösterimi; **a)** VEGF gruplar arası dağılımı, **b)** Ki67 gruplar arası dağılımı

Çizelge 4.3. VEGF istatistiksel verilerinin değerlendirilmesi

	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6	Kontrol vs. ADSC	-2.750	-4.577 to -0.9234	Yes	***	0.0008
7	Kontrol vs. ADSC + SVF	-3.714	-5.605 to -1.824	Yes	****	<0.0001
8	Kontrol vs. SVF	-3.875	-5.702 to -2.048	Yes	****	<0.0001
9	Kontrol vs. Yağ Grefti	-6.571	-8.462 to -4.681	Yes	****	<0.0001
10	Kontrol vs. Doku Kokteyli	-5.833	-7.806 to -3.860	Yes	****	<0.0001
11	ADSC vs. ADSC + SVF	-0.9643	-2.855 to 0.9264	No	ns	0.6477
12	ADSC vs. SVF	-1.125	-2.952 to 0.7016	No	ns	0.4488
13	ADSC vs. Yağ Grefti	-3.821	-5.712 to -1.931	Yes	****	<0.0001
14	ADSC vs. Doku Kokteyli	-3.083	-5.056 to -1.110	Yes	***	0.0005
15	ADSC + SVF vs. SVF	-0.1607	-2.051 to 1.730	No	ns	0.9998
16	ADSC + SVF vs. Yağ Grefti	-2.857	-4.810 to -0.9044	Yes	**	0.0012
17	ADSC + SVF vs. Doku Kokteyli	-2.119	-4.152 to -0.08659	Yes	*	0.0367
18	SVF vs. Yağ Grefti	-2.696	-4.587 to -0.8057	Yes	**	0.0016
19	SVF vs. Doku Kokteyli	-1.958	-3.931 to 0.01463	No	ns	0.0527
20	Yağ Grefti vs. Doku Kokteyli	0.7381	-1.294 to 2.771	No	ns	0.8825

Çizelge 4.4. Ki67 istatistiksel verilerin değerlendirilmesi

	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	Kontrol vs. ADSC	-1.375	-2.621 to -0.1292	Yes	*	0.0232
	Kontrol vs. ADSC + SVF	-1.125	-2.371 to 0.1208	No	ns	0.0968
	Kontrol vs. SVF	-2.000	-3.287 to -0.7134	Yes	***	0.0005
	Kontrol vs. Yağ Grefti	-4.857	-6.144 to -3.571	Yes	****	<0.0001
	Kontrol vs. Doku Kokteyli	-3.857	-5.144 to -2.571	Yes	****	<0.0001
	ADSC vs. ADSC + SVF	0.2500	-0.9535 to 1.454	No	ns	0.9886
	ADSC vs. SVF	-0.6250	-1.871 to 0.6208	No	ns	0.6632
	ADSC vs. Yağ Grefti	-3.482	-4.728 to -2.236	Yes	****	<0.0001
	ADSC vs. Doku Kokteyli	-2.482	-3.728 to -1.236	Yes	****	<0.0001
	ADSC + SVF vs. SVF	-0.8750	-2.121 to 0.3708	No	ns	0.3054
	ADSC + SVF vs. Yağ Grefti	-3.732	-4.978 to -2.486	Yes	****	<0.0001
	ADSC + SVF vs. Doku Kokteyli	-2.732	-3.978 to -1.486	Yes	****	<0.0001
	SVF vs. Yağ Grefti	-2.857	-4.144 to -1.571	Yes	****	<0.0001
	SVF vs. Doku Kokteyli	-1.857	-3.144 to -0.5705	Yes	**	0.0014
	Yağ Grefti vs. Doku Kokteyli	1.000	-0.2866 to 2.287	No	ns	0.2068

4.3. Grupların 4. ve 8. Hafta Karşılaştırılmaları

Her bir gruptan rastgele seçilen 4 denek, nakil sonrası 4. haftada değerlendirilmeye alınmış olup 8. hafta sonunda da grupların geri kalan denekleri değerlendirmiştir (Çizelge 4.5).

Grup A, B, C ve D’de VEGF, Ki67 boyanmalarında, haftalar arasında belirgin farklılık yok iken; E ve F gruplarında 8. haftada, 4. haftaya göre VEGF ve Ki67 boyamalarında artış izlenmiştir. H&E ile yapılan incelemelerle korele olarak, kesitlerde inflamatuvar hücre sayısı da bu gruplarda haftalara göre fazladır. Grup E

ve F’de ödemin, yangının, nekrozun ve fibrozisin skorlamasında haftalar arasında belirgin bir farklılık izlenmemiştir.

Çizelge 4.5. Grupların 4. ve 8. hafta arasındaki dokularında oluşan farklılıkların sayısal olarak karşılaştırılması

Gruplar	Hafta	VEGF	Ki67	Ödem	Yangı	Nekroz	Fibrozis
A	4.	2	1.5	1.25	1	0	1.25
	8.	1.75	1	1	1	0	1
B	4.	4.5	2.25	1.5	1	0	1.75
	8.	5	2.5	2	2	0	1.5
C	4.	5	2.5	2	1.25	0	2
	8.	5.5	1.75	2	1.75	0	2
D	4.	5.5	3.25	1.5	1.25	0	1.75
	8.	6.25	3.5	2	1	0	1.75
E	4.	8.3	5.3	3	3	1	3
	8.	8.75	6.25	3	3	1	3
F	4.	6.6	4.3	2.6	2.3	1	3
	8.	8	5.25	2.75	2.5	1	2.5

Çizelge 4.1.’de belirtilen değerlerin, 4. haftada her grupta sakrifiye edilerek incelenen deneklerin sonuçlarının ortalaması ile 8. haftada sakrifiye edilerek incelenen denek sonuçlarının ortalaması tablolaştırılmıştır. VEGF ve Ki67 değerlendirmeleri rakamsal değerler olup; ödem, yangı, fibrozis ve nekroz her iki patoloğun subjektif değerlendirmesidir.

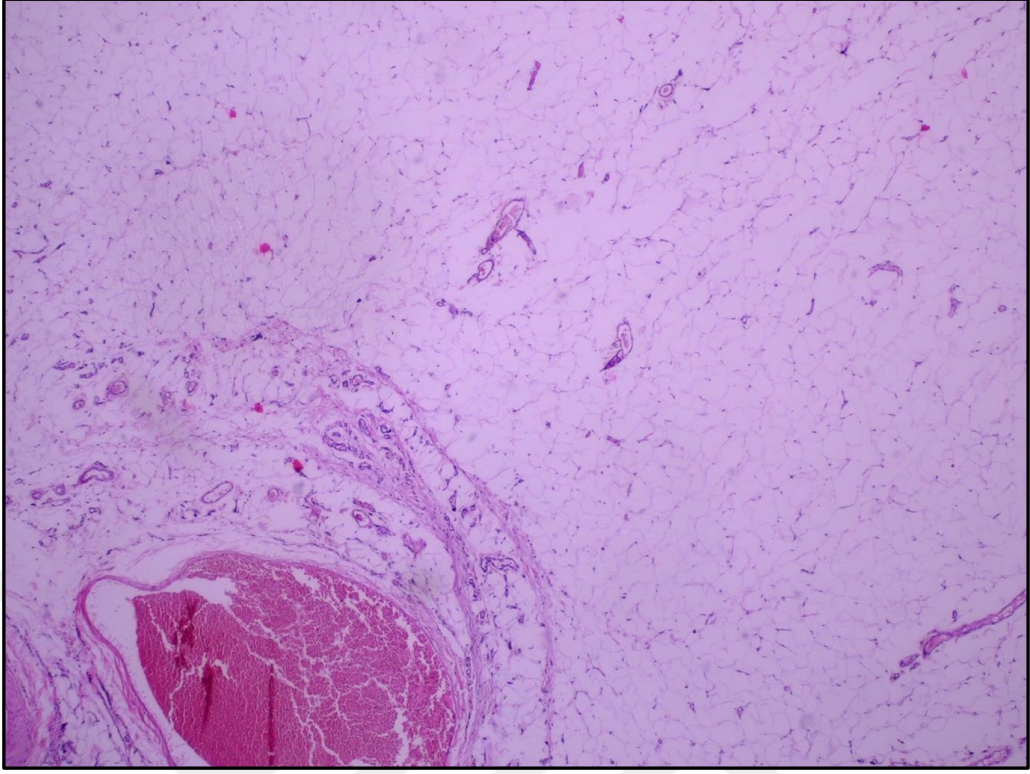
Çizelge 4.6. Deneklerin vücut ağırlıkları, ilk çıkarılan inguinal yağ dokusunun ağırlığı ve kryoprezervasyon işlemi uygulanan komponentin nakli sonrasındaki inguinal yağ dokusunun ağırlıklarını gösteren tablosu

Grup	Denekler	Denek Ağırlığı (gr)	Kontrol İnguinal Ağırlığı (gr)	4. Hafta İnguinal Yağ Ağırlığı (gr)	8. Hafta İnguinal Yağ Ağırlığı (gr)
A1	1	333	0.45	0.61	
	2	362	0.94	0.93	
	3	276	0.60		0.82
	4	316	0.15		0.91
A2	1	336	0.46	0.50	
	2	307	0.31	0.55	
	3	286	0.62		0.76
	4	277	0.42		0.65

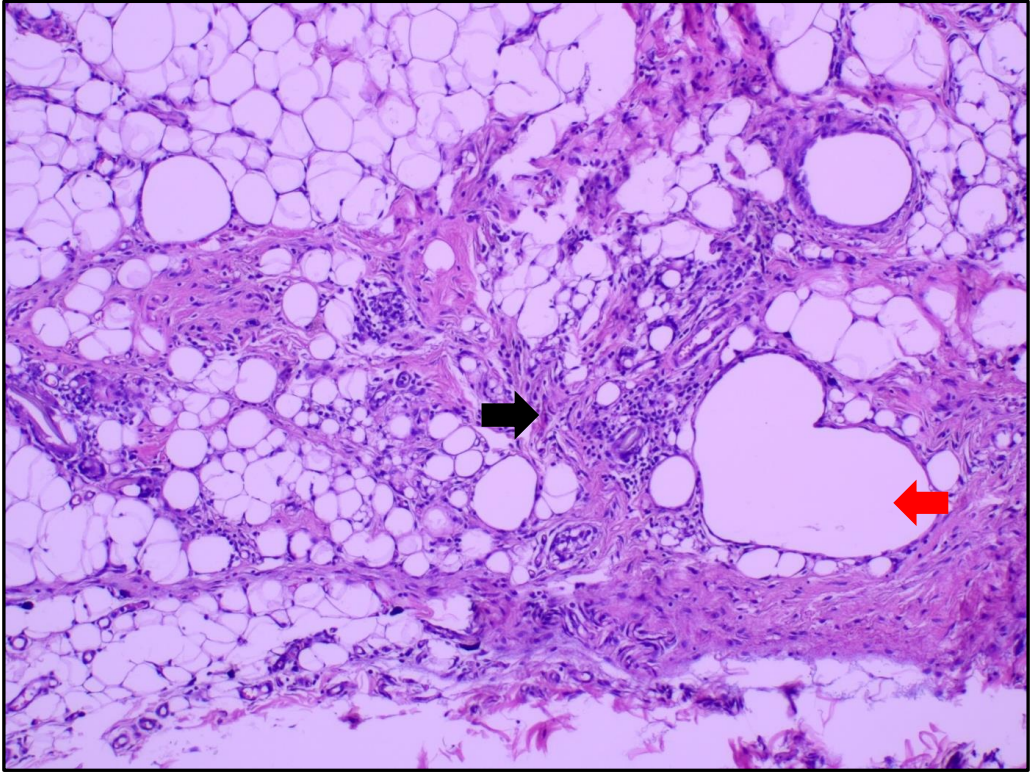
Çizelge 4.6 (Devam). Deneklerin vücut ağırlıkları, ilk çıkarılan inguinal yağ dokusunun ağırlığı ve kryoprezervasyon işlemi uygulanan komponentin nakli sonrasındaki inguinal yağ dokusunun ağırlıklarını gösteren tablosu

Grup	Denekler	Denek Ağırlığı (gr)	Kontrol İnguinal Ağırlığı (gr)	4. Hafta İnguinal Yağ Ağırlığı (gr)	8. Hafta İnguinal Yağ Ağırlığı (gr)
B1	1	280	0.20	0.50	
	2	305	0.42	0.70	
	3	310	0.60		1.1
	4	290	0.33		0.90
B2	1	350	0.40	0.73	
	2	320	0.61	0.95	
	3	370	0.80		1.4
	4	370	0.50		1.0
C1	1	265	0.23	0.84	
	2	290	0.30	0.85	
	3	340	0.50		1.0
	4	360	0.54		1.3
C2	1	300	0.40	0.92	
	2	280	0.35	0.65	
	3	320	0.46		0.90
	4	380	0.70		1.4
D1	1	320	0.34	0.50	
	2	330	0.40	0.64	
	3	315	0.40		0.87
	4	260	0.12		0.70
D2	1	280	0.20	0.76	
	2	275	0.30	0.58	
	3	400	0.92		1.6
	4	350	0.60		1.1
E1	1	310	0.65	0.90	
	2	220	0.20		
	3	450	0.90		1.4
	4	380	0.37		1.2
E2	1	370	0.70	1.0	
	2	420	1.0	1.4	
	3	380	1.1		1.9
	4	390	1.1		1.8
F1	1	370	0.53	0.80	
	2	520	1.6		
	3	490	1.2		1.6
	4	380	0.80		1.4
F2	1	360	0.50	0.90	
	2	410	0.75	1.0	
	3	460	0.96		1.3
	4	320	0.50		1.1

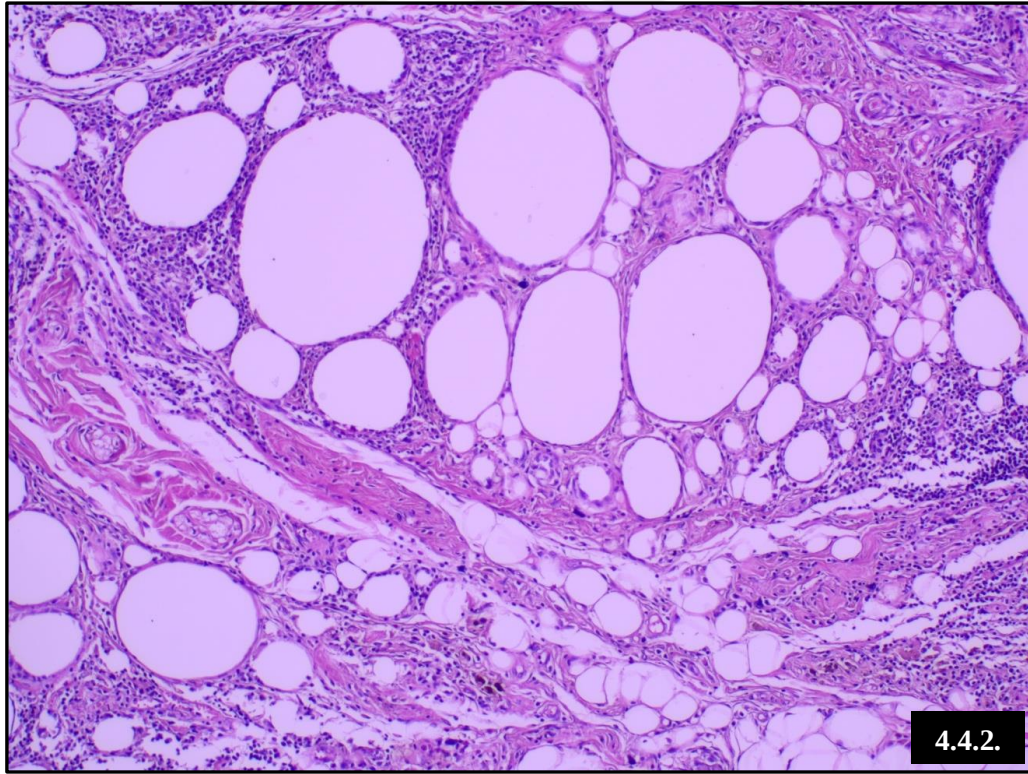
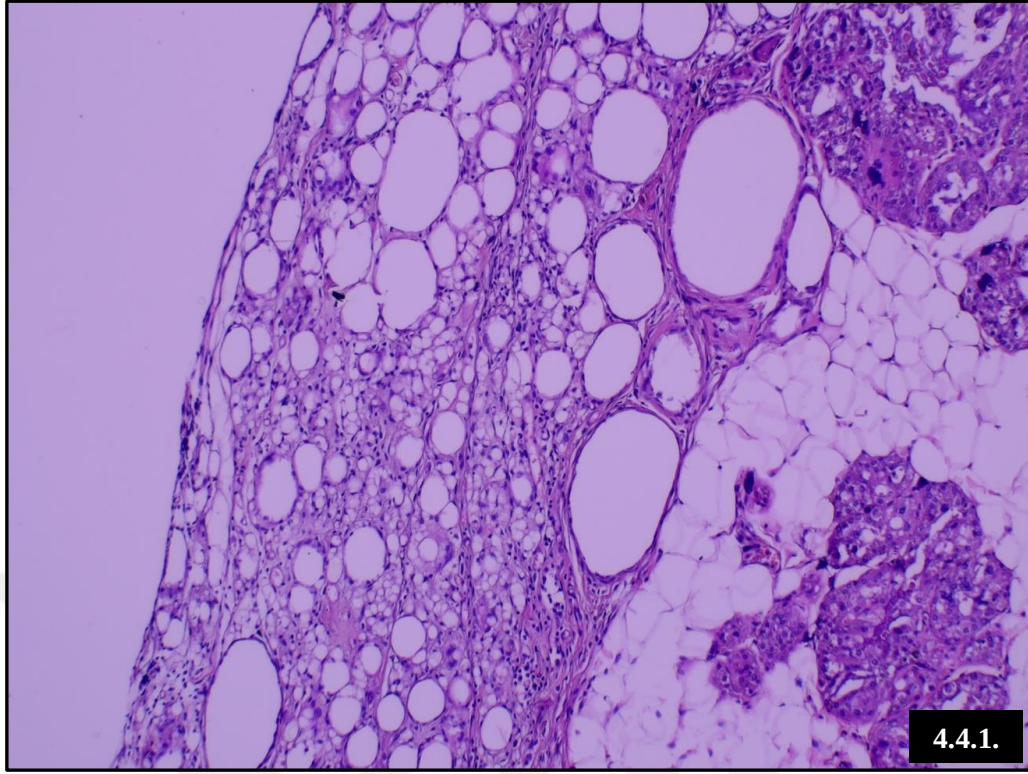
Kırmızı alanlar exitus denekleri tanımlamaktadır.



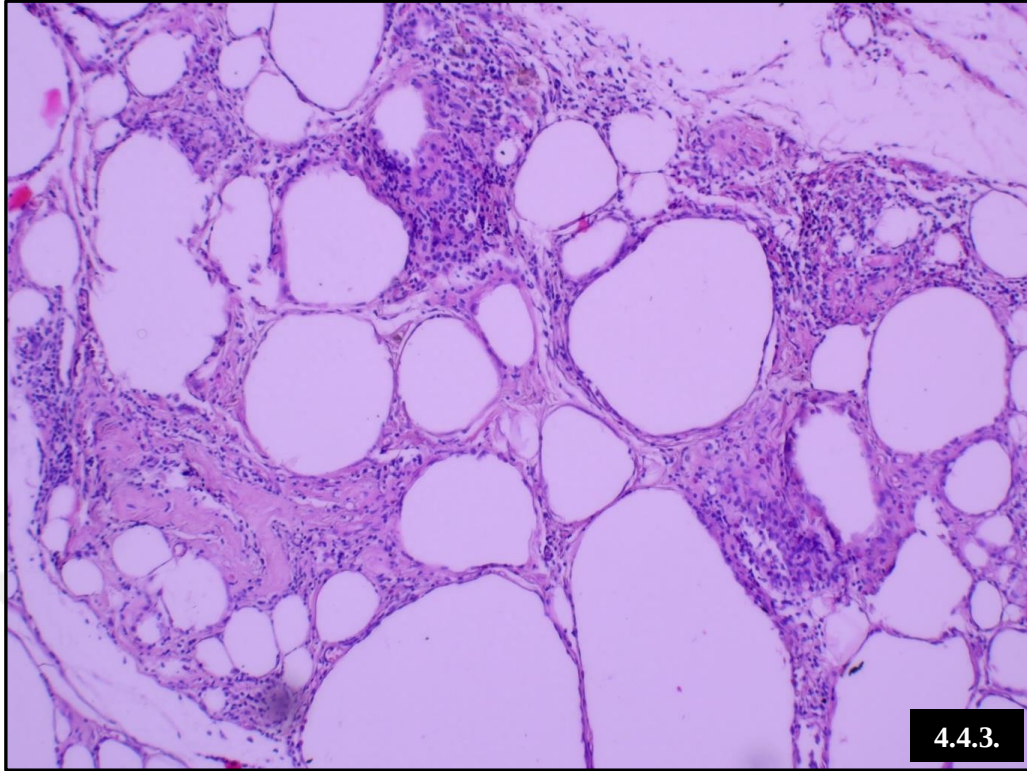
Şekil 4.2. Kontrol grubunda izlenen inguinal yağ dokusu kesiti, H&E x100 ile boyama



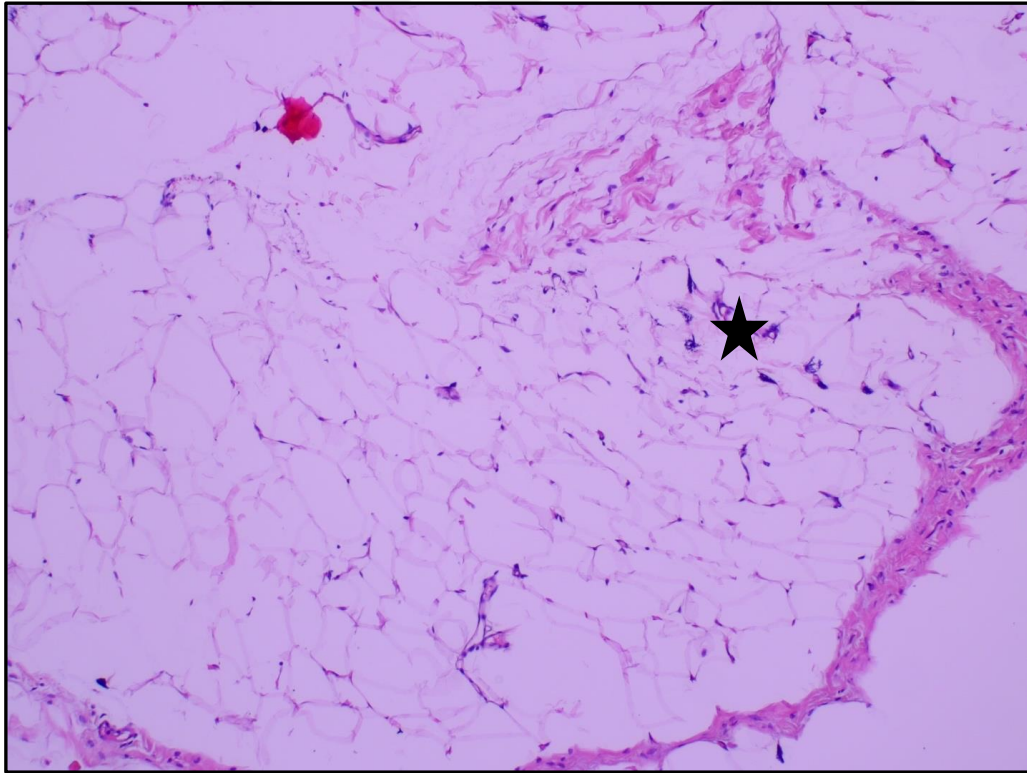
Şekil 4.3. Yağ grefti nakledilen grupta inguinal yağ dokusu, H&E x100 ile boyama (siyah ok – yoğun inflamasyon alanı, kırmızı ok - adipositlerin nekrozu sonucu oluşan yağ vakuolu)



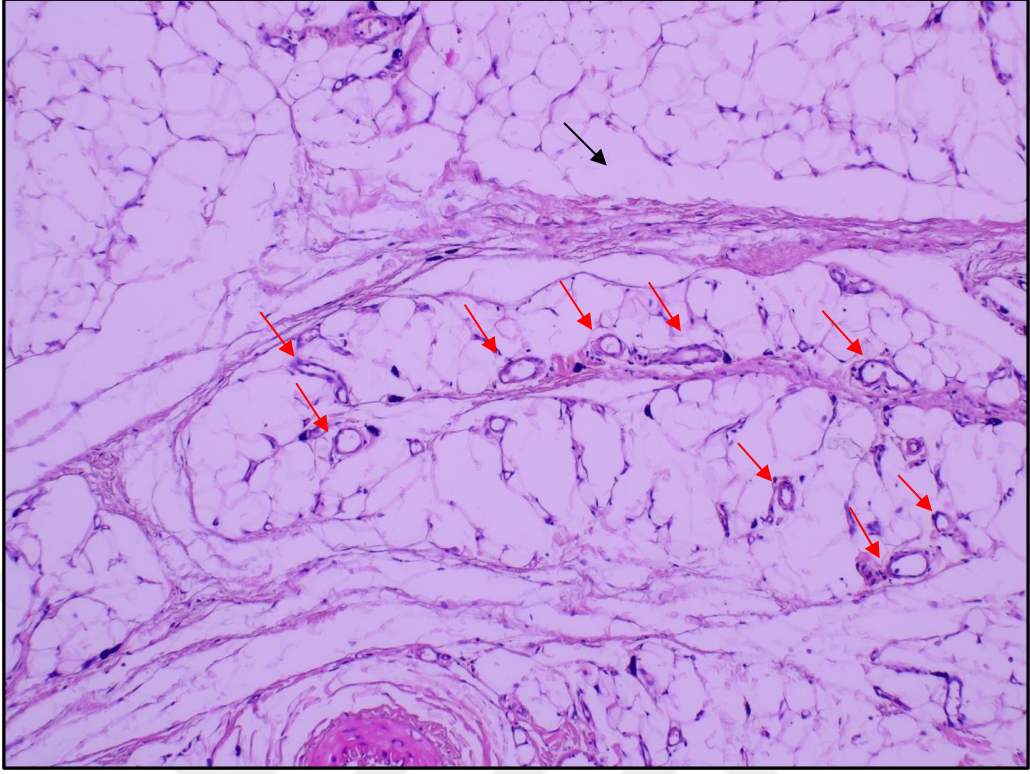
Şekil 4.4. Doku kokteyli nakledilen grupta adipositlerin nekrozu sonucu oluşan yağ vakuolleri, 'crown-like structure' görünümü, H&E x100 ile boyama



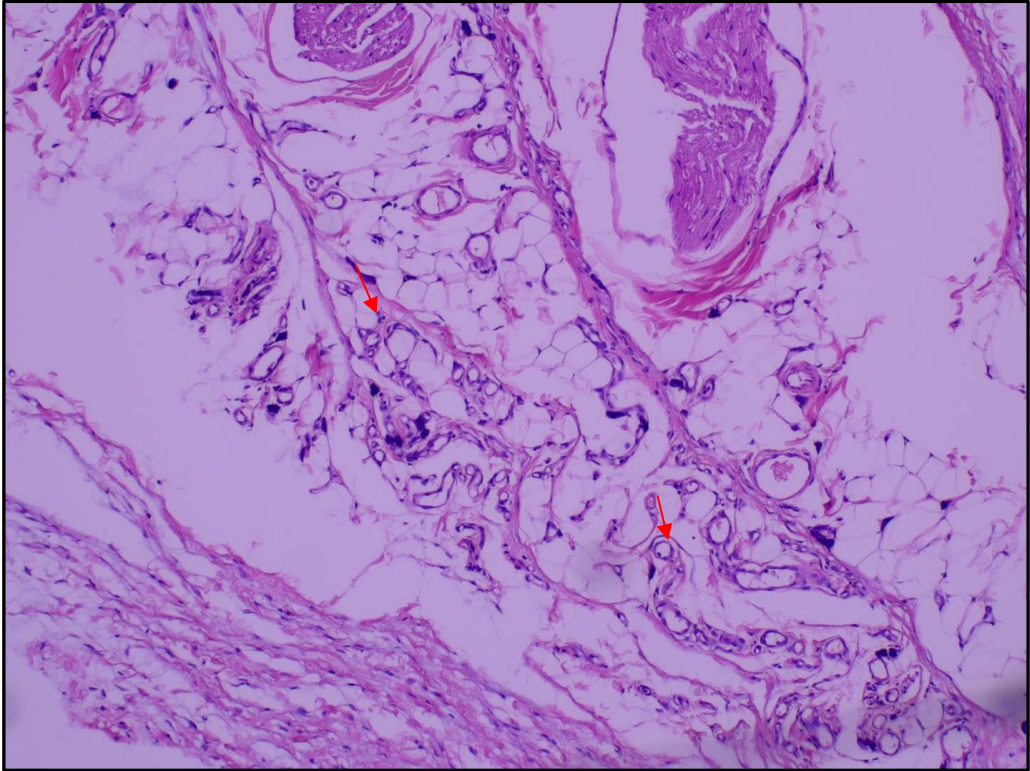
Şekil 4.4 (Devam). Doku kokteyli nakledilen grupta adipositlerin nekrozu sonucu oluşan yağ vakuolleri, 'crown-like structure' görünümü, H&E x100 ile boyama



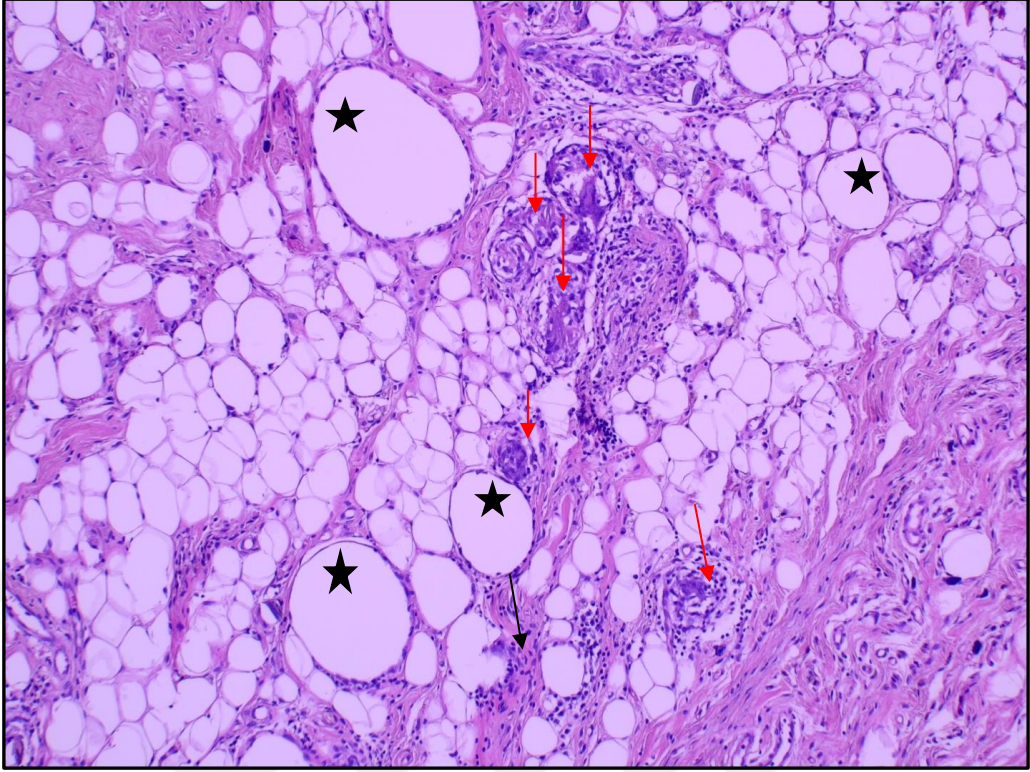
Şekil 4.5. Stromal vasküler fraksiyon nakledilen grupta, nakil alanında yeni adipoz doku (yıldız), H&E x100 boyama



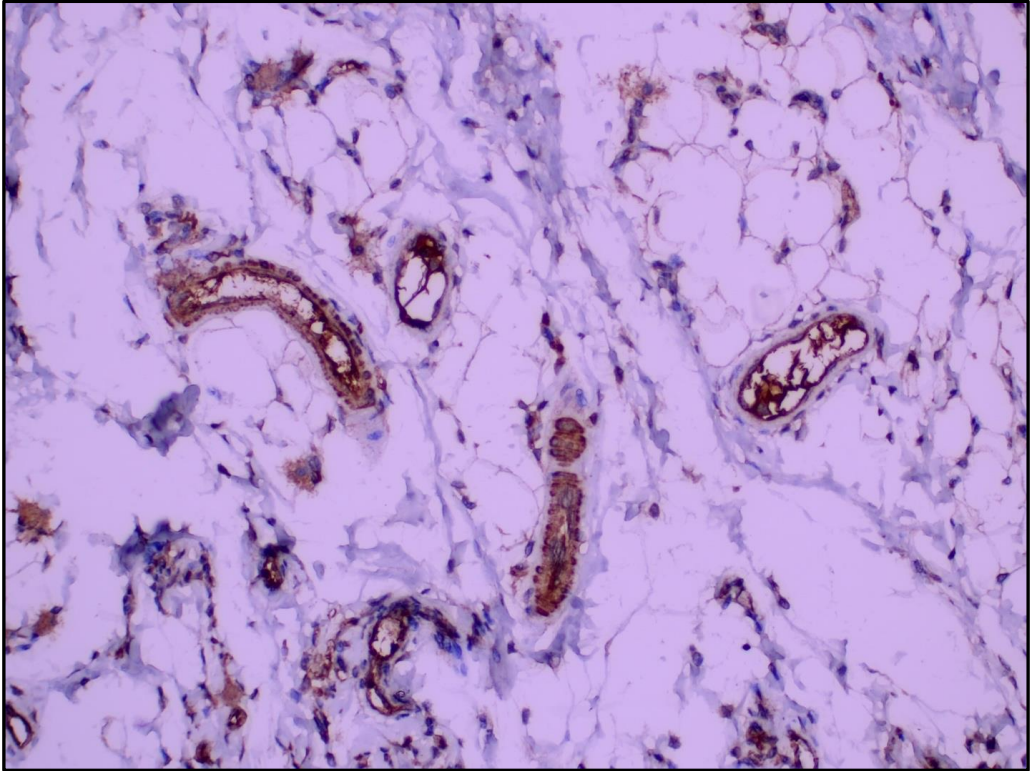
Şekil 4.6. AKKH ve SVF'nin beraber verildiği inguinal yağ dokusunda yeni damar oluşumları (kırmızı ok) ve ödem (siyah ok), H&E x100 ile boyama



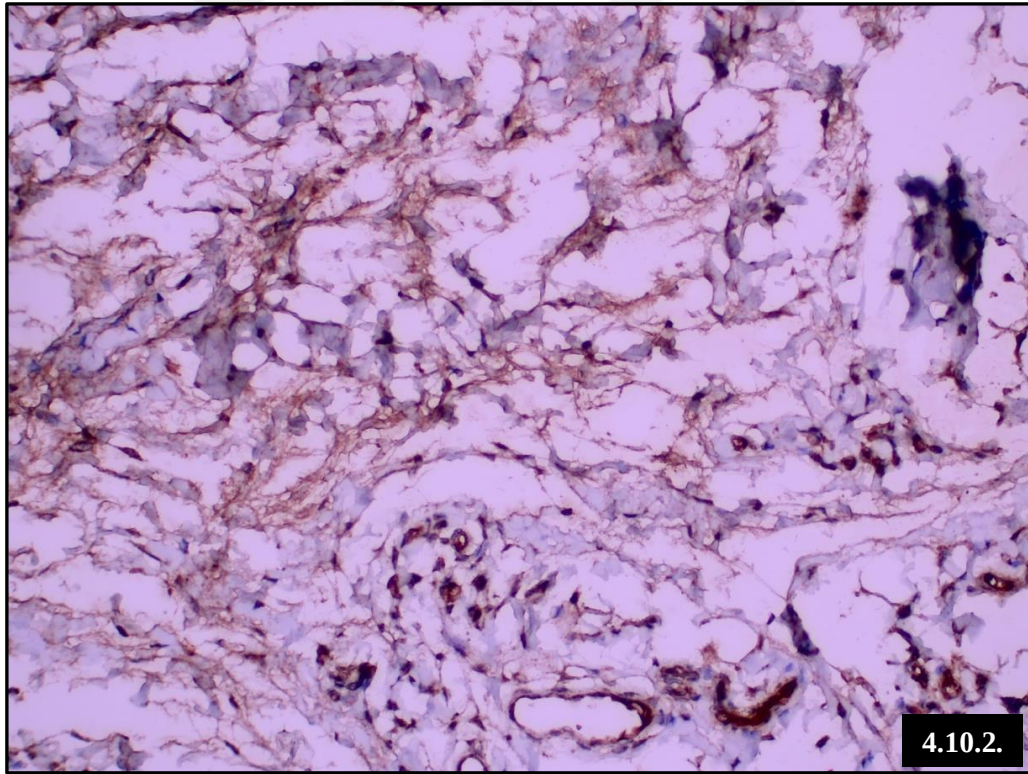
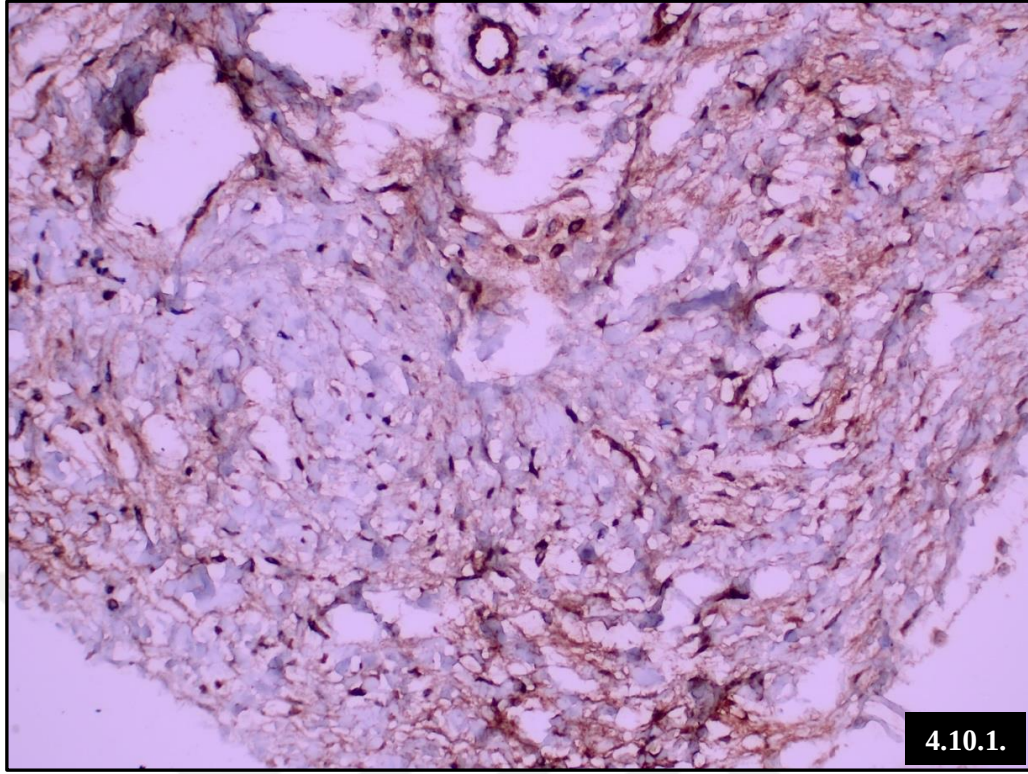
Şekil 4.7. SVF nakledilen grupta yeni damar yapıları (kırmızı ok- örnekler), H&E x100 ile boyama



Şekil 4.8. Yağ grefti nakledilen grupta, yağ vakuolleri (yıldız), yoğun inflamasyon (siyah ok), dev hücreler (kırmızı ok), H&E x100 ile boyama



Şekil 4.9. Yeni damar oluşumları, VEGF x200 ile boyama



Şekil 4.10. Hücresel proliferasyon alanları, Ki67 x400 boyama

5. TARTIŞMA

1893 yılında Neuber ilk otolog yağ transplantasyonu uygulamasını gerçekleştirdiğinden beri, yağ dokusunun hem rekonstrüktif, hem de estetik amaçla kullanımı hakkında sayısız çalışma gerçekleştirilmiştir. Yağ dokusunun bu popülerliği kolay şekilde elde edilebilmesi, kaynak olarak birçok alandan ve fazla miktarlarda elde edilebilmesi ve greft olarak bio-uyumlu doğal bir dolgu maddesi olabilmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat otolog yağ grefti uygulamasının uzun dönemli sonuçlarında temel sorunlardan birinin nakledilen yağ hacminin yaklaşık %70'ine yakının absorbe edilmesidir (83). Literatürde, yapılan çalışmalarda bunun nedeninin muhtemel olarak, nakledilen yağ greftinin revaskülarizasyonundaki eksikliğe bağlı olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla istenilen hacmin elde edilebilmesi amacıyla, yağ grefti işlemi, hastaya birden fazla olduğu kesin olmakla beraber sayısını öngöremediğimiz girişimler yapılmasına neden olur; bu da artan hasta morbiditesine, maliyete ve zamana mal olur. Uygulamanın bu sorununa bir çözüm olabileceği düşünülerek, fazla yağ dokusunun bir sonraki işlemde kullanımı için düşük derecelerde dondurarak saklama yöntemi yani kryoprezervasyon tekniği gündeme gelmiştir ve günümüze kadar bu konuda çok sayıda deneysel çalışma yapılmış olmakla beraber, klinik uygulamalar da mevcuttur (72, 84, 85).

Yağ dokusunu dondurarak saklamamızda önemli olabilecek bir diğer neden ise, yağ dokusunun başta adipositler olmak üzere, preadipositler, vasküler endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve adipoz doku kaynaklı kök hücreler gibi birçok hücre için ideal kaynak olmasıdır. Geçmişten başlayarak, bu hücresel çeşitliliğe dair bilgiler arttıkça, yağ dokusunun hücre kaynağı olarak kullanımına olan ilgi de artmıştır. 1986 yılında, Jarrell ve ark., sentetik vasküler greftleri kaplamak için yağ dokusundan elde edilen mikrovasküler endotel hücrelerinin kullanımından bahsetmişlerdir. Sonrasında ise, adipoz dokusunun, adipositlerden başka hücrelere farklılaşma yeteneğine sahip progenitor kök hücreler içerdiği fikri ortaya çıkmıştır. Halvorsen ve ark., 2000 yılında, yağ dokusu kaynaklı stromal hücrelerin osteojenik farklılaşmasını tanımladılar ve 2001 yılında Zuk ve ark. (36) tarafından yapılan yayındaysa, adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin spesifik büyüme faktörleri ile kemik, kıkırdak, iskelet, kas, endotel, hematopoetik

hücreler, hepatositler ve nöronal hücelere farklılaşabildikleri bulundu. Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin ayrıca immün sistemi düzenleyici etkileri de gösterilmiştir. İnterlökin (IL) -6, IL-10, IL-4 ve granülosit koloni oluşturan faktörün salgılanmasını arttırdıkları, düzenleyici ve yardımcı T hücrelerin proliferasyonunu uyardıkları gösterilmiştir. Tüm bu nedenlerle, rejenerasyonda, rejuvenasyonda, otoimmün hastalıkların tedavisinde ve doku mühendisliği uygulamalarında yağ dokusu ve içeriğindeki hücreler giderek önem kazanmaktadır.

Basit bir dondurma işleminde, KPA eklenmeden ve kontrollü soğutma ve çözünmeden geçmeden doku -196°C’de doğrudan sıvı nitrojene yerleştirilir. Fakat, günümüz kryoprezervasyon teknikleri, önce dokuya KPA eklenmesini ve ardından kontrollü soğutma ve çözünme işlemlerini öne çıkarmıştır. Bu yöntem ile canlı hücrelerin ve dokuların uzun süreli depolanması sağlanır ve birçok klinik uygulama için imkan sağlamaktadır.

Donmaya karşı hücre tepkisini ilk olarak Mazur tanımlamış olup, kendisinin iki faktörlü hipotezi; ‘yavaş soğutma hızlarında, hücre içi sıvı ekstrasellüler alana geçerek şiddetli dehidratasyon ile hücre hasarına neden olurken, yüksek soğutma hızlarında, su yeterince hızlı dağılmadığı için hücre içi buz kristalleri ile parçalanma meydana gelir’ (82, 86). Bu nedenle, hücrenin hayatta kalması, hücre içi buz oluşumunu önlemek için yeterince yavaş, ancak çözelti etkileri nedeniyle hücre hasarını azaltmak için yeterince hızlı olması gereken optimal bir soğutma hızıyla dakikada 1°- 2°C azalmaya dayanır. Hücrelerin ayrıca donma davranışı KPA eklenerek değiştirilebilir, çünkü bu ajanlar su geçişini ve buz kristali oluşum miktarını etkiler. Genel olarak bakarsak, kryoprezervasyon için gerekli olan ana adımları şu şekilde özetleyebiliriz: (1) Soğutmadan önce hücelere/dokulara KPA eklemek; (2) Hücrelerin/dokuların depolandığı düşük bir sıcaklığa doğru kontrollü soğutmak; (3) Hücreleri/dokuları mümkün olan en kısa sürede ısıtmak; ve (4) KPA’yı hücelerden/dokulardan çıkarmaktır. Tüm avantajlarına ve önemine rağmen kryoprezervasyonun, yağ dokusunun çözünme sonrasında, hücrelerinde canlılık ve işlevlerinde azalmaya neden olması, araştırmacıları optimum dondurarak saklama yöntemini bulmaya yönlendirmiştir. Fakat literatürde, tutarsız ve hatta zıt sonuçlar bulunabilmektedir (87-90); nedeni ise sadece işlem kaynaklı değil, elimizde adiposit canlılığını da etkileyen çok sayıda değişkenin olmasıdır.

Nitekim çalışmamızda, yağ dokusunun kryoprezervasyonunu optimize etmek amaçlı, yağ dokusunu ve yağ dokusundan elde edilebilecek tüm komponentleri, bir hastanın tedavisine tekabül edecek süreç boyunca dondurarak sakladık, bunu yaparken de literatür taramasından elde ettiğimiz bilgiler ışığında kliniğimizde oluşturulan protokolü kullandık. Çözünme sonrasında ise, gruplar arasında sağ kalımı, nakledildiği dokudaki morfolojik, immünohistokimyasal etkilerini inceledik. Buradaysa sonuçlarımızı, kryoprezervasyon işleminin temelde dikkat edilmesi gereken 5 basamağı üzerinden konuşacağız. Bunlar; (1) Saklanacak dokunun/hücrenin yapısı, (2) Saklama sıcaklığı, (3) Sıcaklık değişiminin hızı, (4) KPA varlığı ve (5) Saklama süresi olacaktır.

Öncelikle dondurma protokolümüzde hücreleri ısı şokuna maruz bıraktık; bunun nedeni ise hücrenin doğal ortamından çıkarıp doğruca dondurma işlemine maruz bırakmanın çözünme sonrasında sağ kalımını etkileyebileceğini düşünmemizdi. Eğer, hücreler daha önceden işlemin stresine karşı kendini koruyabileceği mekanizmalarla bu süreci karşılayabilirse çözünme sonrasında, sağ kalımın yanı sıra fonksiyonun da aynı şekilde koruyabileceğini öngördük. Nitekim bu ön koruma için ısı şoku proteinlerinden (HSP) faydalandık. HSP'ler genellikle bir hücrenin karşılaştığı olumsuz koşullara yanıt olarak artış gösteren stres proteinleri olarak tanımlanırlar ve ilk olarak *Drosophila melanogaster* (91), yani sirke sineğinde keşfedilmiş olup, tüm canlıların sistemlerinde bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklara, ağır elementlere, toksinlere, oksidatif strese, kimyasallara ve hipoksiye maruz kaldığında, hücrenin HSP'lerinde artış izlenir ve artmış HSP'ler, apoptotik yolu, bozulmuş ve hatalı katlanmış proteinlerin onarımını ve sinyal iletimini düzenleyerek hücrenin maruz kaldığı stresin yarattığı hasarı tersine çevirmeyi amaçlar. Dondurma işlemi sırasında hücrenin sadece sıcaklık değişimine bağlı hasarı olmaz, DMSO gibi kryoprotektanlara bağlı DNA metilasyonları da oluşabilir bu da hücrenin sağ kalımı etkilenmese bile daha fazla hasarlanmasına, fonksiyonelliğini sürdürememesine neden olur ki HSP gibi proteinlerin bu süreçte de müdahale edebileceğini düşünüyoruz. Shaik ve ark. (92) tarafından, insan lipoaspiratlarından önce SVF elde edilmiş ve pilot olarak 41°C, 43°C ve 45°C derecelerde AKKH'lerin morfolojik değerlendirmesinde 43°C'nin sağlıklı olduğu izlenmiştir; bu bilgiyle, örneklerin 43°C'de 1, 3, 9, 18 ve 48 saat maruziyeti sonrası

1 gün boyunca kryoprezervasyonunu gerçekleştirmişler ve çözünme sonrası HSP ekspresyonu ile sağ kalımı değerlendirmişlerdir. Isı şoku tekniğimizde aynı protokolü kullandık, ana farklılıklarımızdan biri ise kryoprotektan tercihinde oldu çünkü %1 DMSO kullanımının bahsedilen metilasyon etkisi açısından düşük doz olduğunu eğer literatürde genel kullanımı olan %10'da çalışılırsa HSP'ler açısından daha sağlıklı bilgiler edinilebileceğini düşünüyoruz ve bu proteinlerin hücre korunması açısından ümit vaat edici olmakla beraber farklı protokollerde kullanımına, etkilerine dair ileri çalışmalar olması gerektiğine inanıyoruz.

İkinci olarak bakabileceğimiz konu, saklama sıcaklığı olacaktır. Dondurma işleminde sıcaklık değişimi açısından daha önce bahsettiğimiz genel kabul gören Mazur hipotezini temel aldık fakat saklama sıcaklığı olarak pek çok derecede depolama sonrası sağ kalımın yüksek olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bizim bu konuda tercihimiz klinik deneyimlerimize dayanarak -80°C olmuştur. McRae ve ark. (87) tarafından yapılan çalışmada, yağ dokusu iki gruba ayrılarak, 8 gün boyunca -20°C 'de ve -196°C 'deki sıvı nitrojende depolanmış ve çözünme sonrasında her iki dokunun da yüksek oranda sağ kalım gösterdiği bulunmuştur. Atik ve ark. (93) ise farklı KPA kullanarak gerçekleştirdikleri deneylerinde, yağ dokusunun -35°C 'de saklanabildiğini ve klinik uygulamada güvenle nakledilebileceğini öne sürmüşlerdir. Bir başka örnek, Shoshani ve ark. (90), liposuction ile insandan elde edilen yağ dokusunu, 2 hafta boyunca -18°C 'de dondurarak saklamış ve taze elde edilen yağ grefti ile karşılaştırmak için farelere nakletmişlerdir. Nakil sonrası on beşinci hafta incelemelerinde, dondurulan doku ile direkt uygulanan yağ grefti arasında anlamlı fark izlenmediğini öne sürmüşlerdir. Fakat, biz bunların gerçekçi sonuçlar olmayabileceğini düşünüyoruz ve birçok araştırmacı da dondurma işlemi sonrası yağ greftinin, direkt uygulanan yağ greftiyle aynı sonuçları veremeyeceğini düşünmektedir. Çünkü -20°C 'de saklanan yağ dokusunun, -ki bazı çalışmalarda dondurma hızı kontrolsüz olup, kryoprotektan dahi eklenmemiştir ve günümüz bilgileriyle biliyoruz ki bunlar sağ kalımı ciddi derecede etkileyen faktörler olup-, çözüldükten sonra çoğunlukla ölü adipositlerden oluştuğu gösterilmiştir; bunun da klinik verim anlamında direkt elde edilen yağ greftine kıyasla uzun dönemde hacim kaybına neden olacağı savunulmuştur. Bu çalışmalarda bizce dikkat edilmesi gereken sağ kalımı

değerlendirme şekli olmalıdır. Çünkü örneklendirdiğimiz çalışmalarda sadece kısa dönemde nakledilen hacmin korunmasının, kryoprezervasyonun, yağ dokusuna hasar vermediği düşüncesine kanalize etmesidir. Oysaki bu çalışmalarda hücre düzeyinde sağ kalımın değerlendirilmesi daha doğru bilgiyi sağlayacaktır. Moscatello ve ark. (94), -20°C’de dondurulan yağ dokusunu floresan diasetat-propidium iyodür ile bakıldığında tamamen ölü olduğunu, herhangi etkisiz bir dolgu maddesinden farkının olmadığını göstermişlerdir. 2018 yılında ise, Zheng ve ark. tarafında hem in vitro hem in vivo karşılaştırmalı yapılan çalışmada, insan yağ dokusunu 3 ay boyunca -20°C, -80°C, -196°C derecede kryoprotektan kullanmadan saklamışlardır. Kryoprotektan kullanılmaması, çalışmanın eksikliklerinden olup, elde edilen sonuçlarda sağ kalımı azalttığını tahmin etmekle beraber, yapılan karşılaştırmada en düşük sağ kalım oranının -20°C’de olduğu izlenmiştir. Ayrıca, -80°C’de saklanan yağ dokusunun hem görüntüsü ve hacminin, hem hücre sağ kalımının ve immünohistokimyasal incelemelerinin diğer gruplara göre daha iyi olduğu bulunmuştur (95). Diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş (96-98) olup; sonuçta ideal kryoprezervasyon sıcaklığı olarak -80°C’nin kullanıldığını yaygın olarak görmekteyiz.

Hücreler donma sırasında, ya intrasellüler alanda buz kristallerinin oluşması ve hücre zarının parçalanması ile ya da ozmotik stres nedeniyle su kaybederek hasar görürler. Hücrelerin ideal şekilde saklanabilmesi bu açıdan sadece saklama sıcaklığının değişimi ve derecesi ile ilgili değildir aynı zamanda hasardan korumak amaçlı ortama belirli ajanlarla müdahale etmek gereklidir (88, 89, 97, 99-101). Kryoprotektan ajanlar, ikiye ayrılırlar; hücre içine geçen ve hücre dışına etkili olanlar. Literatürde en sık kullanımını gördüğümüz ajan hücre içine etkiyerek, dehidratasyonu önleyen DMSO’dur. Kandan elde edilen ürünlerin, kemik iliği kök hücrelerinin saklanması rutin olması bir kenara, literatürde yağ dokusunun kryoprezervasyonunda da ön planda kullanımı mevcuttur. Fakat DMSO’nun uygulanan birey için yan etkilerinin kontrol edilememesi, sitotoksik olması, daha önce bahsettiğimiz DNA metilasyonuna neden olması, hücre ortamından uygulama öncesi yıkanma gibi ek girişim ihtiyacının olması ile stratejiler iki parçaya ayrılmıştır; (1) DMSO konsantrasyonunu azaltmalı veya (2) Daha etkili başka kryoprotektan ajanlarla yer değiştirmeli. DMSO kullanımını azaltmak amaçlı, Pu

ve ark. (88, 89, 102, 103) tarafından yapılan çalışmalarda, DMSO'nun daha düşük konsantrasyonlarda trehaloz ile beraber kullanımının, tek başına DMSO ile hücre sağ kalımında benzer sonuçlar verebildiğini göstermiştir. Fakat bu konuda 15 farklı kryoprotektan kombinasyonu ile daha detaylı çalışmayı, Thrimula ve ark. gerçekleştirmiştir (104). Çalışmalarında, hem kryoprotektanlarla beraber serum kullanımını, hem de PVP ile DMSO'nun arasında ve kendi aralarındaki farklı konsantrasyonları arasında karşılaştırma yaparak; insan veya sığır serumu eklenmesinin hücre sağ kalımını arttırdığını, %10 PVP'nin neredeyse DMSO kadar verim sağladığından bahsetmişlerdir. Ama sonuç olarak, DMSO olmamasının ortamdaki apoptotik kök hücre sayısını arttırdığını bulmuşlardır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda kullanılan ajan olarak en çok PVP, DMSO'nun etkinliğine yaklaşmıştır, ayrıca piyasada içeriği açıklanmayan hücre saklama ortamları (Cell Banker) da bulunmaktadır (98, 105) fakat %10 DMSO ile yapılan karşılaştırmalarında hücre sağ kalımı açısından anlamlı farklılık görülmemiştir. Çalışmamızdaki ve aynı zamanda literatürdeki eksikliklerden biri kryoprotektan ajan konusudur. Çünkü kryoprezervasyon işleminin ilerleyebilmesi için hücrelere zarar vermeyen, optimum sağ kalımı sağlayarak doğal ortamı oluşturabilecek, klinik uygulamalara adapte edilebilen ve hayvan/insan serumu ile karıştırılmaya ihtiyaç duymayan bir ajan gereksinimi acil olarak mevcuttur. Kliniğimizin önceki deneyimine bağlı olarak %10 DMSO kullanımını tercih ettik çünkü esas amacımızın yağ dokusunun farklı komponentlerinin optimum düzeyde saklanması ile birbiri arasında sağ kalımını karşılaştırmak olduğunu bilmemizdi fakat ileri çalışmalarımızda bu KPA üzerine farklı ajanlarla çalışmanın kliniğimizin kryoprezervasyon çeşitliliği açısından umut verici olduğunu düşünüyoruz.

Kryoprezervasyon sonrası adipositlerin sağ kalımı hakkında pozitif sonuçlar bildiren çalışmalarda yöntemle dayalı yanlışlar ve kısıtlılıklar görebiliriz. Örneğin, çok az çalışma 1 aydan daha uzun süreli dokuyu veya hücreyi dondurarak saklamıştır. Oysa klinik uygulamalarımızdan ve önceki çalışmalardan biliyoruz ki, yağ grefti, uygulanmasından sonraki 3 ayda hacmini dengelemeye başlayarak, revizyon ihtiyacı olup olmayacağı 6 aya kadar tam karar verilemeyebilir. Bu yüzden çalışmamızda klinik uygulanabilirliği arttırmak adına depolama süreci için klinik hasta takibi süreci ile aynı zamanı temel aldık. Fakat, Kim ve ark. tarafından yapılan

çalışmada, -80°C’de saklanan dokuda 84 gün sonra kök hücre dahil, sağ kalan hücre görülmediği bildirilmiştir (106) ama buldukları sonucun, dokuyu, kryoprotektan kullanmadan dondurmaları nedeniyle hücre hasarına bağlı olarak gerçekleştiğini düşünüyoruz. Wolter ve ark. (101), KPA kullanarak gerçekleştirdikleri farklı bir çalışmada ise, hücre sağ kalımının ilk 2 günde azalmaya başladığını ama otuzuncu günde platoya eriştiğini bulmuşlardır. Li ve ark., yaptıkları pilot çalışmada 8 ay kryoprezervasyon ve 5 ay in vivo deney aşamalarından sonra bile halen daha viabl hücrelerin izlenebildiğinden bahsetmişlerdir (97). Sonuçta, kryoprezervasyon sürecinin uzun olduğu çalışma sayısı az olmakla beraber, sağ kalımla ilgili alınan sonuçlarda da farklılık görülmektedir. Nitekim, 3 ay boyunca dondurup sakladığımız ve 8 hafta in vivo takip ettiğimiz dokuların/hücrelerin sürecin sonunda doku kokteyli ve yağ grefti grupları da dahil olmak üzere naklettiğimiz alanda yaşayan adipositler içerdiğini gözlemledik. Fakat sürece dayalı farklı bulgularımızdan biri, gruplar arasında inflamasyon, fibrozis, ödem ve immünohistokimyasal açıdan 4. Ve 8. haftalar arasında anlamlı bir farklılık görmememiz oldu. Yağ grefti ve doku kokteylinde inflamasyonun devam etmesi üzerine VEGF ve Ki67’de minimal artış mevcuttu ve hematoksilen eozin ile incelemede kesitler arasında farklılık izlenebiliyordu fakat verilerimizde aynı bulguları sağlayamadık. Oysa yağ grefti transplantasyonu, dinamiktir ve alıcı dokunun her şekilde sürece dayalı olarak belirli bir tepki vermesi beklenir. Bu tepki sonucunda, hücre etkileşimi ve revaskülarizasyon ile nakledilen doku ya uyum sağlar ya da nekroza gider. Çalışmamızda, haftalar arasında farklılık görmememizin nedenlerinden biri dokuları değerlendirme şeklimizden de olabileceğini düşünüyoruz. Örneğin, literatürde farklılık gösteren çalışmalar genel olarak, çözünme işleminden daha yakın zamana değerlendirme koyarak, greftte oluşan majör farklılıkları gösterebilmişlerdir. Fakat biz 4. Haftada ilk değerlendirmemizi gerçekleştirerek, greftte o zamana kadar zaten platoya ulaşmış olan süreci 8. Haftada tekrar büyük bir farklılık izlemeden görüntülemiş olabiliriz. Bunun için çözünme sonrası da bir değerlendirme alarak, bu veriyi, 4. ve 8. hafta ile karşılaştırmak daha farklı bir sonuca ulaşmamızı sağlayabilirdi. Bir başka düşünce de, dokunun canlılığını ve anjiogenezi, adipogenezi değerlendirmek için kullandığımız boyamalardan kaynaklanabileceğidir. Yapılan bir çalışmada, canlı

adiposit sitoplazmasını immün boyanması için kullanılan perilipinin, hematoksilin eozin ile karşılaştırılması sonucunda hematoksilin eozinin aslında ölü hücreleri, canlı göstermesi nedeniyle güvenilir olmadığı yönünde sonuç alınmıştır (56). Ayrıca literatürde canlılığı ölçmek adına hücrede mitokondri çalışmasını değerlendiren 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenil-amino)karbonil]-2H-tetrazolyumhidroksit (XTT), 3-(4,5-dimetil-2,5-ditetrazolium bromür (MTT) ve gliserol-3-fosfat dehidrojenaz testleri de kullanılmaktadır. Fakat, mitokondri fonksiyonunun dokunun progresyonu hakkında öngörü sağlayacağını düşünmek yanlış olur. Greftin sağ kalımı, daha önce bahsettiğimiz üzere nakledilen doku içerisindeki kök hücrelerin ya da çevre dokunun adipogenezi ile olmaktadır, bunu sağlayan da AKKH olup, lipoaspiratların sadece %1 popülasyonunu oluştururlar; ki bu da sadece mitokondri fonksiyonu üzerinden yapılan çalışmalarda greft sağ kalımı hakkında verilerin sağlıklı olmayabileceğini gösterir. Önerimiz, kök hücrelerin canlılığını, koloni oluşturma ve farklılaşma yetilerini ölçen testler ile nakledilen greftin sağ kalımının, adipogenezin ve anjiogenezin değerlendirilmesi yönündedir.

Çalışmamız AKKH, SVF, yağ grefti ile beraber doku kokteylinin karşılaştırıldığı ilk çalışma olup, AKKH ve SVF gruplarına göre yağ grefti ve doku kokteyli grubunda proliferasyon ve damarlanmanın fazlaca arttığını, daha fazla inflamasyon, ödem ve nekroz izlendiğini gördük. Bu proliferasyon ve damarlanma artışının ideal düzeyden daha fazla olmasının anjiogenez ve adipogenez açısından etki göstermediğini aksine doku iyileşmesinin daha fibrotik ve nekroza dayalı gelişeceğini düşünüyoruz. Çünkü bütün bir dokunun kryoprezervasyonu, sadece tek bir hücrenin manipülasyonuna göre oldukça zorludur. Bir doku, sadece bir araya gelmiş birçok hücre değildir, kendi içinde bir işleyişi ve bütünlüğü vardır. Doku içerisindeki hücrelerin tek tek dondurulması başarılı bir kryoprezervasyon sağlar ama aynı zamanda tam yapısal bütünlüğü ve fonksiyonu korumak, çözünmeden sonra depolama amacına ulaşabilmek açısından önem taşır. Dokuyu dondurma zorluğu, ekstrasellüler buz kristali oluşumunun, dokuyu besleyen kapiller damarlar içinde parçalanmayla (107), dokuların çözünme sürecinde termal stres nedeniyle çatlamasına neden olmasındandır (108). Ayrıca dokuların bütünlüğü ekstrasellüler matriks sayesinde de sağlanmaktadır. Feng ve ark. (109) yaptıkları çalışmada,

ekstrasellüler matrikste bulunan tip 4 kollajen ve fibronektinin -20°C’de yapılarını kaybettiğini bulmuştur. Bu şekilde baktığımızda yağ grefti ve doku kokteyli gruplarımızda yıkıcı sayılabilecek inflamasyonun aslında yapım işlevinden kaynaklanmadığını daha çok yapısı bozulmuş dokuya karşı gerçekleştiğini görebiliriz. Literatürde geçmişte yağ greftlerinin (84, 97) ve doku kokteylinin (72) hacim korunması anlamında başarılı sonuçlar verdiği yayınlarda mevcuttur; fakat çalışmamızın sonuçlarına bakınca nakledilen hacmin korunmasının aslında adiposit sağ kalımına bağlı olarak değil gelişen fibrozis, yağ kisti, nekrozun yağ dokusunun hacmini sadece iskele olarak sabit tutmasına bağlı olarak geliştiğini söyleyebiliriz. Nitekim günümüzde kryo bankalarda saklanan deri, kalp kapağı, dura mater gibi dokular da bu şekilde kalıp doku iskeleleri olarak kullanılmaktadır. Zanata ve ark. (110), çalışmalarında floresan işaretli farelerin sırtlarına naklettikleri, dondurarak saklanan yağ greftlerini incelediklerinde nakledilen dokuda yeşil floresan proteininin pozitif olduğunu izlemişlerdir. Bu da bizi aynı bankalarda saklanan dokular gibi yağ greftinin de bütün halde dondurularak kullanılmasının canlı hücre açısından katkı sağlamadığını sadece alıcının doku gelişimi için bir kalıp görevi gördüğü düşüncesine götürmektedir.

Bu düşünce bizi şuna da yönlendirebilir; O zaman yağ greftinden, dokuda anjiogenez ve adipogenezi sağlayacak hücreler dışında işlevsiz olabilecek her şeyi ayırarak, elimizde kalanı dondurarak saklamamız, aynı volümü elde ettiğimiz sürece naklettiğimiz hücrelerin de çözünme ve nakil sonrası sağ kalımı için daha pratik ve faydalı olacak mıdır? Çalışmamızda AKKH, SVF grupları için yağ dokusu ve doku kokteyli ile aynı yöntemi kullandık ve yağ grefti, doku kokteyli grupları ile aynı volümü korumaya devam ederek, AKKH ve SVF’nin dokuda yeni damar yapıları ve yeni adiposit grupları oluşturduğunu gördük. Çalışmalarda, insanlardan, farelerden, atlardan elde edilen AKKH’in kryoprezervasyon işleminden sonra, sağ kalımının, proliferasyonunun ve adipositlere, osteoblastlara ve kondrositlere farklılaşma potansiyelinin aynı şekilde devam ettiği izlenmiştir (104, 111-119). Daha küçük saklama hacmiyle, düşük sıcaklıklara, iskemiye ve strese karşı daha dayanıklı olarak, aynı yöntemlerle, fonksiyonunu kaybetmeden depolayabileceğimiz AKKH’ın, en nihayetinde yağ greftinin yerini alabileceğini düşünmekteyiz.

Feng ve ark. (109), SVF ve yağ grefti kryoprezervasyonu üzerine yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmada, SVF'in çözünme sonrasında yağ greftine göre daha iyi hücre sağ kalımı ve morfolojik yapı gösterdiğini, transplantasyon sonrasında daha fazla hacmini koruduğunu göstermişlerdir. Mashiko ve ark. (98) ile Zanata ve ark. (110), 2017 yılında yaptıkları çalışmalarda kryoprezervasyonun SVF üzerine etkisini detaylıca araştırarak, SVF'un çözünme sonrasında hücre sayısında belirgin azalma olduğunu fakat sağ kalan hücrelerin adhezyon ve proliferasyon özelliklerini koruduğunu, koloni oluşturabildiklerini, kök hücre özelliklerini kaybetmemiş olduklarını bulmuşlardır. Zheng ve ark. (95), SVF'un kryoprezervasyondan etkilenmediğini, uzun zaman boyunca dondurularak saklanabileceğinden bahsetmiştir ama 2019 yılında Solodeev ve ark. tarafından yapılan detaylı çalışmada, lipoaspirattan elde edilen SVF, taze yağ dokusu ve iki farklı kryoprezervasyon yöntemi ile üç gruba ayrılarak karşılaştırılmış; sonuç olarak, SVF, kryoprezervasyon sonrasında hücre sayısında %60 oranında kayıp yaşadığı bulunmuştur fakat bu kaybın çoğunlukla CD45⁺ hematopoetik hücreler, özellikle de granülositler olduğunu, geriye kalan hücrelerin etkilenmediğini ve hatta CD34⁺ hücrelerin orantısal olarak artış gösterdiğini bulmuşlardır. SVF, koloni oluşturma, çoğalma, kemik ve yağ hücresine farklılaşma özelliklerini de korumuştur. Burada dikkati çeken bir sonuç ise SVF ile AKKH grupları arasında anlamlı bir fark izlememiş olmamızdır. AKKH, homojen bir hücre topluluğu iken, SVF ise kök hücre haricinde de pek çok hücre içeren, heterojen bir ortamdır. Miktar olarak aynı hacimde AKKH ve SVF elde edildiğinde, SVF'in içeriğindeki AKKH miktarının doğal olarak daha düşük olacağını görürüz. Aynı şekilde, çalışma düzeneğimize baktığımızda, 0.5 cc'den elde edilen AKKH, 0.5 cc'den elde edilen SVF ve 0.25 cc'den elde edilen SVF ile 0.25 cc'den elde edilen AKKH'nın aynı sonucu vermesi teorik anlamda adipogenez ve anjiogenezi yapan hücrenin AKKH olduğunu ve miktarından bağımsız olarak nakledildiği alanda değişikliklere neden olduğunu düşündürmekle beraber, SVF'in içeriğindeki diğer hücrelerin bu sürece katılımının araştırılmasını ileri çalışmalar için gerektiğini göstermektedir. Bu sayede, sadece AKKH mi veya SVF mi olarak kryoprezervasyonun etkinliğini arttırabileceğimizi bulabiliriz. Bir diğer konuya, literatürde AKKH ile SVF arasında yağ greftinin kryoprezervasyonu sonrası sağ kalımına olan katkı açısından karşılaştırılmaya

ihtiyaç olduğudur. Biz kendi çalışmamızda, AKKH ve SVF açısından farklılıkları belki VEGF ve Ki67 ile değerlendirmenin yeterli olmayışı nedeniyle görememiş olabileceğimizi kabul etmekteyiz. İleri zamanlarda, bu sorular üzerine daha detaylı çalışmalar olacaktır. Yine de çalışmamız literatürde, AKKH ve SVF'nin beraber verildiği aynı zamanda ayrı gruplar halinde de incelendiği, karşılaştırıldığı ilk çalışmadır.

Yayınlarda genel olarak, insan yağ dokusunun in vivo değişimini değerlendirmek amaçlı yağ dokusu nakli bağışıklığı yeterli farelere uygulanmış olup (95, 97, 98, 109, 110); bazı çalışmalar bağışıklığı yetersiz fare modelleri de kullanmıştır (120). Bağışıklığı yeterli olan denek, yağ transplantasyonunda immünolojik süreçleri de devreye sokacağından, hacim kaybını, sağ kalımı ve nakledilen doku ile alıcı arasındaki ilişkiyi gösteren daha doğru bulgular sağlayacaktır. Fakat, bu çalışmalarda hatalı gördüğümüz iki nokta mevcuttur. Birincisi, çalışmaların hepsinde insan yağ dokusu kullanılmıştır, bu da heterolog transplantasyon anlamına gelirken, immünolojik tepkinin, normalde klinik uygulamalarda karşılaşılabileceğimizden daha fazla olmasına bunun sonucunda daha fazla greft kaybına neden olarak sağlıklı veriler elde edilememesine neden olabilir. Ayrıca, bu yağ greftleri, sıçanların/farelerin scalp veya sırtına subkutan dokuya transplante edilmiş olup hiçbiri tekrar yağ dokusuna transplante edilmemiştir. Oysa klinik uygulamalarımızda, otolog yağ greftlerini subkutan yağ dokusuna naklediyoruz, burada literatürdeki çalışmalarda gözden kaçırılan nokta, alıcı yağ dokusunun da verilen yağ greftiyle olan ilişkisini denkleme katmak gerektiğidir. Bu nedenle, biz, çalışmamızda, immün yeterli sıçandan aldığımız ve dondurarak sakladığımız yağ dokusunu ve komponentlerini, yine aynı sıçanın kendi yağ dokusuna naklettiğimiz bir deney sistemi tasarladık. Çalışmamızın bu nedenle literatürde bulunan diğer çalışmalara kıyasla klinik gerçekliğe daha uygulanabilir olduğunu düşünüyoruz.

Son olarak, literatürde iki konu dikkati çekmektedir. İlki, kryoprezervasyonun hücreler üzerinde anjiojenik etkisi olabileceğidir; nedeni olarak, kriyoprezervasyon işlemi sırasındaki sıcaklık ve hücre ozmolaritesindeki değişim sonucu artan serbest oksijen radikallerinin oksidatif stres yaratarak, yeni kan damarı oluşumunu uyarıcı olabileceği öne sürülmüştür. Xue ve ark., farelerin,

4°C'lik sıcaklığa 5 hafta boyunca kronik olarak maruz kalması sonrasında adipoz dokularında proanjiojenik faktörlerde artış, antianjiyojenik faktörlerde ise baskılanma izlenimlerdir (121). Tabii ki bu çalışma, bütün organizmaya müdahaleyi içerir fakat, Lashcke ve ark. (122), benzer anjiyojenik etkiyi adipoz dokudan elde ettikleri mikrovasküler fragmanlarda da çözünme sonrası izlenimler ve in vivo ortamda, kryoprezervasyon sonrası nakledilen mikrovasküler yapıların yeni mikro damar oluşturma konusunda daha aktif olduklarını göstermişlerdir. Kryoprezervasyonun oksidatif stresi arttırması ile bu etkisi anlaşılabilir ama aynı zamanda kryoprezervasyon hücrelerde işlem öncesine göre çözünme sonrasında oksidatif ürünleri azalttığına yönelik çalışmalarda mevcuttur (123). Bu konuda, dondurma işleminin hem oksidatif stresi indükleyen hem de hücreyi oksidatif stresten koruyan mekanizmalarla olan ilişkisi, hücrenin hayatta kalma mekanizmaları açısından yaşayan kompleks bir süreç ile kryoprezervasyonun gerçekleştiğini bize göstermektedir.

Sonuçta, yağ dokusunun ve yağ dokusunun içerdiği hücresel komponentlerin özellikle de kök hücrelerin dondurularak uzun süreler saklanabilmesi her geçtiğimiz gün önemini daha iyi göstermektedir. Özellikle, yaşlılardaki adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin yüksek düzeyde yaşlanma belirteci ve oksidatif stres göstermesi, daha düşük antioksidan enzim aktivitelerinin olması, farklılaşma kapasitelerinde azalma, hücre proliferasyonu ve koloni oluşturmaları için gereken sürenin uzamış olduğunun gösterilmesiyle (124-126), insanların erken süreçte hücrelerinin elde edilerek, daha uzun zamanlı olarak saklanabilmesi, ileri uygulamalarda tedavinin etkinliğini etkilemesi açısından dikkate değerdir. Yağ dokusunun kryoprezervasyonu ise, bütün bir dokuyu dondurabilmenin yöntemini bulduğumuz zamana kadar, şimdilik, bizler için kompleks ve etkinliği düşük bir işlem olarak kalacaktır. Kök hücrelerin son dönemdeki popülerliği ve kullanım alanlarının her geçen gün artması ile de yağ dokusu kryoprezervasyonu konusunda, hücre bazında, stratejilerimizi ve odağımızı geliştirmemiz gerektiğini göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile, dondurularak saklanan yağ dokusunun, otolog yağ transplantasyonu tedavisinde ideal sonuçlara ulaşmak için gerekli olabilecek çoklu seanslarda kaynak olarak kullanılabileceği sonucuna vardık. Depolanan dokunun tekrar kullanılmasının hem uygulamanın pratikliğini arttırarak zaman kazanımı sağlarken hem de hastanın morbiditesini azaltmaya faydalı olacağını düşünüyoruz. Yalnız sonuçlarımız ışığında, yağ dokusu kryoprezervasyonunun yağ grefti ve doku kokteyli olarak bütün bir doku olarak değil; hücre bazında adipoz doku kaynaklı kök hücre ve stromal vasküler fraksiyon olarak saklanması hem hacim korunması açısından hem de yeni adipoz doku oluşumunda ve yeni damar oluşumunda daha etkili olacağını düşünmekteyiz. Çünkü, incelemelerimizde gördüğümüz gibi, nakledilen yağ grefti ve doku kokteyli, nekroz sonucu oluşan yağ vakuelleri ile yoğun inflamatuvar hücreler içermektedir. Bu da zamanla nakledilen yağ volümünün korunmayacağını, geri kalan dokunun da fibrotik özellik göstereceğini; böylelikle yağ grefti klinik tedavisinde ulaşmak istenen doğal kontur, hacim ve rejuvenasyon hedeflerine ulaşamayacağını düşündürmektedir. Çalışmamız, adipoz doku kaynaklı kök hücre, stromal vasküler fraksiyon, yağ grefti ve doku kokteylinin kryoprezervasyonunu karşılaştıran ilk çalışma olup; ayrıca immün yeterli sıçandan alınan yağ dokusunu otolog olarak sıçanın yağ dokusuna transplante eden ilk çalışma da olmuştur.

Son olarak sonuçlarımız, yağ dokusunun, adipoz doku kaynaklı kök hücre ve stromal vasküler fraksiyon halinde belirli bir protokol uygulaması ile dondurulup saklanması ve kullanılmasının diğer komponentlere üstün olduğunu göstermiştir. Yağ grefti tedavisinde ideal doku, hücre saklama yöntemlerine olan ihtiyacın artmasıyla da beraber, protokollerin standardize edilmesi gerektiğini ve bu sayede, gelecekte kryoprezervasyonun daha fazla klinik kullanımı olacağını öngörüyoruz.

7. ÖZET

Sıçanlarda Adipoz Kaynaklı Kök Hücre, ADSC Stromal Vasküler Fraksiyon, SVF Yağ Grefti ve Doku Kokteylinin Dondurma İşlemi Sonrasında Sağkalımlarının ve Yağ Dokusuna Katkılarının Karşılaştırılması

Yağ greftleri, kişinin kendisinden elde edilip, oluşturduğu kontur ile güvenli, doğal bir dolgu maddesidir. Fakat yağ hücrelerinin (adiposit) hipoksiye hassasiyeti nedeniyle nakledilen yağın kısmi nekrozu kaçınılmaz olmaktadır. Manyetik rezonans ile yapılan incelemelerde nakledilen hacmin ancak %55-70'i korunarak greftin devamlılığını sürdürdüğü gösterilmiştir.

Dolayısıyla, tedavi hedeflerine ulaşmak için sıklıkla birden fazla işlem gerekir ve bu da hem ekstra maliyete hem de hasta için artan morbiditeye neden olmaktadır. Yağ grefti uygulamasının, bu istenmeyen etkilerinin azaltılabilmesi için, ilk seansta alınacak yağ dokusunun bir bölümünün, hastanın ek tedavi ihtiyacı olduğunda tekrar kullanılabilmesi için düşük derece sıcaklıklarda saklanması yani kryoprezervasyonu deneysel ve klinik olarak denenmiştir. Fakat kryoprezervasyon protokolünün basamakları, saklanan dokunun çözünme sonrası nakledildiği dokudaki sağ kalımı hakkında net bir görüş yoktur.

Çalışmamızda, 48 adet Wistar sıçan (erkek, 200-500 gram) her grupta 8 denek olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır. Her bir sıçanın önce bir taraftaki inguinal yağ dokusu çıkarılarak, bu yağ dokusundan yağ grefti, adipoz doku kaynaklı kök hücre (AKKH), stromal vasküler fraksiyon (SVF) ve doku kokteyli elde edilmiştir. Elde edilen bu materyaller, dondurma protokolü için, öncelikle 43°C'de %5 CO₂ ile 1 saat ısı şoku uygulanması sonrasında, 37°C'lik hücre kültürü inkübatörlerinde 3 saat dinlendirilmiş sonrasında %10 DMSO+FBS solüsyonu içerisinde 4°C'de 10 dakika bekletilerek, her dakika 1°C soğutulacak şekilde depolama ısısı olan -80°C'de 3 ay depolanmıştır. Sürecin sonunda her bir materyal 37°C sıcak su banyosunda hızlıca çözündürülmüş ve otolog olarak sıçanların kontralateral inguinal yağ dokusuna nakledilmiştir. H&E ile yapılan morfolojik incelemede ve VEGF, Ki67 ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık

görülmüştür ($p>0.0001$). AKKH, SVF, AKKH ve SVF gruplarında yağ grefti ve doku kokteyli gruplarıyla olan karşılaştırmada, yağ grefti ve doku kokteylinin VEGF ve Ki67 boyanması anlamlı derecede yüksek izlenmiştir ($p>0.0001$). Ayrıca yağ grefti ve doku kokteyli gruplarında diğer gruplardan farklı olarak nekroz ve dev hücreler görülmüştür. AKKH, SVF, AKKH ve SVF gruplarında hücrelerin sağ kalımı ve anjiogenez ile adipogenez için yağ grefti, doku kokteyli gruplarına göre ideal morfolojiye ve VEGF, Ki67 boyanmasına sahip olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, yağ grefti ve doku kokteyli gibi görece daha büyük dokuların dondurulması sonrasında hücrelerin sağ kalımı ve işlevleri azalmaktadır. Yağ dokusunda bulunan ve anjiogenezi, adipogenezi düzenleyen; oluşturan ve destekleyen hücrelerin dondurulmasının dokunun bütününe dondurulmasına göre daha iyi sonuçlar verdiği düşünülmektedir. Hücrelerin kryoprezervasyona karşı dayanıklılığı sayesinde daha fazla hücrenin canlılığını koruması; dokuda nakledilen hacmin korunmasıyla beraber yeni damar ve adiposit oluşumunu da sağlayacaktır. Klinik uygulamada, bu avantajların kullanılması hem tedavinin etkinliğini arttırırken hem de hastanın tedavi süresince konforunda da etkili olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Yağ Grefti, Adipoz Doku, Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre, Stromal Vasküler Fraksiyon, Doku Kokteyli, Kryoprezervasyon (Dondurarak Saklama)

8. ABSTRACT

Comparison of Survival and Effectivity of Cryopreserved Adipose Derived Stem Cell, Stromal Vascular Fraction, Fat Graft and Tissue Cocktail in Rats

Fat grafts are a safe, natural filler material, which can be taken from the person himself. However, partial necrosis of the transplanted fat is inevitable due to the sensitivity of fat cells to hypoxia. With magnetic resonance, it has been shown that the graft maintains, preserving only 55-70% of the transplanted volume. Thus, multiple procedures are often required to achieve treatment goals, resulting in both extra cost and increased morbidity for the patient. In order to reduce these undesirable effects of fat grafting, at the first session of liposuction, a portion of lipoaspirate can be taken and stored at low temperatures so that it can be reused when the patient needs additional treatment, that is, so called cryopreservation. However, in the literature there is no single opinion about the cryopreservation protocol, survival of the preserved tissue and the effect of thawed tissue in the transplanted area.

In our study, 48 Wistar rats (male, 200-500 grams) were divided into 6 groups with 8 subjects in each group. Inguinal adipose tissue on one side of each rat was excised first, and after, from that tissue we got fat graft, adipose tissue derived stem cell (ADSC), stromal vascular fraction (SVF) and tissue cocktail. As a cryopreservation protocol, materials were first applied to 43°C with 5% CO₂ for 1 hour as a heat shock, then stayed in 37°C cell culture incubators for 3 hours. After 3 hours, materials stayed at 4°C for a 10 minutes with 10% DMSO+FBS solution, then cooled and stored -80°C (-1°C/min) as the final temperature for 3 months. At the end, each material was rapidly thawed in a 37°C hot water bath and transferred autologously to the contralateral inguinal adipose tissue of the rats. Morphological examination with H&E and immunohistochemical evaluation with VEGF and Ki67 showed significant differences between the control group and the other groups ($p > 0.0001$). VEGF and Ki67 staining of the fat graft and tissue cocktail was observed to be significantly higher than in the ADSC, SVF, ADSC and SVF groups ($p > 0.0001$). In addition, necrosis and giant cells were observed in the fat graft and

tissue cocktail groups. Fat graft and tissue cocktail groups may have shown higher results as a staining, but we found the ideal morphology for cell survival, angiogenesis and adipogenesis in the ADSC, SVF, ADSC and SVF groups.

As a result, the survival of cells decrease after cryopreservation in relatively larger tissues such as fat graft and tissue cocktail. It is thought that freezing the cells in the adipose tissue that regulate, form and support angiogenesis and adipogenesis gives better results than freezing the whole tissue. Resistance of the stem cells to cryodamage ensure that more cells maintain their viability, so that the graft volume will be preserved, as well as with the formation of new vessels and adipocytes. In clinical practice, the use of these advantages will both increase the effectiveness of the treatment and be effective in the comfort of the patient during the treatment.

Key Words: Fat Graft, Adipose Tissue, Adipose Tissue Derived Stem Cell (ADSC), Stromal Vascular Fraction (SVF), Tissue Cocktail, Cryopreservation

9. KAYNAKLAR

1. Neuber F. Fettransplantation. Chir Kongr Verhandl Deutsche Gesellsch Chir 1893; 22: 66.
2. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. Aesthetic Plast Surg 1995; 19(5): 421-5. doi: 10.1007/BF00453875
3. Carpaneda CA, Ribeiro MT. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. Aesthetic Plast Surg 1994; 18(1): 17-9. doi: 10.1007/BF00444242
4. Illouz YG. Present results of fat injection. Aesthetic Plast Surg 1988; 12(3): 175-81. doi: 10.1007/BF01570929
5. Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of a "Cell Survival Theory". Plast Reconstr Surg 1950; 5: 217-30.
6. Kuno S, Yoshimura K. Condensation of tissue and stem cells for fat grafting. Clin Plast Surg 2015; 42(2): 191-7. doi: 10.1016/j.cps.2014.12.006
7. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. Regen Med 2009; 4(2): 265-73. doi: 10.2217/17460751.4.2.265
8. Bertrand B, Eraud J, Velier M, Cauvin C, Macagno N, Boucekine M, et al. Supportive use of platelet-rich plasma and stromal vascular fraction for cell-assisted fat transfer of skin radiation-induced lesions in nude mice. Burns 2020; SS0305-4179(20)30328-4. doi: 10.1016/j.burns.2020.04.020
9. Carstens MH, Quintana FJ, Calderwood ST, Sevilla JP, Rios AB, Rivera CM, et al. Treatment of chronic diabetic foot ulcers with adipose-derived stromal vascular fraction cell injections: Safety and evidence of efficacy at 1 year. Stem Cells Transl Med 2021; 10(8): 1138-47. doi: 10.1002/sctm.20-0497
10. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts

- and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016; 69(2): 170-9. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015
11. Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev* 1983; 8(1): 1-11. doi: 10.1016/0378-3782(83)90028-2
 12. Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM. The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev* 1984;10(1-2): 1-11. doi: 10.1016/0378-3782(84)90106-3
 13. Burdi AR, Poissonnet CM, Garn SM, Lavelle M, Sabet MD, Bridges P. Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots. *Int J Obes* 1985; 9(4): 247-56. PMID: 4066112
 14. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(3): 319-28. doi: 10.1079/pns200192
 15. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84(1): 277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003
 16. Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(1): E19-31. doi: 10.1152/ajpendo.00249.2011
 17. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science* 2010; 328(5982): 1113-4. doi: 10.1126/science.1190816
 18. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145
 19. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6. doi: 10.1038/292154a0

20. Przybyt E, van Luyn MJ, Harmsen MC. Extracellular matrix components of adipose derived stromal cells promote alignment, organization, and maturation of cardiomyocytes in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(5): 1840-8. doi: 10.1002/jbm.a.35311
21. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007; 212(3): 702-9. doi: 10.1002/jcp.21068
22. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10): 1292-8. doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1
23. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008; 180(4): 2581-7. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2581
24. Ren S, Chen J, Duscher D, Liu Y, Guo G, Kang Y, et al. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 47. doi: 10.1186/s13287-019-1152-x
25. Lombardi F, Palumbo P, Augello FR, Cifone MG, Cinque B, Giuliani M. Secretome of Adipose Tissue-Derived Stem Cells (ASCs) as a Novel Trend in Chronic Non-Healing Wounds: An Overview of Experimental In Vitro and In Vivo Studies and Methodological Variables. *Int J Mol Sci* 2019; 20(15): 3712. doi: 10.3390/ijms20153721
26. Ferreira ADF, Gomes DA. Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair. *Bioengineering (Basel)* 2018; 6(1): 4. doi: 10.3390/bioengineering6010004
27. Choi EW, Seo MK, Woo EY, Kim SH, Park EJ, Kim S. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. *Exp Dermatol* 2018; 27(10): 1170-2. doi: 10.1111/exd.13451

28. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 2012; 30(5): 804-10. doi: 10.1002/stem.1076
29. Kucharzewski M, Rojczyk E, Wilemska-Kucharzewska K, Wilk R, Hudecki J, Los MJ. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. *Eur J Pharmacol* 2019; 843: 307-15. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.12.012
30. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15(6): 641-8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006
31. Algire C, Medrikova D, Herzig S. White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831(5): 896-904. doi: 10.1016/j.bbalip.2012.10.001
32. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 2012; 53(2): 227-46. doi: 10.1194/jlr.R021089
33. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(6): 270-7. doi: 10.1016/j.tem.2012.01.003
34. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143
35. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54(3): 132-41. doi: 10.2302/kjm.54.132
36. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-28. doi: 10.1089/107632701300062859

37. Mishra VK, Shih HH, Parveen F, Lenzen D, Ito E, Chan TF, et al. Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 2020; 9(5): 1145. doi: 10.3390/cells9051145
38. Yang KC, Chen IH, Yang YT, Hsiao JK, Wang CC. Effects of scaffold geometry on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020; 110: 110733. doi: 10.1016/j.msec.2020.110733
39. Fu S, Luan J, Xin M, Wang Q, Xiao R, Gao Y. Fate of adipose-derived stromal vascular fraction cells after co-implantation with fat grafts: evidence of cell survival and differentiation in ischemic adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132(2): 363-73. doi: 10.1097/PRS.0b013e31829588b3
40. Dong Z, Peng Z, Chang Q, Lu F. The survival condition and immunoregulatory function of adipose stromal vascular fraction (SVF) in the early stage of nonvascularized adipose transplantation. *PLoS One* 2013; 8(11): e80364. doi: 10.1371/journal.pone.0080364
41. Ko MS, Jung JY, Shin IS, Choi EW, Kim JH, Kang SK, et al. Effects of expanded human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse. *Int J Med Sci* 2011; 8(3): 231-8. doi: 10.7150/ijms.8.231
42. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg* 2010; 64(2): 222-8. doi: 10.1097/SAP.0b013e31819ae05c
43. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 2006; 12(12): 3375-82. doi: 10.1089/ten.2006.12.3375
44. Trojahn Kolle SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Elberg JJ, Fischer-Nielsen A, Drzewiecki KT. Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat

- grafting: a systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg* 2012; 46(2): 59-68. doi: 10.3109/2000656X.2012.668326
45. Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63(11): 1886-92. doi: 10.1016/j.bjps.2009.10.028
 46. Philips BJ, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cell-based soft tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(2): 155-63. doi: 10.1517/14712598.2012.644533
 47. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(3 Suppl): 121S-8S. doi: 10.1097/01.prs.0000234609.74811.2e
 48. Uzzan C, Boccara D, Lachere A, Mimoun M, Chaouat M. [Treatment of facial lipoatrophy by lipofilling in HIV infected patients: retrospective study on 317 patients on 9 years]. *Ann Chir Plast Esthet* 2012; 57(3): 210-6. doi: 10.1016/j.anplas.2011.11.005
 49. Mojallal A, Auxenfans C, Lequeux C, Braye F, Damour O. Influence of negative pressure when harvesting adipose tissue on cell yield of the stromal-vascular fraction. *Biomed Mater Eng* 2008; 18(4-5): 193-7. PMID: 19065021
 50. Fraser J, Wulur I, Alfonso Z, Zhu M, Wheeler E. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. *Cytotherapy* 2007; 9(5): 459-67. doi: 10.1080/14653240701358460
 51. Del Vecchio D, Rohrich RJ. A classification of clinical fat grafting: different problems, different solutions. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130(3): 511-22. doi: 10.1097/PRS.0b013e31825dbf8a
 52. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132(4): 1017-26. doi: 10.1097/PRS.0b013e31829fe1b0
 53. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 1973; 138(4): 745-53. doi: 10.1084/jem.138.4.745

54. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119(3):775-85; discussion 86-7. doi: 10.1097/01.prs.0000252001.59162.c9
55. Carpaneda CA, Ribeiro MT. Study of the histologic alterations and viability of the adipose graft in humans. *Aesthetic Plast Surg* 1993; 17(1): 43-7. doi: 10.1007/BF00455048
56. Eto H, Kato H, Suga H, Aoi N, Doi K, Kuno S, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129(5): 1081-92. doi: 10.1097/PRS.0b013e31824a2b19
57. Guyton AC. Interstitial Fluid Pressure. II. Pressure-Volume Curves of Interstitial Space. *Circ Res* 1965; 16: 452-60. doi: 10.1161/01.res.16.5.452
58. Milosevic MF, Fyles AW, Hill RP. The relationship between elevated interstitial fluid pressure and blood flow in tumors: a bioengineering analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43(5): 1111-23. doi: 10.1016/s0360-3016(98)00512-4
59. Hofer SO, Knight KM, Cooper-White JJ, O'Connor AJ, Perera JM, Romeo-Meeuw R, et al. Increasing the volume of vascularized tissue formation in engineered constructs: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(3): 1186-92; discussion 93-4.
60. Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83(2): 368-81. doi: 10.1097/00006534-198902000-00033
61. Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, et al. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(6): 1911-23. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181f4468b
62. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope* 2000; 110(8): 1333-8. doi: 10.1097/00005537-200008000-00021

63. 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* 2002; 48(1): 53-9. doi: 10.1097/00000637-200201000-00008
64. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006; 208(1): 64-76. doi: 10.1002/jcp.20636
65. Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, et al. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(3): 1033-41. doi: 10.1097/01.prs.0000299384.53131.87
66. Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Inoue K, Suga H, Kato H, et al. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120(6): 1510-7. doi: 10.1097/01.prs.0000288015.70922.e4
67. Premaratne GU, Ma LP, Fujita M, Lin X, Bollano E, Fu M. Stromal vascular fraction transplantation as an alternative therapy for ischemic heart failure: anti-inflammatory role. *J Cardiothorac Surg* 2011; 6: 43. doi: 10.1186/1749-8090-6-43
68. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007; 112(2): 61-7. doi: 10.1016/j.imlet.2007.07.003
69. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(4): R880-4. doi: 10.1152/ajpregu.00280.2006
70. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells:

- physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109(5): 656-63. doi: 10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61
71. 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* 2000; 106(6): 1375-87; discussion 88-9. doi: 10.1097/00006534-200011000-00026
 72. Erol OO, Agaoglu G. Facial rejuvenation with staged injections of cryopreserved fat and tissue cocktail: clinical outcomes in the past 10 years. *Aesthet Surg J* 2013; 33(5): 639-53. doi: 10.1177/1090820X13493904
 73. Smith AU, Lovelock JE, Parkes AS. Resuscitation of hamsters after supercooling or partial crystallization at body temperature below 0 degrees C. *Nature* 1954; 173(4415): 1136-7. doi: 10.1038/1731136a0
 74. Lovelock JE, Polge C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J* 1954; 58(4): 618-22. doi: 10.1042/bj0580618
 75. Lovelock JE. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* 1954; 56(2): 265-70. doi: 10.1042/bj0560265
 76. Lovelock JE. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proc R Soc Med* 1954; 47(1): 60-2. PMID: 13134172
 77. Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 11(1): 28-36. doi: 10.1016/0006-3002(53)90005-5
 78. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 10(3): 414-26. doi: 10.1016/0006-3002(53)90273-x
 79. Lovelock JE, Porterfield JS, Roden AT, Sommerville T, Andrewes CH. Further studies on the natural transmission of the common cold. *Lancet* 1952; 2(6736): 657-60. doi: 10.1016/s0140-6736(52)91502-x

80. Lovelock JE. Resuspension in plasma of human red blood-cells frozen in glycerol. *Lancet* 1952; 1(6721): 1238-9. doi: 10.1016/s0140-6736(52)92063-1
81. Andrewes CH, Lovelock JE, Sommerville T. An experiment on the transmission of colds. *Lancet* 1951; 1(6645): 25-7. doi: 10.1016/s0140-6736(51)93497-6
82. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347-69. doi: 10.1085/jgp.47.2.347
83. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg* 2001; 28(1): 111-9. PMID: 11248861
84. Butterwick KJ, Bevin AA, Iyer S. Fat transplantation using fresh versus frozen fat: a side-by-side two-hand comparison pilot study. *Dermatol Surg* 2006; 32(5): 640-4. doi: 10.1111/j.1524-4725.2006.32135.x
85. Seo JW, Sa HS. Periorbital Lipogranuloma Following Facial Autologous Fat Injections: Non-surgical Treatment. *Aesthetic Plast Surg* 2015; 39(6): 946-52. doi: 10.1007/s00266-015-0554-0
86. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; 168(3934): 939-49. doi: 10.1126/science.168.3934.939
87. MacRae JW, Tholpady SS, Ogle RC, Morgan RF. Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg* 2004; 52(3): 281-2; discussion 283. doi: 10.1097/01.sap.0000110559.58945.2e
88. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J* 2004; 24(6): 536-41. doi: 10.1016/j.asj.2004.09.002
89. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Cryopreservation of adipose tissues: the role of trehalose. *Aesthet Surg J* 2005; 25(2): 126-31. <https://doi.org/10.1016/j.asj.2005.01.003>

90. Shoshani O, Ullmann Y, Shupak A, Ramon Y, Gilhar A, Kehat I, et al. The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. *Dermatol Surg* 2001; 27(7): 645-7. doi: 10.1046/j.1524-4725.2001.00146.x
91. Lindquist S. Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. *Dev Biol* 1980; 77(2): 463-79. doi: 10.1016/0012-1606(80)90488-1
92. Shaik S, Hayes D, Gimble J, Devireddy R. Inducing Heat Shock Proteins Enhances the Stemness of Frozen-Thawed Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2017; 26(8): 608-16. doi: 10.1089/scd.2016.0289
93. Atik B, Ozturk G, Erdogan E, Tan O. Comparison of techniques for long-term storage of fat grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(7): 1533-7. doi: 10.1097/01.prs.0000240806.19404.a8
94. Moscatello DK, Dougherty M, Narins RS, Lawrence N. Cryopreservation of human fat for soft tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage. *Dermatol Surg* 2005; 31(11 Pt 2): 1506-10. doi: 10.2310/6350.2005.31235
95. Zheng W, Shen J, Wang H, Yin Y, Wang P, Jin P, et al. Effects of Frozen Stromal Vascular Fraction on the Survival of Cryopreserved Fat Tissue. *Aesthetic Plast Surg* 2019; 43(3): 826-35. DOI: 10.1007/s00266-019-01314-8
96. Lee JE, Kim I, Kim M. Adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells obtained from cryopreserved adipose aspirates. *Dermatol Surg* 2010; 36(7): 1078-83. doi: 10.1111/j.1524-4725.2010.01586.x
97. Li BW, Liao WC, Wu SH, Ma H. Cryopreservation of fat tissue and application in autologous fat graft: in vitro and in vivo study. *Aesthetic Plast Surg* 2012; 36(3): 714-22. doi: 10.1007/s00266-011-9848-z
98. Mashiko T, Wu SH, Kanayama K, Asahi R, Shirado T, Mori M, et al. Biological Properties and Therapeutic Value of Cryopreserved Fat Tissue.

- Plast Reconstr Surg 2018; 141(1): 104-15. doi: 10.1097/PRS.0000000000003952
99. Cui X, Pu LL. The search for a useful method for the optimal cryopreservation of adipose aspirates: part I. In vitro study. *Aesthet Surg J* 2009; 29(3): 248-52. doi: 10.1016/j.asj.2009.02.016
 100. Cui XD, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Pu LL. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology* 2007; 55(3): 269-78. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.08.012
 101. Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N. Cryopreservation of mature human adipocytes: in vitro measurement of viability. *Ann Plast Surg* 2005; 55(4): 408-13. doi: 10.1097/01.sap.0000181345.56084.7d
 102. Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE, Jr., Vasconez HC. Cryopreservation of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique. *Ann Plast Surg* 2010; 64(3): 333-7. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181b022cb
 103. Pu LL, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(6): 1845-50. doi: 10.1097/01.prs.0000209931.24781.9c
 104. Thirumala S, Wu X, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(4): 783-92. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0552
 105. Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, et al. Evaluation of Serum-Free, Xeno-Free Cryopreservation Solutions for Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Med* 2017; 9(1-2): 15-20. DOI: 10.3727/215517916X693122
 106. Kim DY, Kim E, Kim KJ, Jun YJ, Rhie JW. Cryopreservation of lipoaspirates: in vitro measurement of the viability of adipose-derived stem

- cell and lipid peroxidation. *Int Wound J* 2020; 17(5): 1282-90. doi: 10.1111/iwj.13380
107. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 1996; 17(3): 243-56. doi: 10.1016/0142-9612(96)85562-1
 108. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 2009; 5(3): 119-26. doi: 10.4161/org.5.3.9583
 109. Feng J, Hu W, Fanai ML, Zhu S, Wang J, Cai J, et al. Mechanical process prior to cryopreservation of lipoaspirates maintains extracellular matrix integrity and cell viability: evaluation of the retention and regenerative potential of cryopreserved fat-derived product after fat grafting. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 283. doi: 10.1186/s13287-019-1395-6
 110. Zanata F, Bowles A, Frazier T, Curley JL, Bunnell BA, Wu X, et al. Effect of Cryopreservation on Human Adipose Tissue and Isolated Stromal Vascular Fraction Cells: In Vitro and In Vivo Analyses. *Plast Reconstr Surg* 2018; 141(2): 232e-43e. doi: 10.1097/PRS.0000000000004030
 111. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(4): 659-67. doi: 10.1089/ten.TEC.2008.0674
 112. Goh BC, Thirumala S, Kilroy G, Devireddy RV, Gimble JM. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(4): 322-4. doi: 10.1002/term.35
 113. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(2): 401-10. doi: 10.1097/01.prs.0000298322.70032.bc

114. Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology* 2008; 57(1): 18-24. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.04.002
115. Mambelli LI, Santos EJ, Frazao PJ, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa AL, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(1): 87-94. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0186
116. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant* 2012; 21(2-3): 617-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368911X605556>
117. Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Miyazaki T, Kato R, Kitagawa Y, et al. Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. *Cell Transplant* 2008; 17(1-2): 35-41. doi: 10.3727/000000008783906937
118. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19(4): 513-22. doi: 10.1089/scd.2009.0173
119. Zanata F, Shaik S, Devireddy RV, Wu X, Ferreira LM, Gimble JM. Cryopreserved Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells: Potential for Applications in Clinic and Therapy. *Adv Exp Med Biol* 2016; 951: 137-46. doi: 10.1007/978-3-319-45457-3_11
120. Atashroo DA, Paik KJ, Chung MT, McArdle A, Senarath-Yapa K, Zielins ER, et al. Assessment of viability of human fat injection into nude mice with micro-computed tomography. *J Vis Exp* 2015(95): e52217. doi: 10.3791/52217
121. Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, et al. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab* 2009; 9(1): 99-109. doi: 10.1016/j.cmet.2008.11.009

122. Laschke MW, Karschnia P, Scheuer C, Hess A, Metzger W, Menger MD. Effects of cryopreservation on adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(4): 1020-30. doi: 10.1002/term.2591
123. Evangelista-Vargas S, Santiani A. Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation during cryopreservation of alpaca spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2017; 52(5): 819-24. doi: 10.1111/rda.12984
124. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med* 2014; 12: 8. doi: 10.1186/1479-5876-12-8
125. Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Anghel E, Maan ZN, Whittam AJ, et al. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 2014; 4: 7144. doi: 10.1038/srep07144
126. Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, Maredziak M, Smieszek A. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 309169. doi: 10.1155/2015/309169