

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON VE
PLATELET ZENGİN FİBRİNİN
SUBDERMAL ENJEKSİYONUNUN DERİ
KOMPONENTLERİNE ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

HASİP ŞAMİL YAZGAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2018

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON VE
PLATELET ZENGİN FİBRİNİN
SUBDERMAL ENJEKSİYONUNUN DERİ
KOMPONENTLERİNE ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

HASİP ŞAMİL YAZGAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Mustafa Yılmaz

İZMİR-2018

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Derinin Embriyolojisi, Histolojisi-Fizyolojisi, Kanlanması	7
2.1.1. Derinin Embriyolojisi	7
2.1.2. Derinin Histolojisi ve Fizyolojisi:.....	12
1- Epidermis.....	13
2- Dermis	15
3- Subkutan doku.....	23
2.1.3. Derinin Kanlanması:.....	24
2.2 Yaşlanma	25
2.2.1 Yaşlanmanın moleküler mekanizmaları.....	25
Oksidatif stres:	25
Hücrel yaşlanma ve Telomerler:.....	26
Apoptozis:.....	28
Diyet:	28
İntraselüler sinyal yolları ve matris metalloproteinazlar:	29
Vasküler değişiklikler:	29
Sitokinler:	29
Çevresel faktörler:.....	29
2.2.2 Yaşlanmanın klinik bulguları.....	30
Epidermiste olan değişiklikler:.....	30
Dermiste olan Değişiklikler:	32
Subkutan dokuda olan değişiklikler:	34
Non-invazif Tedavi Seçenekleri:.....	36
a-Kurumuş Deri Bakımı:.....	36
b-Hassas Deri Bakımı:	36
c-Pigmente Deri Bakımı:	37
d-Kırışmış Deri Bakımı:	38
İnvazif Tedavi Seçenekleri:	38
a- Yüzey yenileme teknikleri	38
b- Botulinum toksini uygulamaları	38
c- Yumuşak doku dolguları.....	39
d- Biyoyarıcı ajan enjeksiyonları.....	41
Plateletten Zengin Plazma (PRP) ve Plateletten Zengin Fibrin (PRF)	42
Yağ Grefti ve Stromal Vasküler Fraksiyon.....	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	50
3.1 Deney Hayvanları	50
Deney Hayvanlarının Bakımı.....	50
Anestezi şekli.....	50
Hayvan Modeli	50
Deney Grupları	51
3.2 Cerrahi Yöntem (İnguinal Diseksiyon ile Adipöz Doku Elde Edilmesi) ...	52

3.3	Plateletten Zengin Fibrin Elde Edilmesi.....	55
3.4	Yağ grefti ve Stromal Vasküler Fraksiyon Elde Edilmesi	57
3.5	Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Doku Örneklerinin Alınması...	61
3.6	Histolojik Değerlendirme	61
3.6.1	Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom boyama incelemesi.....	62
3.6.2	İmmünohistokimyasal inceleme	64
3.7	İstatistiksel Değerlendirme	66
4.	BULGULAR.....	67
4.1	Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom Boyama Bulguları	67
4.1.1	SF Grubuna ait bulgular	69
4.1.2	SVF + PRF Grubuna Ait Bulgular.....	71
4.1.3	SVF Grubuna Ait Bulgular.....	73
4.1.4	PRF Grubuna Ait Bulgular	74
4.2	İmmünohistokimyasal Değerlendirme Bulguları.....	76
5.	TARTIŞMA	80
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	96
7.	KAYNAKLAR.....	98

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Derinin fonksiyonları ve bu fonksiyonları gerçekleştiren yapılar	8
Tablo 2: Bazı kollajen tipleri ve yaygın lokalizasyonları	17
Tablo 3: Spesifik glikozaminoglikanlar ve özellikleri.....	22
Tablo 4: Glogau deri yaşlanma skalası ve tedavi seçenekleri	31
Tablo 5: Yaşlanma ile deride oluşan değişiklikler ve klinik sonuçları.....	35
Tablo 6: Deri gençleştirme tedavi seçeneklerinin sınıflandırılması	37
Tablo 7: İdeal dolgu maddesinden beklenen özellikler	40
Tablo 8: Yumuşak doku dolgularının sınıflandırılması.....	41
Tablo 9: Deney grupları ve yapılan işlemler.....	52
Tablo 10: Hematoksilen-eozin boyama protokolü	62
Tablo 11: Masson-trikrom boyama protokolü.....	64
Tablo 12: İmmünohistokimyasal boyama protokolü	65
Tablo 13: Dermal kalınlık değerleri	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnsanda epidermisin gelişim aşamaları	9
Şekil 2: Epidermisin tabakaları ve epidermiste yer alan hücreler.....	10
Şekil 3: Kıl folikülü gelişimi	11
Şekil 4: Ter bezlerinin gelişimi.....	12
Şekil 5: Epidermisin katmanları	14
Şekil 6: Kollajen tarafından oluşturulabilen supramoleküler biçimler	18
Şekil 7: Kollajen sentezinin aşamaları	19
Şekil 8: Fibroblastın yapısı.....	23
Şekil 9: Derinin kanlanması.....	24
Şekil 10: Hücresel yaşlanmanın neden ve sonuçları.....	27
Şekil 11: Yaşlanmanın deri bulguları	30
Şekil 12: Subkutan dokuda ultraviyole ışın maruziyetinin etkisi	34
Şekil 13: Koagülasyon kaskadı.....	43
Şekil 14: Lipoaspirat	46
Şekil 15: Yağ dokusunun yapısı ve içeriğindeki hücrelerin şematik görünümü.....	47
Şekil 16: Hayvan modeli.....	51
Şekil 17: Deney grupları	52
Şekil 18: Deneysel grupların dizaynı ve zamana göre grupların değişimi.....	53
Şekil 19: İnguinal bölgenin tıraşlanması sonrasında preoperatif görünümü	54
Şekil 20: Deri insizyonu sonrasındaki görünüm	54
Şekil 21: İnguinal yağ yastıkçıklarının yerleşimi	55
Şekil 22: Yağ doku elde edildikten sonra insizyon hattının kapatılması.....	55
Şekil 23: Tam kandan santrifüj ile elde edilmiş PRF	56
Şekil 24: Santrifüj cihazı.....	57
Şekil 25: Kullanılan santrifüj temelli karıştırıcı mekanizmanın şematik görünümü	59
Şekil 26: Elde edilen SVF'nin hematoksilen-eozin boyama görüntüleri.....	60
Şekil 27: Akım sitometrisi analizlerine ait grafikler.....	60
Şekil 28: Akım sitometrisi analizlerine ait grafikler.....	61
Şekil 29: Tavşan kulağının kesitine ait genel histolojik görünüm.....	67
Şekil 30: Dermal kalınlık değerleri grafiği	68
Şekil 31: Zamana göre dermal kalınlık değişimi grafiği.....	69
Şekil 32: Serum fizyolojik grubuna ait hematoksilen-eozin boyama görüntüleri	70
Şekil 33: Birinci haftada dermiste gözlenen hemorajik alan.....	70
Şekil 34: Serum fizyolojik grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri	71
Şekil 35: SVF + PRF grubuna ait hematoksilen-eozin boyama görüntüleri	72
Şekil 36: Perivasküler hiperselüler alanlar.....	72
Şekil 37: SVF + PRF grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri.....	73
Şekil 38: SVF grubuna ait hematoksilen-eozin boyama görüntüleri	74
Şekil 39: SVF grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri	74
Şekil 40: PRF grubuna ait hematoksilen-eozin boyama görüntüleri	75
Şekil 41: PRF grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri	76
Şekil 42: Mikrovasküler yoğunluk grafiği	77
Şekil 43: SF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri.....	77
Şekil 44: SVF+ PRF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri.....	78
Şekil 45: SVF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri	78
Şekil 46: PRF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri	79
Şekil 47: Ki-67 boyama	79

KISALTMALAR

SVF: Stromal vasküler fraksiyon

PRF: Platelet rich fibrin-Plateletten zengin fibrin

GAG: Glikozaminoglikan

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

PG: Proteoglikan

DNA: Deoksiribonükleik asit

UV: Ultraviyole

IPL: İntense pulsed light- Yoğun atımlı ışık

PRP: Platelet rich plasma- Plateletten zengin plazma

PDGF: Platelet derived growth factor- Plateletten türemiş büyüme faktörü

TGF- β : Transforming growth factor beta- Dönüştürücü büyüme faktörü beta

VEGF: Vascular endothelial growth factor-Vasküler endotelyal büyüme faktörü

EGF: Epithelial growth factor- Epitelyal büyüme faktörü

IGF: Insulin like growth factor- İnsülin benzeri büyüme faktörü

FGF: Fibroblast growth factor- Fibroblast büyüme faktörü

ECGF: Endothelial cell growth factor- Endotelyal hücre büyüme faktörü

PDAF: Platelet derived angiogenesis factor-Plateletten türemiş anjiogenez faktörü

KGF: Keratinocyte growth factor-Keratinosit büyüme faktörü

HGF: Hepatocyte growth factor- Hepatosit büyüme faktörü

IGF: Insulin growth factor- İnsülin büyüme faktörü

BDNF: Brain derived neurotrophic factor- Beyinden türemiş büyüme faktörü

SF: Serum fizyolojik

TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

IL-1: İnterlökin-1

IL-6: İnterlökin-6

FDA: U.S Food and Drug Administration- Amerika Gıda ve İlaç Dairesi

TEŞEKKÜR

Başta annem ve babam olmak üzere bütün eğitim hayatım ve sosyal yaşamımda destek ve sevgisini esirgemeyen aileme, plastik cerrahi eğitimim sırasında büyük emeği olan hocalarıma, yardımlarından dolayı asistan arkadaşlarıma ve tüm plastik cerrahi kliniği çalışanlarına teşekkürlerimle...



STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON VE PLATELETEN ZENGİN FİBRİNİN SUBDERMAL ENJEKSİYONUNUN DERİ KOMPONENTLERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hasip Şamil Yazgan, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

h.samilyazgan@gmail.com

ÖZET

Amaç: İntrinsik ve ekstrinsik mekanizmalarla gerçekleşen yaşlanma süreci kendisini birçok bulgu ile göstermektedir. Bu bulguların en belirgin ve göze çarpan şekli deri bulgularıdır. (1, 2) Bu çalışmada serum fizyolojik (SF), otolog plateletten zengin fibrin (PRF) ve otolog stromal vasküler fraksiyon (SVF) tavşan kulağına tek doz olarak subdermal olarak enjekte edilmiş ve deri komponentlerine histolojik düzeyde etkileri değerlendirilmiştir. Yaşlanmanın deri bulgularını yavaşlatmak ya da önlemek amacıyla kullanılabilecek proliferatif bir etkinin varlığı araştırılmıştır.

Yöntem: Çalışma 24 adet 8-12 aylık, 2,5-3 kg ağırlığında dişi Yeni Zelanda tavşanın 48 kulağında yapıldı. Her bir denekten 20-25 ml inguinal yağ yastıkçığı eksize edilerek SVF ve tam kan alınarak PRF elde edildi. Birinci grupta, deneklerin kulaklarına 2 ml serum fizyolojik; ikinci grupta 1 ml SVF + 1 ml PRF kombinasyonu; üçüncü grupta 2 ml SVF ve dördüncü grupta 2 ml PRF enjeksiyonu yapıldı. Birinci hafta, birinci ay, ikinci ay ve üçüncü ay sonunda; her bir zaman diliminde tüm gruplardan üçer adet denekten doku örneği alınarak histomorfometrik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Gruplar arasında yapılan histomorfometrik incelemelerde dermal kalınlık, mikrovasküler yoğunluk ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bunun yanında bu parametrelerin değerlendirildiği birçok ikili karşılaştırma sonucunda istatistiksel anlamlılık sınırında ($p=0,05$) fark saptandı. İstatistiksel anlamlılık sınırında ($p=0,05$) fark saptanan SVF+PRF ve SVF gruplarının SF grubuna göre üçüncü ayda mikrovasküler yoğunluğu fazlaydı. PRF grubunda ise daha erken ve kısa süreli etki ile uyumlu olarak birinci hafta değerleri SF grubuna göre yüksek saptandı. Bu değerler yanında fokal selüler

proliferasyon izlenen alanlar SVF+PRF ve SVF gruplarında PRF ve SF gruplarına göre daha fazla izlendi.

Sonuç: Bu çalışmada tek doz PRF ya da SVF uygulaması ile beklenen proliferatif ve rejeneratif etki histolojik olarak anlamlı fark oluşturacak şekilde ortaya konamamıştır. Bunun yanında doku düzeyinde fokal selüler ve ekstraselüler proliferatif etkiler izlenmiştir. SVF ve PRF'nin ılımlı proliferatif etkileri nedeniyle anlamlı sonuçların elde edilebilmesi için tekrarlayan dozlarda uygulandıkları ve daha fazla denek sayısını içeren çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Stromal vasküler fraksiyon, plateletten zengin fibrin, plateletten zengin plazma, yaşlanma

SUBDERMAL INJECTION OF STROMAL VASCULAR FRACTION AND PLATELET RICH FIBRIN; EVALUATION OF EFFECTS TO THE SKIN COMPONENTS

Hasip Şamil Yazgan, Dokuz Eylül University Faculty of Medicine
h.samilyazgan@gmail.com

ABSTRACT

Aim: Aging process occurs by intrinsically and extrinsically mechanisms. Signs of aging becomes prominent over a period of time. Skin changes are the most significant findings in aging process. (1, 2) In this study, histological changes were evaluated after single injection of normal saline solution (SF), autologous platelet rich fibrin (PRF) and stromal vascular fraction (SVF) on rabbit ear model. The aim of this study is obtaining a proliferative effect that can be used to prevent or decrease the skin changes that occurs by aging process.

Material and Method: In this study, 48 ears in 24 New Zealand rabbits (8-12 month age; 2.5-3 kg; female) were used. In every single rabbit, 20-25 ml of inguinal fat was harvested for obtaining SVF and 5 ml of whole blood for obtaining PRF. In the first group 2 ml of saline, in the second group 1 ml of SVF and 1 ml of PRF, in the third group 2 ml of SVF and finally in the fourth group 2 ml of PRF were injected subcutaneously. At the end of first week, first month, second month and third month; tissue samples were collected for histological examination from three rabbit ears in every single group.

Results: Statistical evaluation of dermal thickness, microvascular density showed no significant difference but many of the comparisons had a critical statistical difference value ($p=0.05$). Statistical comparisons of microvascular density between SF group and SVF+PRF and SVF groups had this critical difference value ($p=0.05$) in the third month. Microvascular density of SVF+PRF and SVF groups were greater than SF group. Comparison between PRF group in the first week and SF group in both the first week and third month showed a critical difference value ($p=0.05$) too. PRF group had a greater microvascular density than SF group

as expected in an early and short lasting effect. Additionally, SVF+PRF and SVF groups had more focal cellular proliferation zones than PRF and SF groups.

Conclusion: In this study, expected proliferative and regenerative effects of single injection of SVF and PRF showed no statistically significant histological difference. Despite this, focal cellular and extracellular proliferative effects were evaluated. This study shows us the need for another study that includes repeated injections of SVF and PRF on more animal subjects.

Keywords: Stromal vascular fraction, platelet rich fibrin, platelet rich plasma, aging



1. GİRİŞ ve AMAC

Yaşlanma çok çeşitli organ, doku ve hücrede farklı şekillerde varlığını gösteren değişiklikler bütünüdür. Deri yaşlanması da mozaik şeklindeki bu oluşumun önemli bir parçasıdır. İç organlardaki yaşlanma bulguları çevredeki insanlar tarafından görülemeyecek şekilde maskelenmiş olsa da deri bulguları yaşlanmanın en belirgin bulgularını insanlara sunar. (3) Kırıklıklar ve diğer deri bulguları yaşlanmanın gözle görülen en önemli belirtisidir. Deri bulgularının oluşumunda yaş, genetik, ultraviyole ışınlar, yerçekimi, çevresel faktörler, hormonal değişiklikler, beslenme ve sigara gibi birçok intrinsik ve ekstrinsik faktör rol oynar. (2)

Deri ve eklerinde yaşlanmaya bağlı gelişen değişiklikler intrinsik (kronolojik) ve ekstrinsik (çoğunlukla güneş etkisi) mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Yaşa bağlı deri değişiklikleri 20'li yaşlarda başlamasına rağmen intrinsik yaşlanmanın deri bulgularının gözle görülür hale gelmesi uzun yıllar sürebilir. Ekstrinsik yaşlanma ise bu bulguların daha genç yaşlarda ortaya çıkmasına neden olabilir. (1)

Sağlıklı deriye sahip olmak gerçek yaştan uzak, saf ve sağlıklı bir görünüme ulaşmanın önemli bir yolu olarak görülmektedir. Bu nedenle neredeyse tüm toplum tarafından amaçlanmaktadır ve bu amaç ile büyük araştırmalar ve harcamalar yapılmaktadır. Buna rağmen birçok kişi bu hedefe ulaşamamaktadır. (3)

Riditektomi gibi cerrahi girişimler, fiziksel ve kimyasal minimal invaziv yüzey yenileme teknikleri, botulinum toksini uygulamaları, biyoyarıcı ajan enjeksiyonları (mezoterapi), koruyucu ya da tedavi edici topikal kozmetik ajan uygulamaları, otolog ya da sentetik yumuşak doku dolgusu uygulamaları yaşlanma bulgularının önlenmesi ya da geciktirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. (1, 5-7)

1980'lerden bu yana otolog yağ transplantasyonu plastik cerrahi tarafından uygulanan en popüler prosedürlerden biri haline gelmiştir. (8) Otolog yağ grefti rekonstrüktif cerrahi gibi estetik cerrahide de sıklıkla kullanılmaktadır ve çoğunlukla liposakşın yoluyla elde edilmektedir. (8) Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin en popüler uygulamalarından biri olan liposakşın uygulaması 1974'te Fisher tarafından tanımlanmıştır. Liposakşın tekniğinin tanımlanması ile birlikte 1985'te Klein tarafından tümesan liposakşın tekniğinin tanımlanması otolog yağ doku transplantasyonunun gelişimini hızlandırmıştır. (9, 10)

Otolog yağ dolgularının öngörülemeyen rezorpsiyon oranları ve hyaluronik asit, sığır kollajeni, polimetil metakrilat, kalsiyum hidroksiapatit gibi dolgu maddelerinin getirdiği birçok dezavantaj yağ greftlerinin yaşayabilirliğini artıran yeni yöntemlerin bulunmasını

zorunlu kılınıştır. (11) Bu amaçla yapılan birçok çalışmada kök hücreden zenginleştirilmiş yağ greftleri ve tam kandan elde edilen platelet konsantreleri kullanılmıştır. (12-14) Kök hücreden zengin yağ grefti elde edilmesi aşamasında kullanılan stromal vasküler fraksiyon hücreleri (SVF) ve platelet konsantrelerinin (plateletten zengin plazma ve plateletten zengin fibrin) yağ grefti viabilitelerini artırdığı görülmüştür. (12, 15, 16) Bunun yanında bu bileşenlerin dermis ve subkutan dokuda proliferatif etkileri olduğu görülmüştür. SVF ve platelet konsantrelerinin yaşlanmanın bulgularını azaltabilecek etkilerini gösteren çalışmalar da mevcuttur. (17-19)

Bu alışmada SVF ve plateletten zengin fibrinin (Platelet Rich Fibrin, PRF) dermal ve subdermal doku bileşenlerine etkisi araştırılarak bu bileşenlerin kombine kullanımının dermal ve subdermal doku bileşenleri üzerindeki proliferatif etkileri incelenmiştir.

Çalışmanın amacı otolog olan, maliyeti düşük olan ve kolay elde edilebilen bu bileşenlerin kullanımı sonrasında beklenen proliferatif etki ile yaşlanmanın bulgularını azaltmaktır. Beklenen etkilerin gözlenmesi durumunda SVF ve PRF içerikli otolog doku uygulamalarının bu yönde kullanım alanı genişleyebilecektir. Hiçbir kimyasal bileşeni olmayan, enzimatik süreç gerektirmeksizin elde edilen bu bileşenlerin; günümüzde yaygın kullanım alanı olan, yüksek maliyetli, sentetik ve güvenilirliği tartışmalı olan birçok farklı tekniğe karşı uygun bir alternatif olması ve bu alanda yapılabilecek çalışmaların nn aması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Yaşa bağlı deri değişiklikleri 20’li yaşlarda başlamasına rağmen intrinsik yaşlanmanın deri bulgularının gözle görülür hale gelmesi uzun yıllar sürebilir. İnce kırışıklıklar, ince ve şeffaf deri yapısı, deri altı yağ dokusunun kaybı (buna bağlı çökmüş görünümlü yanak ve orbita), el ve boyun derisinde elastikiyet kaybı, kemik kaybına sekonder gelişen deride büzüşme, kaşınma ile sonuçlanabilen deri kuruluğu, ısı düzenlemesini sağlamak için gerekli miktarda terlemenin olmaması, saç ve tüy kaybı, tüylerde ve saçlarda beyazlaşma, istenmeyen tüylerin gelişmesi, tırnak yatağının incelmesi ve tırnak yapısında bozulma yaşlanmanın deri bulgularıdır. Normal yaşlanma sürecinde izlenen bu değişikliklerin hızını genler kontrol eder. (1)

Yaşlanmaya bağlı deri değişiklikleri ancak yaşlanmış derinin normal, genç deri ile karşılaştırılmasıyla anlaşılabilir. (20)

2.1 Derinin Embriyolojisi, Histolojisi-Fizyolojisi, Kanlanması

Deri vücuttaki en büyük organdır. Çevre ile sınır oluşturan ve çevre ile etkileşimi sağlayan yapıdır. (21) Derinin yapısı, barındırdığı hücre tipleri, özelleşmiş ekleri ve yüzeyel yerleşimi çok sayıda fonksiyonu yerine getirmesini sağlamaktadır. (22) (Tablo 1)

2.1.1. Derinin Embriyolojisi

Deri yüzey ektodermi ve onun altındaki mezenşimden köken alan iki tabakadan ve bu iki tabakanın daha derininde yer alan pannikulus adipozus ya da diğer adıyla ‘subkutis’ tabakalarından oluşur. Epidermis yüzey ektoderminden gelişen yüzeyel epitel dokudur. Dermis mezoderm kökenli olan mezenşimden gelişmiş sıkı bağ dokusundan oluşan daha derin tabakadır. (23)

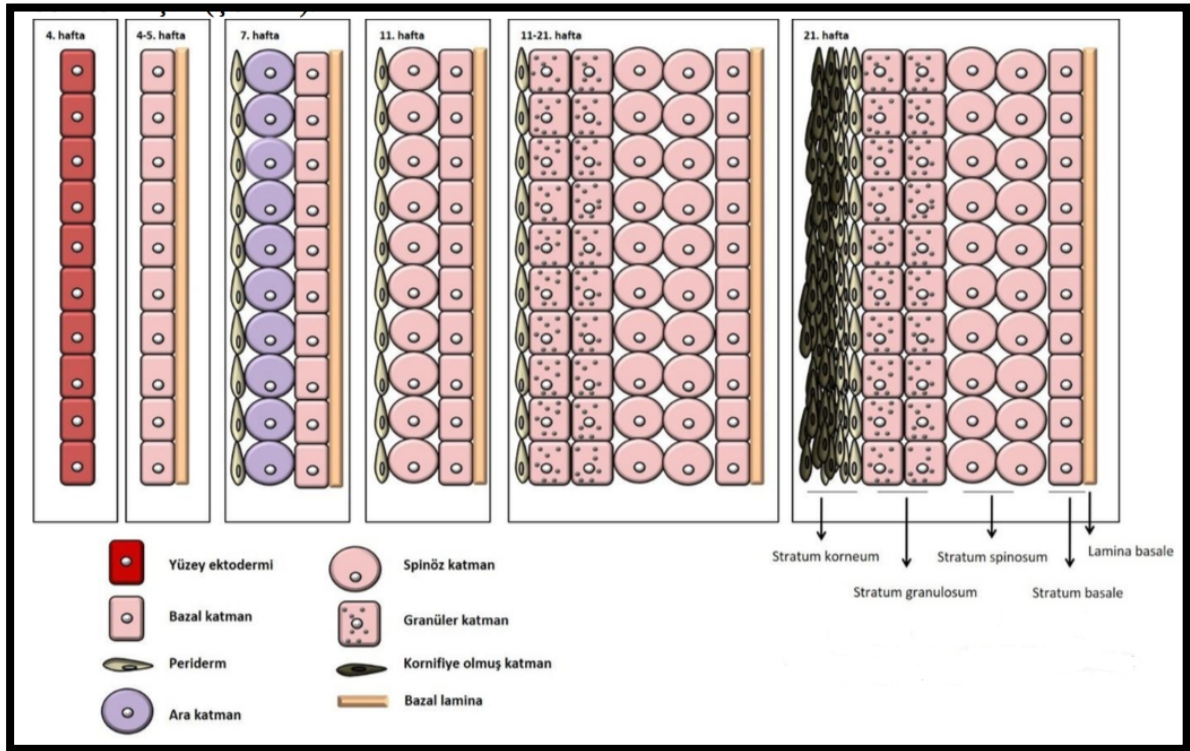
İntrauterin hayatta başlangıçta embriyonun yüzeyi tek katlı ektodermal hücrelerden oluşan bir tabakayla örtülüdür ve bu tabakadan sinir sistemi ile birlikte epidermis gelişir. (24) Bu tek katlı tabakayı oluşturan hücreler diferansiye olmamış, küboid yapıda, glikojen depolayan hücrelerdir. (25) Dördüncü haftanın sonunda tek katlı hücre tabakasının daha yüzeyelinde ikinci bir hücre tabakası oluşur. Periderm olarak adlandırılan bu skuamöz hücre tabakası tamamen embriyonik bir yapıdır ve intrauterin gelişim sırasında kaybolur. (25) İlerleyen günlerde bazal tabakadan köken alan periderm hücreleri keratinizasyona ve alttan gelen yeni hücrelerle yer değiştirerek deskuamasyona uğrar. Bazal tabaka hücreleri daha sonra ‘stratum germinativum’ olarak adlandırılır. (23) Sekizinci ve on birinci haftalar arasında

germinal tabaka proliferasyona uğrayarak, periderm tabakasının altında ikinci bir tabaka olan “ara tabakayı” oluşturur. Burada bahsedilen yeni tabakanın gelişmesi ve germinatif tabakanın devamı embriyonik bazal keratinositlerin asimetric hücresel bölünmesine bağlıdır. (26, 27) Dördüncü ay tamamlandığında erişkin derisini oluşturan tabakaların hepsi fetüste ayırt edilebilecek şekilde gelişmiştir. 24. haftada ise periderm tabakası ile birlikte lanugo tüyleri, sebum ve diğer artık materyallerden oluşan “verniks kazeoza” amniyotik sıvıya dökülerek kaybolur. (25) (Şekil 1)

Tablo 1: Derinin fonksiyonları ve bu fonksiyonları gerçekleştiren yapılar

Fonksiyon	Yapı/Hücre
Koruma Kimyasal, partikül Ultraviyole radyasyon Antijen, hapten Mikroorganizmalar	Epidermis Melanosit Langerhans Hücreleri Langerhans Hücreleri
Dengelenmiş iç yapının korunması	Epidermis
Sıvı, elektrolit ve makromolekül kaybının önlenmesi	Epidermis
Şok emme özelliği	Dermis-Subkutan doku
Isı regülasyonu	Kan damarları Ekrin ter bezleri
Yalıtım	Subkutan yağ
Duyu	Özel sinir sonlanmaları
Nemlendirme	Sebase glandlar
Koruma ve kazıma	Tırnak
Enerji depolama	Subkutan yağ
D-Vitamini sentezi	Keratinosit
Vücut kokusu-Feromon salgısı	Apokrin ter bezleri
Dış görünüş	Saç, tırnak, dudak gibi özelleşmiş yapılar

Embriyolojik gelişimin ilk üç ayında nöral krest hücreleri melanin pigmenti üreten melanoblastları (sonrasında melanosit) oluşturmak üzere epidermise ve kıl foliküllerine göç eder. (28) Nöral tüpün kapanması ile birlikte nöral krest hücreleri önce melanoblastlara farklılaşmak üzere dermise, daha sonra da melanositleri oluşturmak üzere dermoepidermal bileşkeye göç eder. Bu şekilde yaklaşık olarak intrauterin 40-50. günlerden sonra embriyonik ve fetal deride melanositler saptanabilmektedir. (29) (Şekil 2)



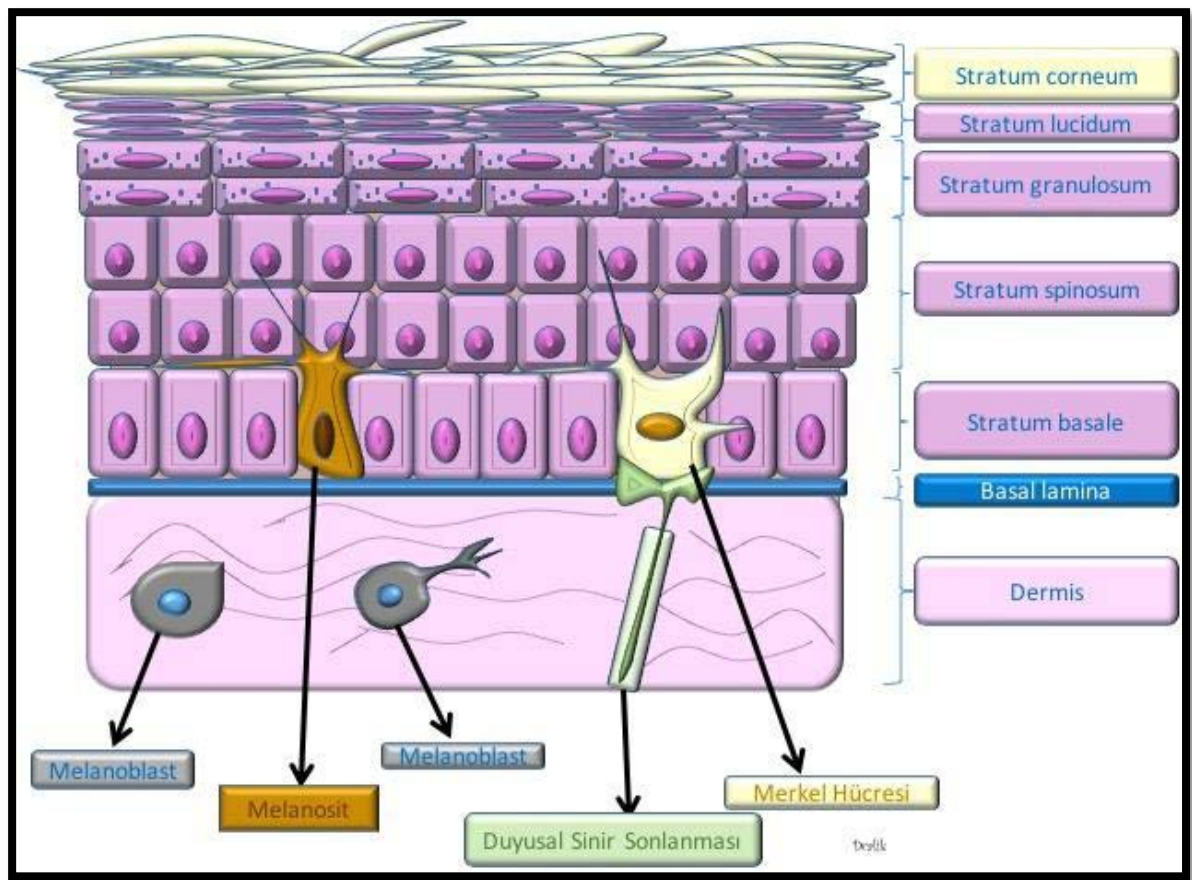
Şekil 1: İnsanda epiderminin gelişim aşamaları (30)

Dermis ise somatik plevra ve dermatomlardan köken alan mezenkimden gelişerek epidermis tabakasının altına yerleşir. Baş ve boyun bölgesinde ise nöral krestten göç eden hücrelerden kaynaklanır. (23) Başlangıçta ortaya çıkan “primordial dermis” incelendiğinde yüksek hücre yoğunluğu, sıvı oranı yüksek ekstraselüler matriks, bol miktarda glikojen ve hyaluronik asit kompozisyonu dikkat çeker. Primordial dermiste görülen bu yoğun hücre grubu üçüncü ayda büyük oranda fibroblastlara dönüşür. Fibroblastlar elastik lifler ve özellikle tip-1,4 kollajenden oluşan fibröz ekstraselüler matriksi sentezler. Bu dönüşümle birlikte matür dermis gelişimi gerçekleşir. (23)

Dördüncü ayda ilk olarak palmar ve plantar alanlarda epidermal kalınlaşma bölgeleri dermise uzanmaya başlar. Altıncı ayda bu kalınlaşmalar deri yüzeyinde kabarıklıklar şeklinde

görülebılır. Bu değışiklik başlamadan önce dermoepidermal bileşke düzdür. Dermise uzanan epidermal katlantılar kişiyeye özgü ve kalıcı hallerine intrauterin hayatın ikinci yarısında ulaşır. (31) Dermoepidermal bileşkede epidermal uzantıların ve dermal papillaların oluşturduğu dalgalı yapı sayesinde dermis ile epidermis arasındaki bağlantı güçlenir. Dermal papillaların oluşması ile birlikte dermis papiller ve retiküler dermis olarak iki katmana ayrılır. Daha gevşek liflerin olduğu yüzeyel katman papiller dermisi oluştururken; derin ve yoğun kollajen liflerin olduğu katman retiküler dermisi oluşturur. (23)

Ayrıca dermis gelişirken taktıl reseptörler (Meissner, Paccini, Ruffini korpüskülleri), sinir sonlanmaları, adneksiyal yapılar da görülmeye başlar. (23)



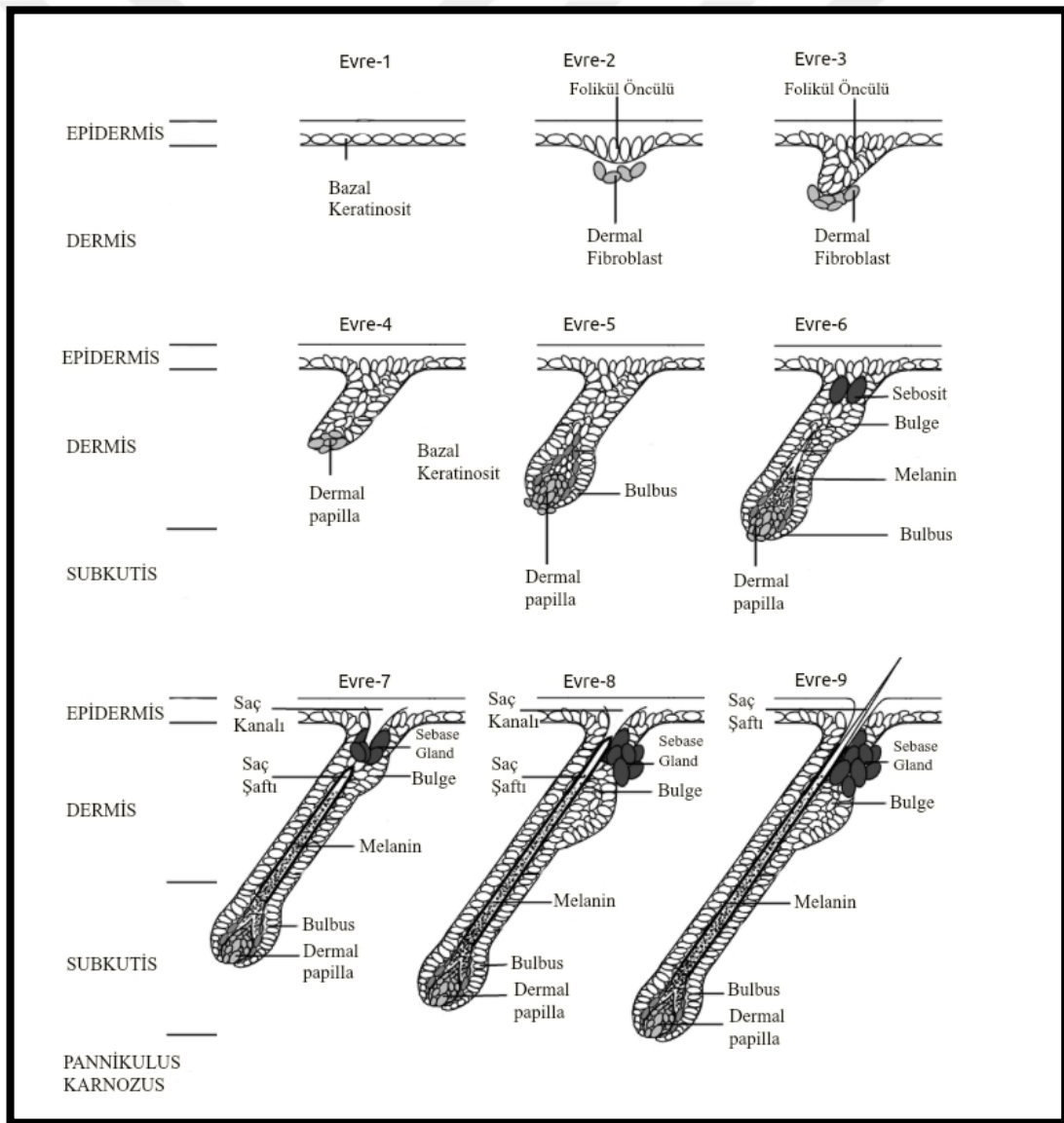
Şekil 2: Epiderminin tabakaları ve epidermiste yer alan hücreler (30)

Kıl folikülleri 9-12. haftalarda stratum germinativum tabakasının dermise doğru proliferasyonu ile gelişmeye başlar. (Şekil 3) Primordiyal foliküldeki epitel hücreleri sonraki dönemde kıl büyümesine kaynak oluşturan germinal matriksi oluşturur. Kıllar 12. haftanın sonunda ilk olarak dudak, kaş ve çene bölgelerinde oluşmasına karşın yaklaşık olarak 20.

haftada görünür hale gelerek “lanugo tüylerini” oluşturur. Bu kılların yerini yaşamın ilerleyen dönemlerinde daha kaba ve belirgin kıllar alır. (32, 33)

Sebase glandlara ait duktus ve alveoler yapılar kıl folikülünün kök kısmında mevcut epitelyal hücrelerin çevredeki mezenkimal dokuya tomurcuklanmasıyla oluşur. Duktus ve sekretuar bölümler gelişir. Sebase glandların sekretuar kısmında bulunan santral alveoler hücreler yıkılarak sebum oluşumuna katılır. Salgılanan sebum verniks kazeozanın yapısına katılır. (30, 32)

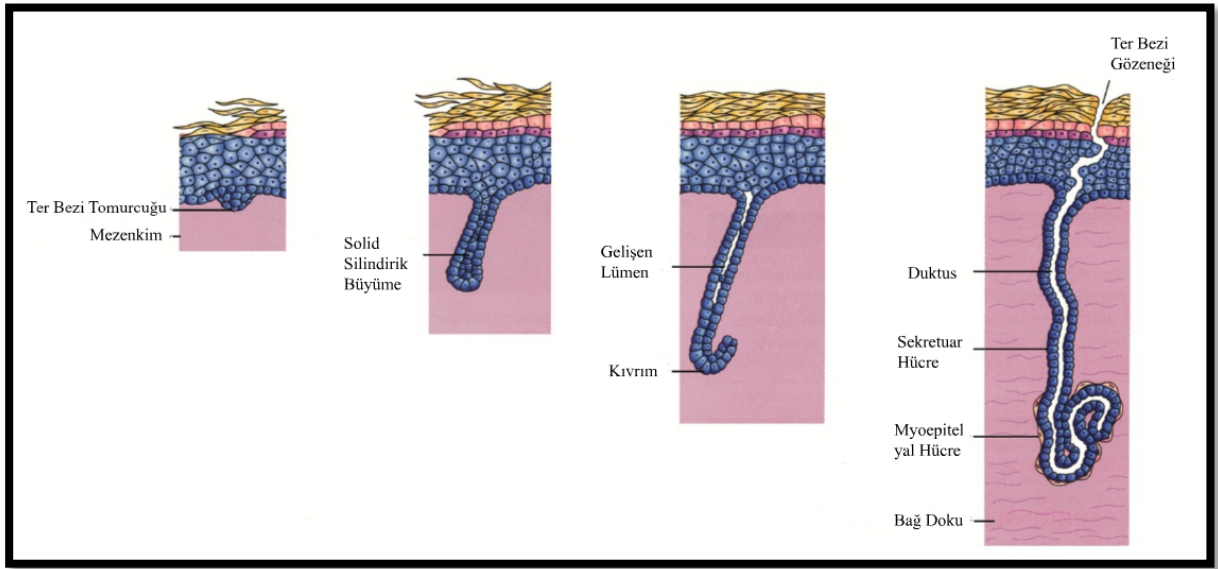
Ter bezleri ilk olarak 14-15. haftalarda dermise uzanan germinatif tabaka tomurcukları şeklinde ortaya çıkar. (Şekil 4) Daha sonra bu tomurcuklardan çok fazla sayıda kıvrım yapan ve dallanma yapmayan ter bezleri gelişir. (34)



Şekil 3: Kıl folikülü gelişimi (35)

Ekrin ter bezleri, kıl foliküllerinden bağımsızdır ve direkt olarak epidermise açılır. Ekrin ter bezleri embriyoda öncelikle solid epidermal yapılar şeklinde dermise doğru tomurcuklanır. Tomurcuktaki santral hücrelerin regresyonu ile lümen yapısı gelişir. Epidermis tarafındaki hücreler duktus yapısına katılırken apikal hücreler sekretuar hücrelere ve miyoepitelyal hücrelere dönüşür. (36) Ekrin bezlerinin yoğunluğu $100-600/\text{cm}^2$ 'dir. (25)

Apokrin ter bezleri insanda aksilla, pubis, areola bölgelerinde görülmektedir. Stratum germinativum tabakasının dermise tomurcuklanması ile oluşmaktadır. Epidermise direkt drenajları yoktur ve sebace glandların hemen yüzeyelinden kıl foliküllerine drene olurlar. (36)



Şekil 4: Ter bezlerinin gelişimi (36)

2.1.2. Derinin Histolojisi ve Fizyolojisi:

İnsan derisi farklı özelliklerde iki gruba ayrılarak incelenebilir. Bunlar palmar ve plantar bölgeleri kaplayan kılsız deri ve vücudun diğer bölgelerini kaplayan kıllı deridir. Palmar ve plantar bölgeyi kaplayan deri belirgin korneum tabakası ile birlikte daha kalın bir epidermis tabakasına sahipken kıl folikülleri ve sebace glandlardan yoksundur. Ayrıca bu bölgelerde dermiste yerleşmiş özel duyu reseptörler mevcuttur. Kıllı deride ise sebace glandlar ve kıl folikülleri mevcuttur ve kıllı deri özelleşmiş duyu reseptörlerinden yoksundur. (25)

Derinin farklı fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan birçok yapı derinin farklı katmanlarında yer almaktadır.

Deri üç tabakadan oluşur (20)

- 1- Epidermis
- 2- Dermis
- 3- Subkutis

1- Epidermis

Epiderminin keratinize çok katlı yassı epitelini oluşturan dört ayrı hücre çeşidi vardır. Bunlardan en sık olanları keratinositlerdir (%95). Daha nadir görülen ve keratinositlerin arasında yerleşmiş olan diğer hücreler melanositler, Merkel hücreleri, Langerhans hücreleridir. (25)

Keratinositler bazal membrandan deri yüzeyine kadar ilerleyerek birbirinden belirgin olarak ayrılabilen dört hücre katmanı oluşturur. (25) Palmoplantar bölgelerde ek olarak stratum korneum ve stratum granulozum tabakaları arasında stratum lusidum tabakası bulunmaktadır. (21)

Epiderminin katmanları (Şekil 5) :

- 1-Stratum bazale
- 2-Stratum spinozum
- 3-Stratum granulozum
- 4-Stratum lusidum (Palmar ve plantar bölgelerde)
- 5-Stratum korneum

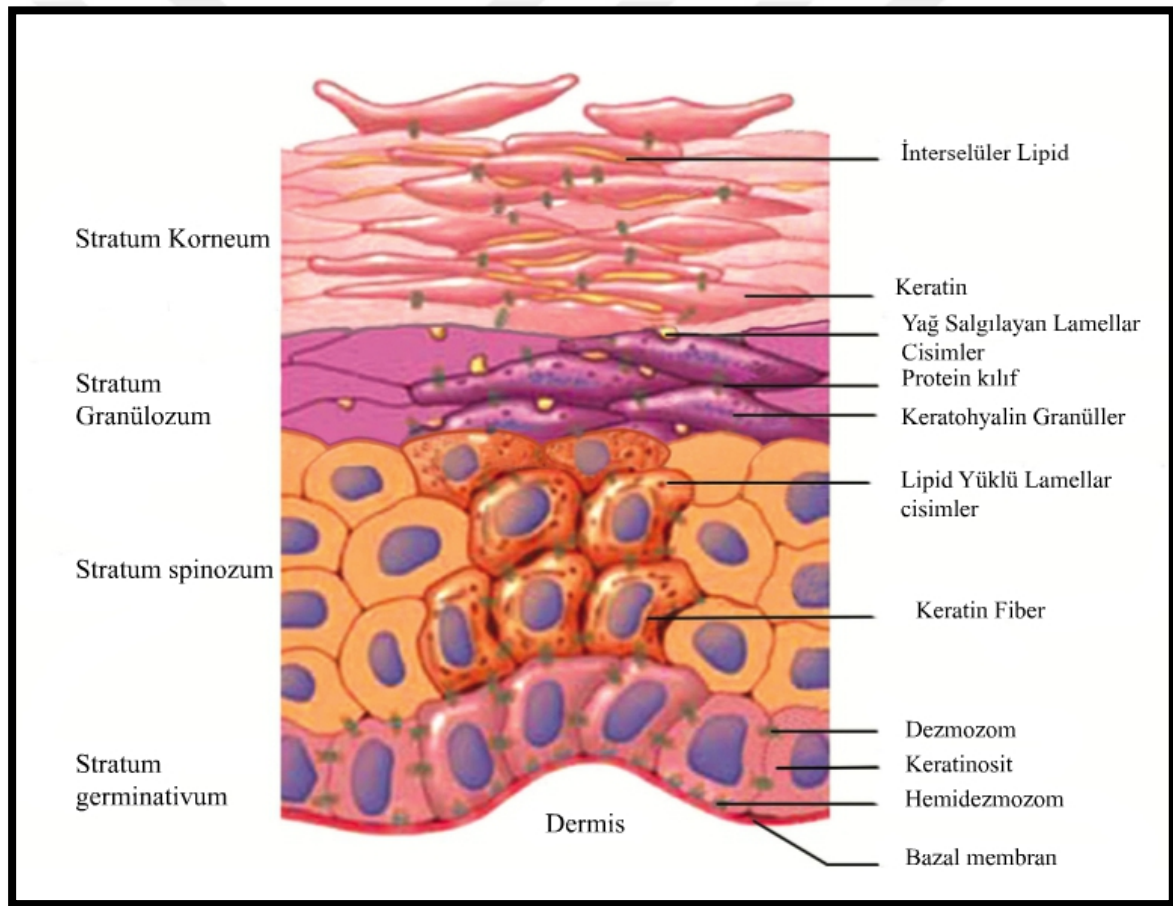
Stratum bazale, tek sıralı ve büyük nükleuslu keratinositlerden oluşmaktadır. Bu hücre katmanı hemidesmozom yapıları ile bazal membrana ve desmozom yapıları ile çevredeki hücrelere sıkıca tutunmaktadır. Mitotik aktiviteyi gösteren birçok bulgu bu katmanın üst katmanlardaki keratinositlerin kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu katmana aynı zamanda germinatif tabaka da denir. (25, 37)

Bazal tabakadaki bazı hücreler kök hücreler gibi bazal laminaya tutunmuş halde dururken diğerleri üst tabakalara doğru itilirler. Vücut bölgesine göre değişmek üzere hücrelerin bazal laminadan başlayarak dökülmesine deri döngüsü denir. Deri döngüsü 52-75 gün sürer. (38) Bazal tabakada ayrıca nöral krest kaynaklı, dendritik, pigment sentezleyen hücreler olan melanositler de bulunmaktadır. (39) Bazal keratinositler arasında melanositler düzenli olarak dağılır ve her 4-10 keratinosit için bir melanosit bulunur. (20) Ürettikleri melanin pigmentini dendritik sitoplazmik uzantıları aracılığı ile keratinositlere taşırlar. Keratinositler, melanositlerden aldıkları bu pigmentleri supranükleer olarak depolar ve

radyasyon etkisinden korunurlar. Ultraviyole etkisi arttıkça melanin sentezi ve keratinositlere transferi artar, deri daha koyu bir renk alır. (40)

Langerhans hücreleri de suprabazal seviyede yer alan bir diğer hücre grubudur. Kemik iliği kaynaklı olan bu hücre grubu derinin majör antijen sunucu hücreleridir.(40) Epidermal hücrelerin %3-6'sını oluşturur. Normal şartlarda immatür hücredir ve antijenik uyarı ile olgunlaşır. (41)

Merkel hücreleri bazal keratinositlere desmozomlarla bağlanmış halde bulunur. Yavaş adapte olan tip-I mekanoreseptördür. Parmak, dudak, oral kavite, kıl foliküllerinin dış tabakasında bulunur. Merkel hücrelerinin uyarılması için çevresindeki keratinositlerde küçük boyutlu hasar gerçekleşmesi yeterlidir. (40)



Şekil 5: Epidermin katmanları (34)

Stratum spinosum, stratum bazalenin yüzeyinde bulunur ve bu katman ile birlikte malpighi tabakasını oluşturur. (25, 42) Üç ila dört sıra hücreden oluşmaktadır ve kolumnar hücrelerden poligonol hücrelere doğru değişim görülür. Keratinositler bu tabakadan itibaren keratin üretmeye başlar. (43)

Stratum granulozum tabakası bir ila dört sıra hücreden oluşur. (44) Bu tabakada yassılaştırmış ve uzamış olan keratinositler belirgin keratohyalin granüllere sahiptir. Bu tabakada hücre organellerinin gerilemesine ve programlı keratinosit ölümüne neden olan kaspaz (sistein aspartik proteaz) gibi proteolitik enzimler vardır. (45) Yapısal proteinlerin ve bariyer oluşturan lipidlerin sentezi bu tabakada pik yapar ve akordeon şeklinde katlanarak birbirine bağlanan intrastoplazmik lamellar diskleri oluştururlar. (46)

Stratum lusidum palmar ve plantar alanlar gibi yük taşıyan, derinin kalın olduğu alanlarda bulunur. (21) Bu tabakada keratin yükünün arttığı, nükleusu olmayan keratinositler mevcuttur. Bu keratinositlerin ileri derecede yassılaştırmış olması ve bu katmanın saydam olması göze çarpan özellikleridir. Birçok yerde stratum korneum katmanının bir parçası olduğu görüşü bulunmaktadır. (47)

Stratum korneum tabakası 10-18 sıra hücreden oluşan, kalınlığı yaklaşık olarak 10 mikrometre (μm) olan, keratinositlerin yaşam ile ölüm arasındaki geçiş tabakasıdır. (45). Keratinositlerden salgılanan lamellar cisim içerikleri bu tabakada bazı katabolik modifikasyonlara uğrayarak interselüler alanı dolduran bir bariyer oluşturur. (48)

Deri ekleri epidermis yüzeyi ile bağlantılı özelleştirmiş epitelyal yapılar olmasının yanında temel yerleşim bölgesi dermis ve subkutis tabakalarıdır. Deri ekleri ter bezleri ve pilosebace foliküller ve tırnaklardır. (20)

Ter bezleri ekrin ve apokrin ter bezleri olmak üzere iki çeşittir. Ekrin ter bezleri müköz membranlar dışında tüm vücut yüzeyine dağılmıştır ve termoregülasyonun sağlanmasında yaşamsal bir öneme sahiptir. Salgıları direkt olarak epidermise açılan porlarından gerçekleşir. Apokrin ter bezleri ise pilosebace üniteler ile ilişkilidir. Aksilla, pubis, areola bölgelerinde bulunur. Salgısı pilosebace ünite aracılığı ile epidermal yüzeye ulaşır. (40) Yakın zamanda tanımlanmış olan, apokrin bez benzeri sekresyon yapan ter bezi türü ise apokrin ter bezidir ve pubertede ekrin ter bezlerinden farklılaşarak oluşur. (49)

Pilosebace foliküller palmar, plantar alanlar ve genital bölgenin bazı kısımları dışında tüm deri yüzeyinde bulunur. Ürettikleri kılın boyut ve morfolojik özellikleri açısından değişken özellik gösterir (terminal, vellus, lanugo, intermediate kıl). Pilosebace foliküller apokrin ter bezleri, sebace bezler ve erektör pili kaslarını da içerir. (20)

2- Dermis

Dermis vasküler ve nöral pleksuslar içerir. Dermis bu yapılar sayesinde epidermisin ve eklerinin korunmasını, beslenmesini sağlayan destekleyici ve elastik dokudur. (20)

Dermis kalınlığı vücut bölgesine göre farklılık göstermektedir. Dermis tabakasının kalınlığı sırt, palmar ve plantar bölgelerde göz kapağına göre daha fazladır. (20) Göz kapağında 0.5 mm'den daha inceyken sırtta 4mm'den daha kalın olabilmektedir. (38)

Dermis, daha yüzeysel olan papiller dermis ile derinde yer alan retiküler dermis olmak üzere iki ayrı katmanda incelenmektedir. Papiller dermis tabakası daha yüzeysel olan tabakadır. Damar ağı ve sinir sonlanmalarından zengin olan tabakadır. Dermis ile epidermis arasında fizyolojik metabolizmanın sağlanabilmesi için özelleşmiş olan mekanik bağlantıları sağlar. Bu tabaka epiderminin çıkıntılı bölgelerine uzanan papillaları sayesinde epidermis ile etkileşim halindedir. (23)

Dermis selüler ve ekstraselüler matriks komponentlerinden oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks dokuya ve hücrelere gerekli olan desteği sağlar. (50) Ekstraselüler matriksi oluşturan ve bu özelliğini sağlayan proteinler yapısal proteinler ve yapısal olmayan proteinler (glikoproteinler) olarak kategorize edilebilir. Yapısal proteinlerin en önemli örneği kollajen ve elastindir. Fibronektin, laminin ve tenaskin ise temel yapısal olmayan proteinlerdir. (50) Papiller derminin yapısında temel olarak tip-3 kollajen bulunur. Retiküler dermiste ise temel olarak tip-1 kollajen lifleri bulunur. (45) Kollajen papiller dermiste ince lifler halindeyken retiküler dermiste kalın lifler halinde ve horizontal yerleşimlidir. (20)

Dermiste yer alan temel hücre tipi fibroblastlardır. Ekstraselüler yapısal proteinler olan kollajen, elastin, majör su tutucu yapı olan glikozaminoglikanların (GAG) ve proteoglikanların üretiminden sorumludur. (20)

Dermisin temel üç bileşeni olan kollajen, elastin ve GAG'lar deri gençleştirme tekniklerinin geliştirilmesinde çeşitli kırışıklık önleyici kremlerden dolgu maddelerine kadar birçok aşamada en önemli hedeflerdir. (51)

Kollajen memelilerde en fazla bulunan ve tüm vücut protein kitlesinin yaklaşık olarak %30'unu oluşturan proteindir. (52) Benzer şekilde dermiste de en fazla bulunan protein olan kollajen karakteristik üçlü heliks yapısını oluşturan üç ayrı polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Farklı kollajen tiplerinin boyut, fonksiyon ve dokulara göre dağılımı değişse de karakteristik üçlü heliks yapısı ortaktır. (53) 46 farklı polipeptid zincirden oluşabilen 28 farklı kollajen tanımlanmıştır. (Tablo 2) (54)

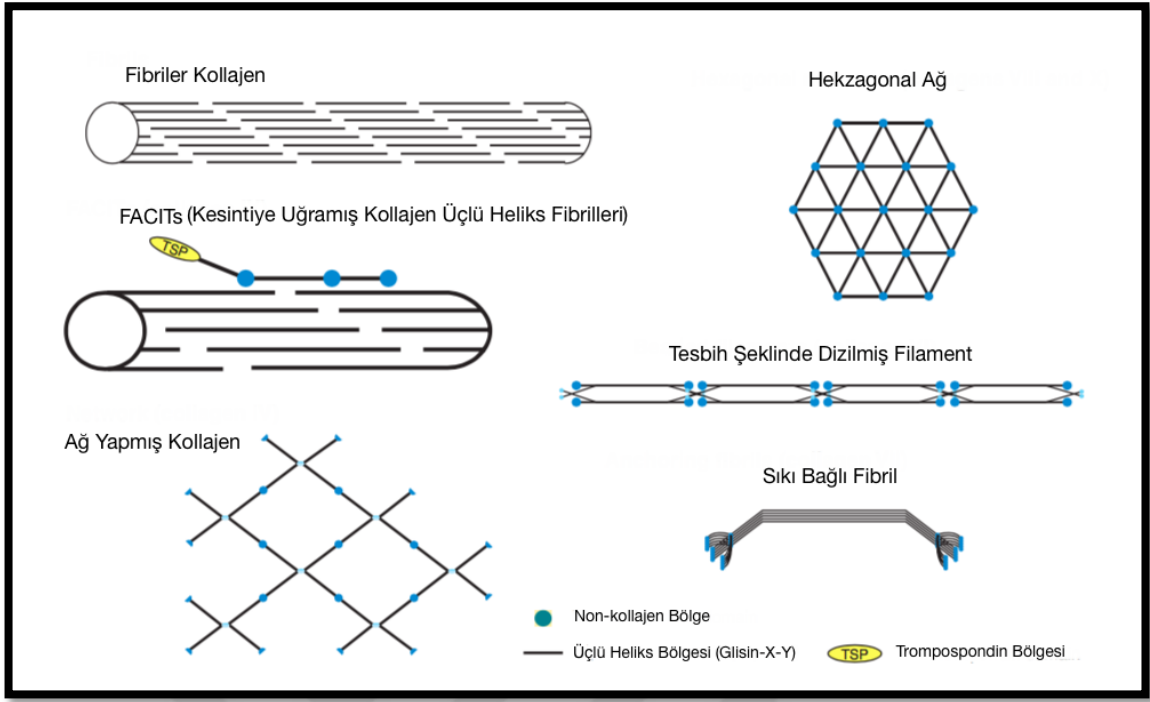
Vertebralılarda kollajen supramoleküler yapısına göre iki ana grupta incelenebilir: fibriler ve non-fibriler kollajen. En çok bulunan fibriler kollajen tipleri tip-1, tip-2, tip-3, tip-5 ve tip-11'dir. Bu proteinler kablo benzeri uzun fibril yapılar oluşturur. Bu sayede hem yapısal destek hem de boyutsal stabilite sağlar. Non-fibriler kollajenler topolojik olarak farklı şekiller oluşturmaktadır. (Şekil 6) Bu proteinlerin bazıları fibriler kollajen ile ilişkili iken bir kısmı

transmembran protein olarak görev yapmaktadır. (55) Kollajenin doku düzeyinde yarı ömrü deri, kas ve barsakta sırasıyla 74, 45, 244 gün olarak bildirilmiştir. (56)

Deride bulunan kollajen tipleri tip-1, tip-3, tip-5, tip-6, tip-7, tip-28 kollajenler ve bazal membran yapısına katılan tip-4 kollajendir. (54) Tip-3 kollajen temel olarak papiller dermiste bulunan kollajen tipiyken; retiküler dermiste temel olarak tip-1 kollajen bulunur. (45)

Tablo 2: Bazı kollajen tipleri ve yaygın lokalizasyonları (54)

Kollajen Tipi	Bulunduğu Doku
Tip-1	Dermis, tendon, ligament, organ kapsülü, kemik, dentin, sementum
Tip-2	Hiyalin ve elastik kartilaj
Tip-3	Lenfatik sistem, dalak, karaciğer, kardiyovasküler sistem, kalp, akciğer, deri
Tip-4	Bazal lamina
Tip-5	Dermis, tendon, ligament, organ kapsülü, kemik, sementum, plasenta
Tip-6	Ligament, deri, kartilaj
Tip-7	Dermoepidermal bileşke
Tip-8	Vasküler bazal lamina, kornea
Tip-9	Kartilaj
Tip-10	Kartilaj büyüme plağı
Tip-11	Kartilaj, vitroz sıvı
Tip-12	Tendon, ligament, aponevroz
Tip-13	Hücre yüzeyi, interkalar disk
Tip-14	
Tip-15	Endotelial bazal lamina
Tip-16	Bazal membran, kartilaj, plasenta
Tip-17	Hemidezmozom
Tip-18	Endotelial bazal lamina
Tip-19	Bazal membran, kartilaj, plasenta
Tip-20	Kornea
Tip-21	Mide, böbrek
Tip-22	Doku bileşkeleri
Tip-23	Kalp, retina
Tip-24	Kemik, kornea
Tip-25	Beyin, kalp, testis
Tip-26	Testis, over
Tip-27	Kartilaj
Tip-28	Dermis, siyatik sinir



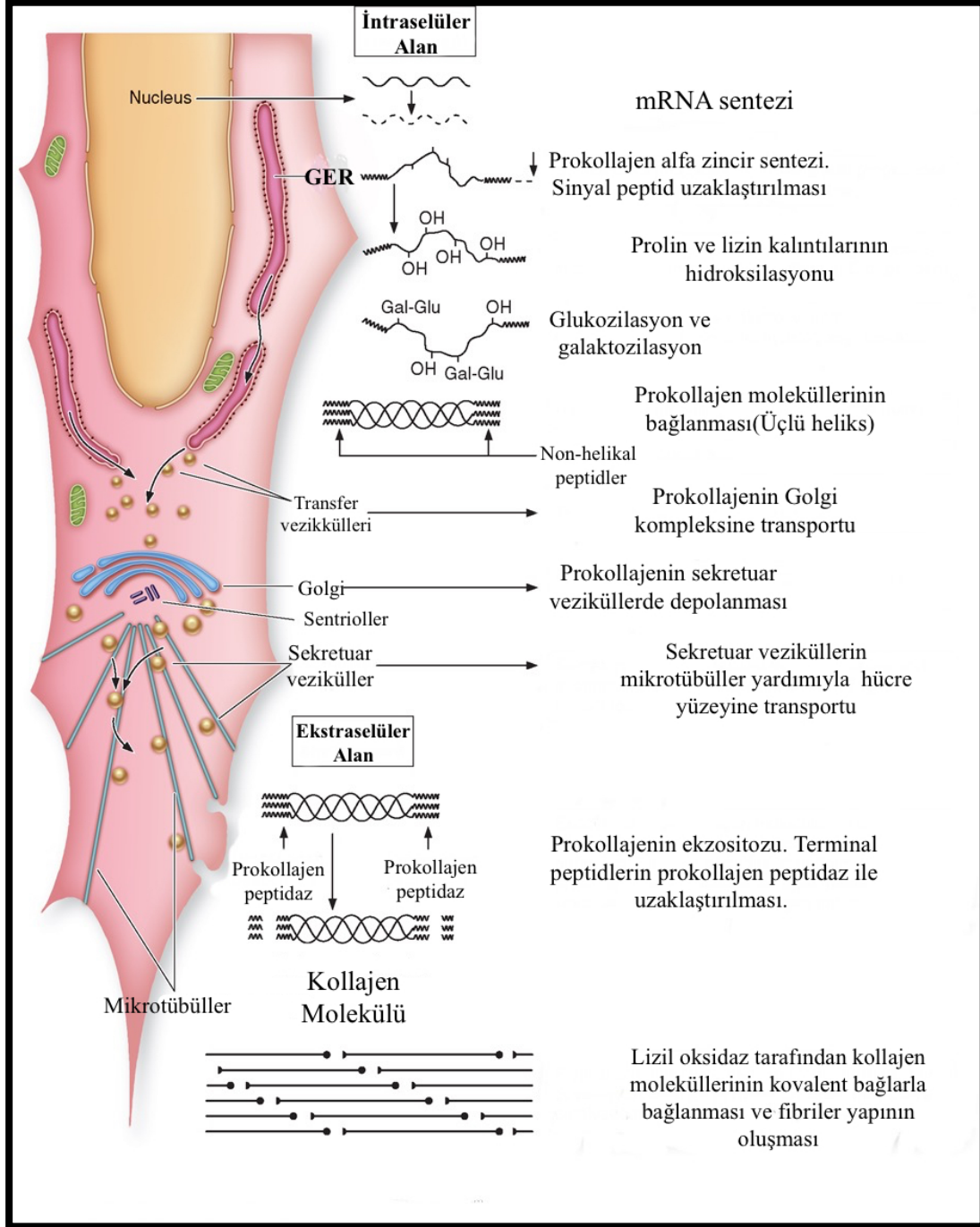
Şekil 6: Kollajen tarafından oluşturulabilen supramoleküler biçimler (52)

Mezenkimal hücreler ve bu hücrelerden derive olan hücreler (fibroblast, osteoblast, odontoblast, kondroblast, sementoblast) ana kollajen üretici hücrelerdir. Bu hücreler dışında epitel, endotel, kas hücreleri ve Schwann hücreleri de kollajen sentezleyen hücrelerdir. (54)

Bir protein olan kollajenin transkripsiyon aktivitesinin regülasyonu temel olarak hücre tipine göre belirlenmekle birlikte transkripsiyon birçok büyüme faktörü tarafından da düzenlenebilmektedir. Bu nedenle kollajen sentezi dokuda bulunan hücre tipi ve büyüme faktörlerinin çeşitliliğinden etkilenebilmektedir. (57)

Kollajen sentezi intraselüler ve ekstraselüler basamakları olan çok aşamalı ve kompleks bir süreçtir. (Şekil 7) Kollajen sentezinden sorumlu olan birçok gen bölgesi bulunmaktadır. Bu gen bölgeleri birçok ekzon ve intron içeren paterne sahiptir. Aktive olan kollajen gen bölgesine göre transkripsiyonu yapılan mesajcı ribonükleik asit (mRNA) molekülleri nükleusu terk ederek granüllü endoplazmik retikulumlara ulaşır ve ribozomlarda translasyona uğrar. Kollajen molekülünün aminoasit içeriği prolinden zengin “Glisin-X-Y” aminoasitlerinin tekrarı şeklindedir. Burada oluşan molekül preprokollajendir. Bu molekül ilgili reseptörlere bağlanmayı sağlayan sinyal peptid bölgeleri ile işaretlenmiştir. Sinyal peptidi ile işaretli olan preprokollajen endoplazmik retikulum lümenine yönelir. (53)

Sinyal peptidaz adı verilen enzimler sayesinde preprokollajenden sinyal peptidleri uzaklaştırılarak oluşan prokollajen molekülleri birçok posttranslasyonel modifikasyona uğrar.



Şekil 7: Kollajen sentezinin aşamaları (58)

Prolin ve lizin kalıntılarının hidroksilaz enzimleri sayesinde hidroksilasyona uğraması ve sonrasında glukoz ve galaktozun bu proteine eklenmesi endoplazmik retikulum ve golgi

aparatında gerçekleşir. Bu aşamalarda ferröz demir, askorbik asit, moleküler oksijene ihtiyaç duyulur. (53)

Prokollajen molekülünün yapısı disülfid bağları sayesinde stabilize olur. İlk olarak alfa zincirlerinin C-terminal uçları karşılıklı gelir ve N-terminal uca doğru bağlanarak üçlü heliks yapısı oluşur. Üçlü heliks yapısı oluştuktan sonra golgi aparatında yer alan molekül hücre dışına salgılanır. Hücre dışında yer alan proteinazlar yardımıyla N-terminal uçlar ve C-terminal uçlar enzimatik olarak üçlü heliksten uzaklaştırılarak kollajen monomeri olan tropokollajen molekülü elde edilmiş olur. Tropokollajen molekülleri hücre dışında lizil oksidaz enziminin aktivitesi ile oluşan kovalent çapraz bağlar sayesinde bir araya gelerek kollajen fibrilleri ve sonrasında da kollajen fiberlerini oluşturur. (53, 59)

Elastin dermis yapısında kollajene göre daha az bulunur (%2) ve derinin esnekliğinin sağlanmasında kritik öneme sahiptir. (45, 60) Elastin glisin, prolin, alanin, lösin, valin aminoasitlerinden zengindir ve genellikle 3-9 aminoasit sekansından oluşur. Bu durum elastin proteinine esnek ve dinamik bir yapı kazandırır. (61, 62)

Elastin yapı taşı olan tropoelastin monomeri granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir ve sonrasında intraselüler protranslasyonel modifikasyona uğrar. (60) Golgi aygıtı yardımıyla hücre dışına salgılanan tropoelastin molekülü mikrofibriler bir iskelet üzerinde çapraz bağlar yaparak polimerleşir. Polimerleşme aşamasının gerçekleşebilmesi için lizil oksidaz enzim aktivitesi gereklidir. Bu işlemler sonucunda amorf, stabil, suda çözünmeyen elastin polimeri oluşur. (60)

Yeni elastinin sentezi ve derideki miktarı yaşla birlikte azalır. Elastin sentezinden sorumlu olan gen bölgesi doğumdan önce ve hayatın ilk yıllarında yüksek miktarlarda ekspresyona uğrarken zamanla bu gen bölgesinin ekspresyonu azalarak orta yaşta minime iner. Bu nedenle dokulardaki elastin yapılarının çoğu hayatın ilk yıllarında sentezlenen elastindir. (63) Elastinin doku düzeyinde yarı ömrü 70 yıldır ve bilinen en stabil proteindir. (64) Yaşlanma süreci ile birlikte; özellikle de ultraviyole ışınların etkisi ile elastik lif yapısı değişikliğe uğrar. Güneş etkisi ile dermiste distrofik elastotik materyal birikir. Solar elastozis olarak adlandırılan bu patolojik bulgu önemli bir yaşlanma belirtisidir. (60)

Proteoglikanlar hücre yüzeyinde, ekstraselüler matrikste ve dolaşımda biyolojik önemi olan glikozillenmiş proteinlerdir. Proteinden oluşan bir çekirdek üzerine bağlanmış olan bir ya da daha fazla sayıda negatif yüklü glikozaminoglikandan (GAG) oluşmaktadır. (65) Tüm memeli hücrelerinin proteoglikan (PG) sentezleme, veziküllerinde biriktirme, plazma membranına bağlama ve ekstraselüler matrikse salgılama kapasitesi mevcuttur. (66)

Proteoglikanların dokulardaki dağılımı, protein çekirdeklerinin yapısı, içerdikleri GAG'ların çeşidi ve miktarı bu proteinlerin aktivitesini belirler. (66)

Glikozaminoglikanlar, vücutta en fazla bulunan polisakkarit yapılı maddedir ve ekstraselüler matriksin ana organik bileşenlerinden biridir. (45) Visköz ve lubrikan yapılarının yanında mukozal yüzeylerde saptanmaları mukopolisakkaritler olarak da adlandırılmalarına neden olmuştur. Tüm memeli hücrelerinin yüzeyinde yer alan moleküllerdir. (67) GAG'lar ileri derecede negatif yüklü moleküllerdir. GAG içerikli bir solüsyona baskı uygulandığında serbest su açığa çıkarken baskı kaldırıldığında GAG'ların serbest suyu geri çekmesini sağlayan da bu negatif yüküdür. (68)

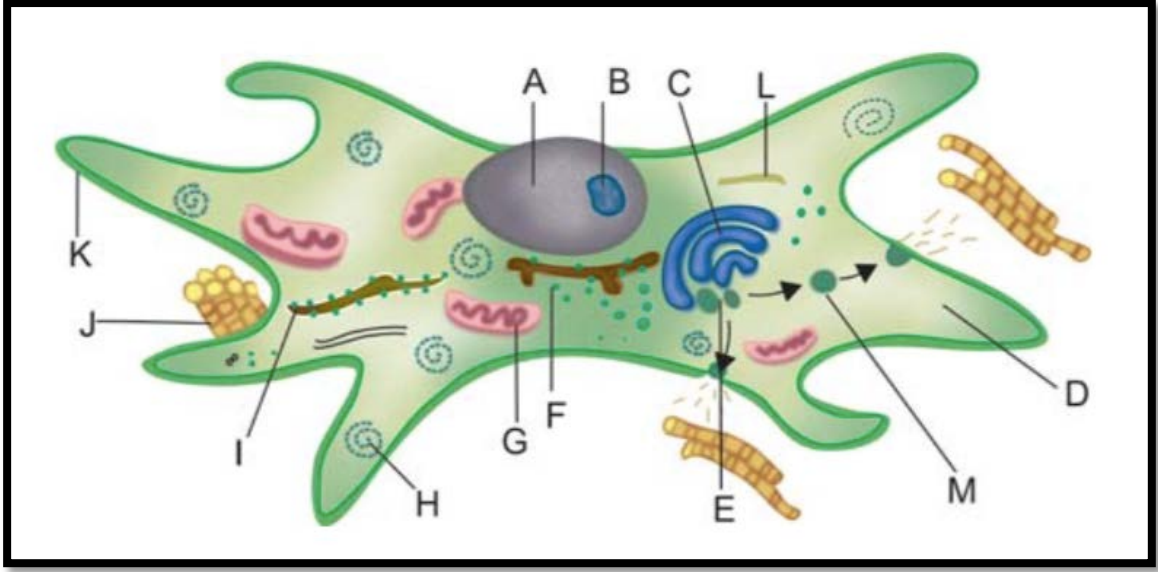
Spesifik GAG'lar hyaluronik asit, dermatan sülfat, kondroitin sülfat, heparin, heparan sülfat ve keratan sülfattır. (Tablo 3) Hyaluronik asit, sülfat içermemesi ve proteoglikanların yapısına katılmaması ile diğer GAG'lardan ayrılır. (69)

Fibroblastlar dermis bileşenlerinin sentez ve şekillenmesinden sorumludur. (Şekil 8) Bununla birlikte derinin gelişimi, tamiri ve rejenerasyonunda gerekli olan mezenkim-epitel etkileşiminin önemli bir parçasıdır. (45) Dermiste en fazla bulunan hücre grubu olmasına ve kutanöz yara iyileşmesinde en önemli bileşenlerden biri olmasına rağmen bu hücre tipi tam olarak tanımlanamamıştır. Fibroblast kelimesi, spesifik mezenkimal hücre gruplarının eksprese ettiği yüzey proteinlerine sahip olmayan tüm mezenkimal hücreleri kapsamaktadır. Bu durum, fibroblastların aslında homojen bir hücre grubu olmadığını; değişken ve heterojen bir popülasyon olduğunu göstermektedir. (70) Bunun en belirgin örneği ise çeşitli uyaranlarla kontraktıl yapı kazanarak miyofibroblastlara dönüşebilme yetenekleridir. Ayrıca çeşitli mezenkimal kökenli hücreler uygun şartlarda fibroblastlara dönüşebilmekte ya da fibroblastlar çeşitli uyaranlar yardımıyla pluripotent kök hücrelere dönüştürülebilmektedir. (71, 72)

Fibroblastlar, yer aldıkları dokuya göre yapısal ve fonksiyonel olarak değişken özellikler gösterebilmektedir. Bu değişkenliği sağlayan mekanizmanın ekstraselüler mikroçevredeki yapısal farklılıklar ve sinyal moleküllerindeki değişiklikler olduğu düşünülmektedir. (70) Fibroblastlar yara iyileşmesi ve rejüvenasyon gibi konularda temel hedeflerden biridir. (3)

Tablo 3: Spesifik glikozaminoglikanlar ve özellikleri

GAG	Lokalizasyon	Özellik
1. Hyaluronik Asit	• Sinoviyal sıvı • Eklem kıkırdağı • Deri • Vitroz sıvı • Gevşek bağ doku	➤ Büyük polimer yapısı ➤ Günlük yenilenme oranı %30
2. Kondroitin Sülfat	• Kıkırdak • Kemik • Kardiyak Valfler	➤ En çok bulunan GAG ➤ Sıklıkla PG yapısında
3. Heparan Sülfat	• Bazal membran • Hücre yüzeyi	➤ Proteoglikan yapısında ➤ Antikoagülan etki
4. Heparin	• Mast Hücresi • Arter Duvarı	➤ Heparan sülfata göre daha yüksek sülfat oranı ➤ Bakteriyel invazyonu önler ➤ Antikoagülan
5. Dermatan Sülfat	• Deri • Kan damarı • Kardiyak valf • Tendon • Akciğer	➤ Koagülasyon ➤ Yara iyileşmesi ➤ Fibrozis



Şekil 8: Fibroblastın yapısı. A: Nükleus; B: Nükleolus; C: Golgi Aparatı; D: Sitoplazma; E: Transfer Vezikülleri; F: Ribozomlar; G: Mitokondri; H: Poliribozomlar; I: Granüllü Endoplazmik Retikulum; J: Kollajen Fibrilleri; K: Hücre Çıkıntısı; L: Mikrotübüller; M: Sekretuar Granüller (54)

3- Subkutan doku

Dermis ile altta yer alan kas tabakası arasında bulunur. Bu tabaka bir izolasyon tabakası olarak görev yapar ve vücudu mekanik hasardan korur. Ayrıca yedek enerji kaynağı olarak görev yapar. Subkutan dokunun temel hücre grubu adipositlerdir. Adipositler septalarla ayrılmış lobüler yapılar şeklinde organize olmuştur. Bu tabakanın kalınlığı vücut bölgesine ve kişiye göre değişir. Ayrıca beslenme durumu da bu tabakanın kalınlığını etkiler.(44)

Adipositler subkutan dokuda lobüller oluşturacak şekilde organize olmuştur. Her lobülü besleyen bir arteriol bulunur ve bağ dokudan oluşan septa lobülü çevreler. Lobül içerisinde her bir adiposit en az bir tane kapiller ile temas halindedir. (73)

Yapılan bir çalışmada subkutan yağ dokusu adiposit ve bağ dokusunun konfigürasyonuna göre üç ayrı grupta incelenmiştir (74)

- Tip-1: Depo yağ dokusu
- Tip-2: Yapısal yağ dokusu
- Tip-3: Fibröz yağ dokusu

Tip-1'de adipositlerin boyutları daha fazladır ve çevrelerindeki kollajen septa belirgin olarak incedir. Daha az progenitör hücre ile birlikte ince ve düşük yoğunlukta kapiller

mevcuttur. Periumbilikal bölgede sıklıkla bu tipte subkutan yağ dokusu mevcuttur ve lipoaspirasyon sırasında adipositlerin zarar görme ihtimali en yüksek olan tiptir. Tip-2’de ise daha belirgin septalar, daha belirgin vasküler ağ ve daha yoğun progenitör hücre kaynağı mevcuttur (trokanter, uyluk, kol, pektoral alan gibi) . Tip-3 subkutan yağ dokusu mekanik strese maruz kalan alanlarda izlenen yağ dokusudur. Yoğun fibröz septa içerir. Bu konfigürasyonlar içerisinde yağ grefti ve stromal vasküler fraksiyon elde edilmesi için en ideal olanı yapısal yağ dokusu (tip-2) olarak bildirilmiştir. (74)

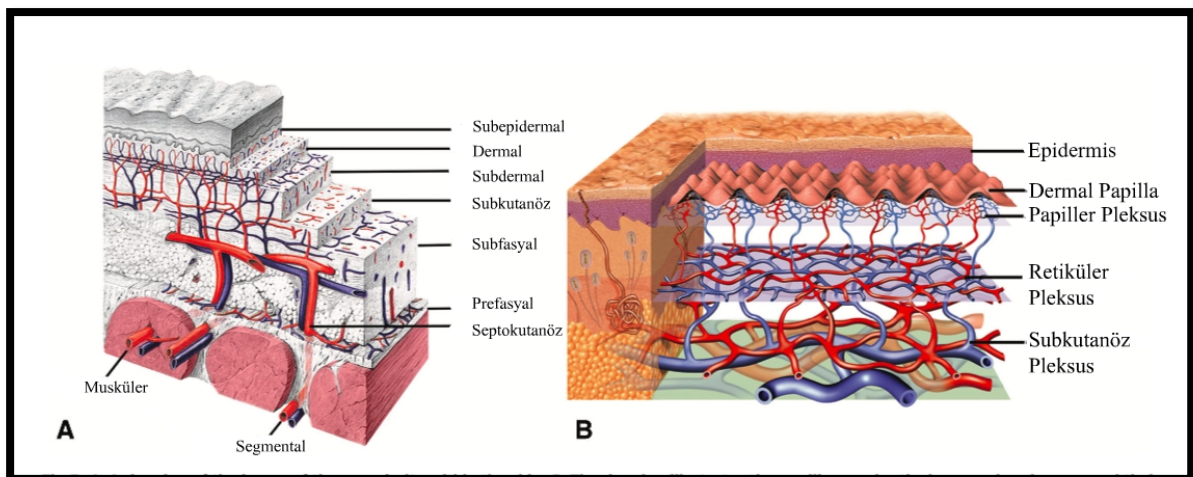
Erişkin subkutan yağ dokusunun 1/3’ünü adipositler oluştururken kalan 2/3’ünü vasküler yapılar, sinirler, fibroblastlar, prekürsör hücreler oluşturmaktadır. (75)

Subkutan dokuda yer alan fibröz septalar kadınlarda dermise dik olarak yerleşirken erkeklerde septaların yerleşimi çapraz şekildedir. (76)

Abdominal bölge, gluteal bölge ve uyluklarda subkutan adipöz doku ince bir fasya ile (Skarpa fasyası) derin ve yüzeysel olmak üzere iki ayrı plana ayrılmıştır. Bu iki farklı katmandaki dokuların farklı morfolojik ve metabolik özellikleri olduğu bildirilmiştir. (77, 78)

2.1.3. Derinin Kanlanması:

Derinin kanlanmasından sorumlu damar yapıları ana vasküler yapılardan fasyaya kadar farklı şekillerden ulaşmaktadır. Bununla birlikte derinin kanlanması subfasyal seviye ve daha yüzeysel seviyelerde mevcut olan arteriyel ve venöz pleksuslar yardımıyla sağlanmaktadır. (Şekil 9)



Şekil 9: Derinin kanlanması (34)

2.2 Yaşlanma

Yaşlanma tüm organizmayı ilgilendiren değişiklikler bütünü olmasına rağmen en çok fark edilebilen bulgular deride gerçekleşmektedir. (3) Deride yaşlanmaya bağlı gelişen değişiklikler, intrinsik (kronolojik) ve ekstrinsik (çoğunlukla güneş etkisi) mekanizmalarla gerçekleşmektedir. (3, 79)

Doğal yaşlanma sürecini tetikleyen ve yaşlanma sürecinde ortaya çıkan değişikliklere katkıda bulunan birçok mekanizma tariflenmiştir. Bunlar serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif stres, hücresel yaşlanma-telomer kısalması, apoptozis, diyet, intraselüler sinyal yollarında bozulma, vasküler değişiklikler, sitokin değişiklikleri, çevresel değişiklikler ve çeşitli deri lezyonlarıdır. (80, 81)

2.2.1 Yaşlanmanın moleküler mekanizmaları

Oksidatif stres:

Oksidan ve antioksidan moleküllerin oranındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. (81)

Serbest radikallerin üretimi homeostazın sağlanmasında ve hücresel cevapta önemli rol oynamaktadır. (82) Bunun yanında serbest radikal ya da oksidatif stres teorisine göre oksidatif hücresel hasarın artması yaşlanma sürecinin ve uzun yaşamın en önemli belirleyicisidir. (80)

Bazı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda uzun yaşam ile bağlantılı olduğu görülen iki farklı faktör saptanmıştır. Bunlardan birincisi endojen doku hasarının daha az olmasıyken ikincisi doku makromoleküllerinin oksidatif modifikasyona direncinin yüksek olmasıdır. (83) Yüksek metabolik aktiviteye sahip olan hayvanların daha kısa yaşam süresine sahip olmaları da reaktif oksijen radikallerinin yaşlanmaya katkıda bulunduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. (84)

Oksidatif stres selüler lipidler, proteinler, DNA gibi makromoleküllerin oksidasyonuna neden olarak artan yaşla birlikte selüler disfonksiyona neden olmaktadır. Hasarlanmış, okside olmuş ve agregasyona uğrayarak disfonksiyona uğramış proteinlerin birikmesi yaşlanmayla sonuçlanmaktadır. (81)

Derinin çevresel ve kimyasal faktörlere karşı kompleks bir savunma sistemi vardır. Buna rağmen yoğun ya da kronik maruziyet oksidatif stres ve hasara neden olabilmektedir. Oksidatif strese neden olan moleküller süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit, hidroksil iyonlarıdır. (85)

Yaşlanma sürecinde endojen antioksidan sistemlerin etkisi azalır. (86) Bu da temelde DNA hasarı olmak üzere birçok yapının hasarına neden olur. (87)

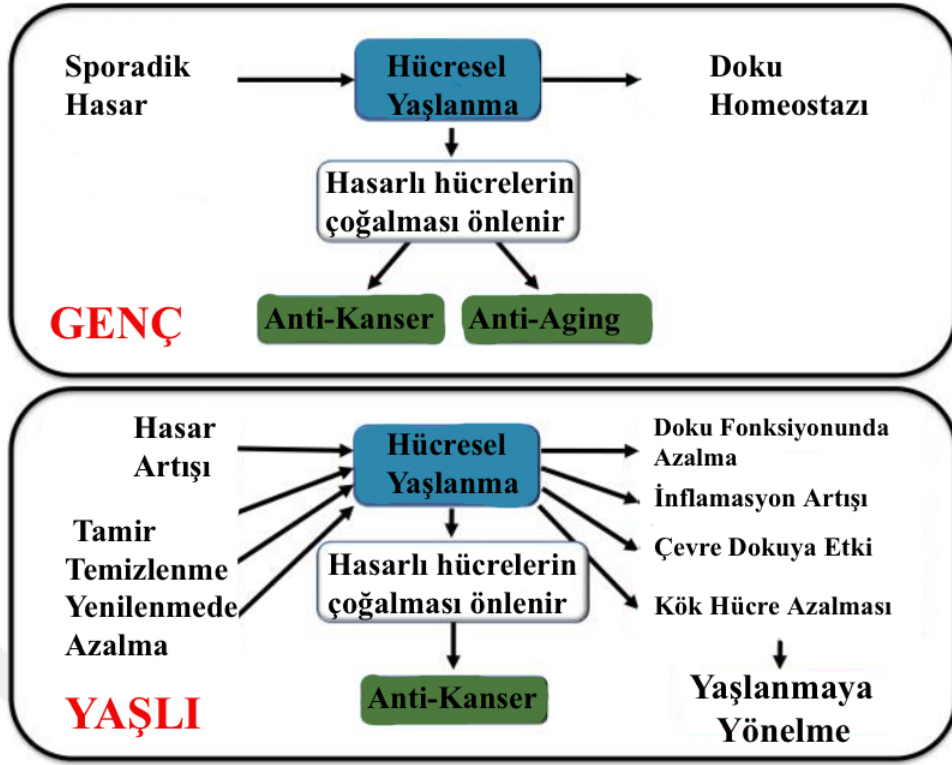
DNA hasarına bağlı protein sentezinin modifikasyonu, RNA transkripsiyonunda blokaj, hücre ölümü, metabolik redoks dengesinin bozulması oksidatif stresin artmasına bağlı olarak gelişen hasarlardır. Bu hasar zamanında düzeltilemezse DNA molekülünde yapısal bozulmalara neden olur. Sonuçta DNA replikasyonu, transkripsiyonu, hücrenin fonksiyonel bütünlüğü ve viabilitesi önemli şekilde etkilenir. (80)

Mitokondrinin oksidatif stresi yaratan bir kaynak olması ve aynı zamanda oluşan oksidatif stresten etkilenmesi mitokondrial yaşlanma teorisinin temelini oluşturmaktadır. Yaşlanma sürecinde mitokondrial DNA'da gerçekleşen mutasyonlar, azalmış oksidatif fosforilasyon ve antioksidan enzimlerin azalması ile birlikte gittikçe daha fazla reaktif oksijen molekülü açığa çıkar. Açığa çıkan reaktif oksijen molekülleri mitokondrial DNA'da daha fazla mutasyona neden olarak bu döngünün gittikçe hızlanmasına neden olur. (80)

Hücrel yaşlanma ve Telomerler:

Mitotik hücrelerin her birinin gelişmesinin geri dönüşümsüz olarak durması fenotipik olarak normal hücrelerden tamamen farklı hücrelerin doku içerisinde çoğalmasına neden olmaktadır. Çoğalan bu hücreler doku fonksiyonunun azalmasına, çeşitli hastalıkların oluşmasına yatkınlık sağlamakta ya da kendileri direkt olarak çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu sürecin tamamı hücrel yaşlanma olarak adlandırılmaktadır. (80)

Mitotik dokuların yaşlanmasında önemli mekanizmalardan birinin dokularda zamanla daha fazla biriken yaşlanmış hücreler olduğu düşünülmektedir. Yaşlanmış hücreler köken aldıkları dokudan daha farklı genetik, morfolojik, davranışsal özellikler göstermektedirler ve hücrel döngüleri geri dönüşümsüz olarak durmuştur. Yaşlanmış hücreler çevredeki hücreleri, ekstraselüler matriksi ve yapısal bileşenleri etkileyerek bunların yaşlanma belirtileri, kanser ve hastalıkları geliştirmesine neden olmaktadır. (80) (Şekil 10)



Şekil 10: Hücresel yaşlanmanın neden ve sonuçları (88)

Telomerler ökaryotik organizmalarda bulunan ve kromozom uçlarında yer alan çok sayıda “TTAGGG” baz tekrarından oluşur. Kromozomların degrade olmasını ve diğer kromozomlarla füzyona uğramasını engeller. (89) Telomerlerin boyunda kısalma olması hücrenin oksidatif strese maruz kaldığının göstergesidir ve yaş, sigara kullanımı, mortalite ile ilişkilidir. (80)

Diploid hücrelerin sınırlı proliferasyon potansiyelleri vardır. Bu durum telomerler ile açıklanmaktadır. Her hücre döngüsünde telomerler 50-200 baz çiftini kaybederek kısalmaktadır ve telomerlerin kısalması hücre bölünmesini inhibe etmektedir. (90)

Telomerler hücre bölünmesini sınırlayarak aberran hücre proliferasyonunun önüne geçmektedir. Bunun sonucunda da hücresel yaşlanma ve yaşlılık bulguları ortaya çıkmaktadır. (91) Erken yaşlanmanın izlendiği olgularda telomerler normal yaşlanma sürecinde olan ve daha yaşlı olgulara göre programlı hücre bölünme limitini bitirmeye daha yakındır. (90, 92) Memelilerde telomerlerin sonlanması önleyen temel mekanizma telomeraz enzimi ile bu yapının uzatılmasıdır. (93)

Yaşlanma sürecinde telomerlerin kısalmasının en önemli nedenlerinden biri erişkin hücrelerinde telomeraz aktivitesinin zamanla azalmasıdır. Telomeraz enziminin doku rejenerasyonu sırasında sürekli bölünen hücrelerde telomerlerin kayıp hızına karşı gelememesi telomer kısalmasıyla sonuçlanmaktadır. (94)

Tek bir seferde maruz kalınan yüksek doz ultraviyole radyasyonun insan fibroblastlarında telomer kısalmasına neden olabildiği gösterilmiştir ve ultraviyole maruziyetine bağlı hızlı gelişen telomer kısalmasının erken deri yaşlanmasına neden olabileceği belirtilmiştir. (95)

Telomeraz ekspresyonu embriyonik hayatta yüksek seviyelerde gerçekleşirken doğumdan birkaç hafta sonra birçok hücre grubunda azalmaya başlamaktadır. Kök hücreler, lenfositler ve deri fibroblastları gibi hücre grupları ise telomeraz aktivitesinin korunduğu hücrelerdir. (94)

Derinin proliferasyon ve fonksiyonunun devamı için telomeraz aktivitesinin katkısı önemi gösterilmiştir. (96) Telomeraz aktivitesi deri yaşlanmasında ve onkogenezinde önemli rol oynamaktadır. (97)

Apoptozis:

Yaşlanma sürecinde önemli etkenlerden birinin apoptozis mekanizmalarının hiperregülasyonu olduğu bildirilmektedir. Bu regülasyonun genetik programa mı yoksa oksidatif stres gibi yaşlanma sürecindeki faktörlere mi bağlı olduğu belirlenememiştir. (98, 99)

Çeşitli stres faktörleri karşısında p53 apoptozisi uyararak ya da hücrel döngüyü durdurarak (bu durum hücrel yaşlanmayla sonuçlanmaktadır) tümör gelişimini engellemektedir. Yaşlanma süreci ile birlikte oluşan şartlarda p53 hücrel yaşlanmayı ya da apoptozisi uyararak kanser gelişimini önlemektedir. Bu süreç özellikle progenitör ya da kök hücrelerde gerçekleşirse yaşlanma sürecine katkıda bulunmaktadır. Diğer taraftan çeşitli stres faktörleri altında hücrel gelişimi durdurarak hücrenin daha uzun süre yaşamasını sağlamaktadır ki bu da yaşlanma sürecini yavaşlatabilmektedir. (80)

Diyet:

Vitaminler, karotenoidler, tokoferoller, flavonoidler ve birçok farklı bitkiden elde edilen özütler besin olarak ya da topikal olarak deri yaşlanmanın etkilerini önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Buna rağmen beslenmenin deri yaşlanmasında etkisi yetersiz bilimsel veri olması nedeniyle tartışmalı bir konudur. (80)

Yapılan hayvan çalışmalarında kalori kısıtlamasının daha uzun yaşam ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin azalan metabolizmaya bağlı olarak reaktif oksijen moleküllerinin azalmasına bağlı olduğu hipotezi öne sürülmüştür. (100)

İntraselüler sinyal yolları ve matriks metalloproteinazlar:

Matriks metalloproteinazların sentezi ultraviyole radyasyon maruziyetine sekonder olarak artmaktadır. Bu artış ultraviyole radyasyon sonucunda aktive olan çeşitli intraselüler sinyal yolları üzerinden gerçekleşmektedir. (81) Matriks metalloproteinaz aktivitesi sonucunda fragmanlara ayrılmış, dezorganize kollajen fibrilleri ekstraselüler matrikste birikerek yeni kollajen sentezini inhibe etmektedir. (101)

Vasküler değişiklikler:

Ultraviyole radyasyon, kızılötesi radyasyon ve ısı gibi birçok etken deride anjiogeneze neden olmaktadır. Ultraviyole radyasyona akut maruziyet anjiogenez ile sonuçlanırken kronik maruziyet ile oluşan yaşlanma sürecinde dermal vasküler yapılarda azalma ile sonuçlanmaktadır. (81)

Sitokinler:

Sitokinler yaşlanmanın klinik bulgularının ortaya çıkmasında önemli bir yere sahiptir. (102) TNF-alfa, IL-1, IL-6 gibi birçok sitokin kollajen sentezinin azalmasına ve matriks metalloproteinaz aktivitesi üzerinden ekstraselüler matriks degradasyonuna neden olmaktadır. (81)

Çevresel faktörler:

Sigara kullanımı deri yüzeyinde kurumaya ve deriye giden kan akımında azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle sigara kullanımında deriye ulaşabilen oksijen ve esansiyel besinlerin miktarı azalır. (103)

Sigaranın deriye olan negatif etkilerinin hangi moleküler mekanizmalar ile gerçekleştiği tam olarak ortaya konamamış olsa da kollajen sentezini azalttığı ve matriks metalloproteinaz aktivasyonu üzerinden kollajen yıkımını artırdığı düşünülmektedir. (80)

Deri her ne kadar dış etkenlere karşı koruyucu bir bariyer olarak görev yapsa da ksenobiyotikler, pestisidler, kozmetik ürünler, topikal ilaçlar gibi potansiyel zararlı maddeler için geçiş yeridir. (104)

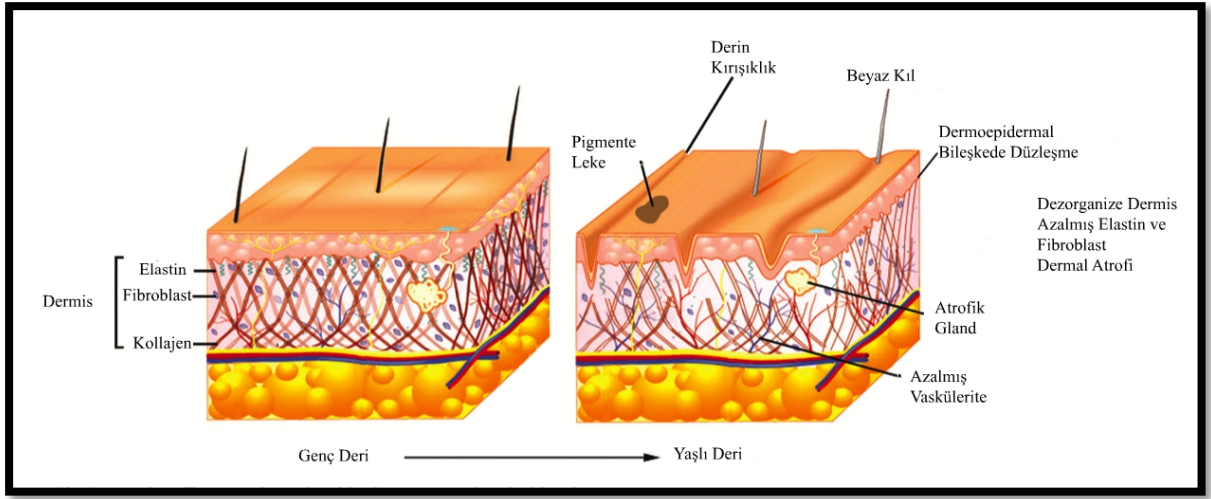
Ayrıca ultraviyole ışınlar, araç egzoz gazları, sigara dumanı, hidrokarbonlar, ağır metaller, ozon gibi prooksidan maddeler deride reaktif oksijen molekülleri ve biyoaktif moleküllerin oluşumuna neden olarak hücre hasarı oluşturur. (105)

Ultraviyole ışınlar maruziyet yukarıda bahsedilen birçok mekanizma üzerinden yaşlanmaya neden olabilmektedir. Bunlar direk DNA hasarı, reaktif oksijen moleküllerinin oluşumu, telomer kısalması ve distrofik elastotik materyal birikmesidir. (106)

2.2.2 Yaşlanmanın klinik bulguları

İntrinsik deri yaşlanması güneş etkisinin olmadığı alanlarda da görülen doğal biyolojik yaşlanmayı ifade eder. (107) İntrinsik yaşlanma sonucunda ince ve atrofik görünümlü, ince kırışıkların izlendiği, kuru görünümlü deri oluşur. Ekstrinsik ya da prematür deri yaşlanması (özellikle de güneşe maruziyet) ise tipik olarak epidermisi kalın olan, pigment bozuklukları olan, derin kırışıklıkların izlendiği, mat, laksitesi artmış ve pürüzlü görünüme sahiptir. (3, 108-111) (Şekil 11) Yaşlanma bulgularının derecesi Glogau tarafından sınıflandırılmıştır.

(Tablo 4)



Şekil 11: Yaşlanmanın deri bulguları (34)

Epidermiste olan değişiklikler:

Yaşla birlikte epidermis kalınlığı azalır. Buradaki en önemli etkenlerden biri epidermisin dermal uzantılarında izlenen silinme ve spinöz tabakadaki kalınlık kaybıdır. (112) Keratinositlerin hücresel boyutta yüksekliği azalır, yüzey alanı genişler ve epidermal döngü yavaşlayarak yenilenme süresi uzar. (113)

Ortalama 28 gün olan epidermal yenilenme zamanı 80 yaşa gelindiğinde %30-50 oranında artar. Bu bazal tabakada mitotik aktivite azalmasına ve bazal tabakadan korneum tabakasına olan göç süresinin uzamasına bağlıdır. (114, 115)

Melanosit, Langerhans Hücreleri, Merkel hücrelerinin sayısı azalır. Bazı yayınlara göre yaşlanmayla birlikte keratinositlerde apoptoza direnç gelişmektedir. Apoptoza olan direnç nedeniyle hücreler deoksiribonükleik asit (DNA) ve protein hasarı ile birlikte kanseröz değişikliklerin gelişmesi için yeterli sürede yaşamaktadır. (113)

Melanositlerin miktarında 30 yaşından sonra her dekada %8-20 oranında azalma görülür. (116) Güneşe maruz kalan bölgelerde melanosit sayısındaki azalma sınırlıdır fakat bu hücreler fonksiyonel olarak yetersizdir ve düzensiz bir pigmentasyona neden olur. Melanosit sayısı ve fonksiyonundaki bu azalma nedeniyle saç ve kıllarda da pigmentasyon kaybı olur. (117)

Tablo 4: Glogau deri yaşlanma skalası ve tedavi seçenekleri (118, 119)

Tip	Tanım	Özellikler	Tedavi
I (Hafif)	Minimal Kırışıklık	Erken dönem güneş etkisi Keratoz, pigment bozukluğu yok Yaş: 20-30 Makyaj gerekmez	Dermabrazyon veya Yüzeyel kimyasal soyma
II (Orta)	Dinamik Kırışıklık	Orta derecede güneş etkisi Erken aktinik keratoz Soluk renk Dinamik kırışıklık Yaş: 30-40 Hafif makyaj	Orta derinlikte kimyasal soyma
III (İlerlemiş)	İstirahatte Kırışıklık	İlerlemiş güneş etkisi Diskromi, telanjiyektazi Dirençli kırışıklık Aktinik keratoz Yaş:50 ve üstü Her zaman makyajlı	Orta derinlikte kimyasal soyma
IV (Belirgin)	Belirgin Kırışıklık	Ciddi güneş etkisi Sarı-gri saç Belirgin kırışıklık Aktinik keratoz/malignite Normal deri bölgesi izlenmez Yaş: 60 ve üstü Kötü görünümlü makyaj	Derin kimyasal soyma veya Cerrahi Tedavi

Epiderminin dermal uzantılarında düzleşme ve dermal papillalarda inceleşme ile birlikte dermoepidermal bileşkede düzleşme görülür. Normal şartlarda dermoepidermal bileşkede bazal hücrelerde mevcut olan ve dermise uzanım gösteren hücresel çıkıntılar altıncı dekada kaybolur. (120)

Subepidermal pleksusta mevcut olan kapiller damarlarda zamanla gelişen azalmayla birlikte kıvrılma, uzama, dezorganize ve dilate görünüm gelişir. Perisitlerin miktarında azalma oluşur. Bu değişikliklerin sonucunda dermoepidermal ilişki zayıflar, kapiller perfüzyon azalır. (113, 121, 122)

Yaşlanmayla birlikte derinin esnekliği ve gerilmeye karşı koyma gücü azalır. Çeşitli kimyasalların, sabunların, antijenlerin deriye penetrasyonu ve deri bütünlüğünü bozması kolaylaşır. Antioksidan mekanizmalar zayıflar ve ultraviyole ışınların zarar verici etkileri artar. Yara iyileşmesi ve bariyer özellikleri yavaşlar. Termoregülasyon, duyu ve vasküler rezervde azalma görülür. (113)

Dermiste olan Değişiklikler:

Yaşlanmayla birlikte oluşan dermal değişiklikler hem selüler boyutta hem de ekstraselüler matriks komponentleri boyutunda gerçekleşmektedir. Dermiste de epidermiste olduğu gibi kalınlık kaybı gözlenmektedir.

Yaşlanma ile birlikte dermiste fibroblast yoğunluğu belirgin ve progresif olarak azalmaktadır. Dermiste en fazla bulunan hücre grubu olan fibroblastların yoğunluğunun azalması aynı zamanda kollajen ve elastik lifler gibi interselüler alanın tüm komponentlerinde azalmasına neden olur. (123) Fibroblastların sadece sayısı değil aynı zamanda fonksiyon kapasiteleri de azalır. Yaşlanan fibroblastların sentez özellikleri değişir. (124)

Dermal kollajen sentezi azalır ve dermal ekstraselüler matriks miktarı azalır. Dermal ekstraselüler matriksin önemli bileşenleri olan GAG'ların miktarında (özellikle hyaluronik asit ve dermatan sülfat) azalma ile birlikte derminin su tutma kapasitesinde ve turgorunda azalma meydana gelir. (125) Kollajen fiberlerinde rastgele dağılım, kırılma, kalınlaşmaya bağlı dezorganize görünüm ve sonuçta total dermal dezorganizasyon gelişir. (120) Yaşlanmış deride tip-3/tip-1 kollajen oranı artar; bu artış tip-1 kollajen sentezinde azalmaya bağlıdır. (126)

Dermal matür kollajenin optimal fonksiyonunun sağlanabilmesi sürekli olarak gerçekleşen kollajen yıkımı ve yerine yeni kollajen liflerinin sentezlenmesine bağlıdır. Kollajenin benzersiz yapısı onu non-spesifik proteazların etkisinden korumaktadır. Matriks

metalloproteinazlar adı verilen bir grup enzim ise kollajen degradasyonundan sorumludur. Bu enzim ailesinde dört ayrı grup enzim bulunmaktadır (127)

1-Kollajenazlar

2-Jelatinazlar

3-Stromelizinler

4-Membran matriks metalloproteinazlar

Yaşlanmayla birlikte matriks metalloproteinazların aktivitesinde artış gözlenmektedir. Bu artıştan hem UVA hem de UVB radyasyonu sorumludur. (128, 129) Matriks metalloproteinaz üretimi artarken bu enzimlerin inhibitörlerinin üretiminin azaldığı gösterilmiştir. (124) Bu da azalmış kollajen sentezi ile birlikte dermal kollajen miktarını etkileyen önemli bir faktördür. (130)

Elastik liflerin yapısında ve kompozisyonunda geri dönüşümsüz değişiklikler yaşla birlikte artar. Zamanla bu liflerin yerini fonksiyonel olarak yetersiz olan amorf elastin alır. (131)

Deri de dahil olmak üzere tüm dokuların fonksiyonunu, genel yapısını belirlemesi ve yaşlanma sürecinden etkilenmesi nedeniyle doku kanlanması önemli bir faktördür. Kan damarlarının oksijen ve besin maddelerini taşıması yanında inflamasyon gibi defans mekanizmalarında ve metabolik artıkların uzaklaştırılmasında vazgeçilmez önemi vardır. Uygun kan dolaşımı derinin bir organ olarak fonksiyon görmesini ve organizmanın değişen çevreye adaptasyonunu sağlar. (132)

Mikrosirkülasyon üzerinde yapılan morfolojik ve fizyolojik çalışmalar yaşlanma ile birlikte derinin kanlanmasında düşme olduğunu göstermiştir. (132) Ultraviyole ışınlar ile oluşturulan yaşlanma modellerinde dermal matrikste anjiogenezin aktive olduğu gösterilmiş olsa da kronik ultraviyole ışın maruziyetinin deride kapiller yoğunluğu düşürdüğü gösterilmiştir. (133-135)

Deri bütünlüğünde bir şekilde bozulma gerçekleşecek olursa, epidermis ve dermiste mevcut olan hücre gruplarının proliferatif ve rejeneratif kapasitesinde azalmaya bağlı olarak deri bariyerinin tekrar oluşturulması zorlaşır. (113)

Derinin tüm birimlerinde su içeriğinde azalma yaşla birlikte gözlenir. Yaşlı deri ve genç deride normal şartlarda sıvı kaybına direnç benzer olmakla birlikte, bariyerde intrinsik ya da ekstrinsik nedenlerle oluşabilecek herhangi bir bozulma sonrasında yaşlı derinin yeniden yapılanması daha geç olur ve daha fazla sıvı kaybı gerçekleşir. (114)

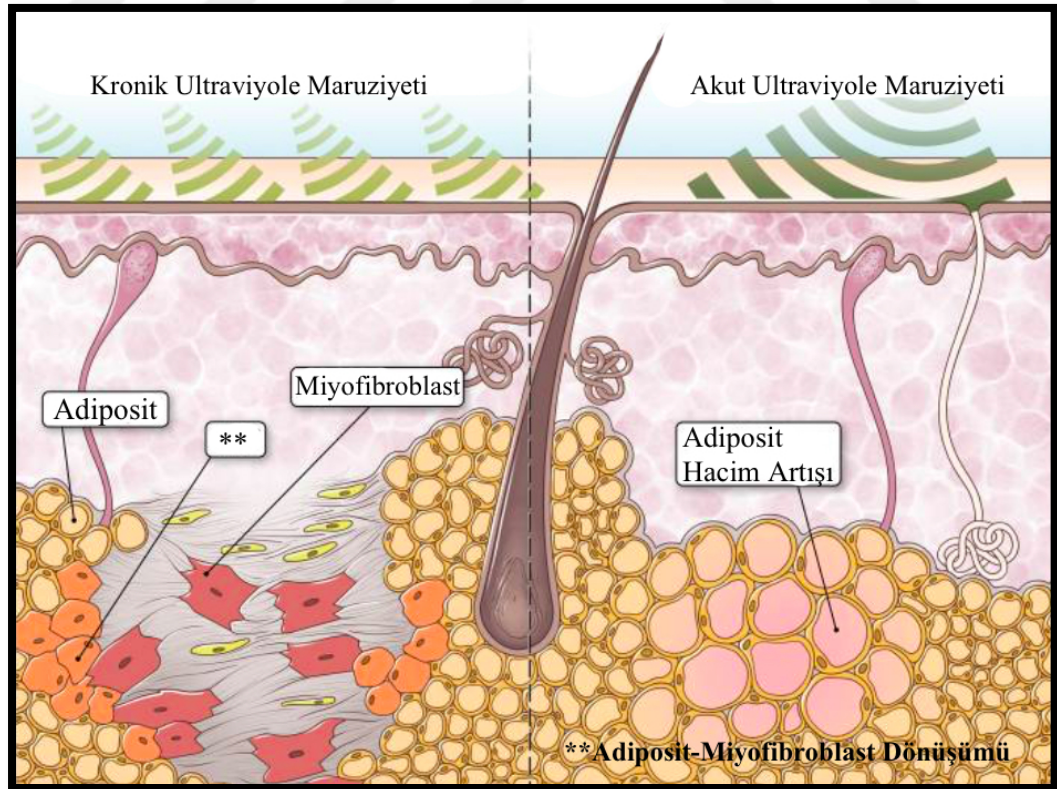
Dermisin rejeneratif kapasitesi dermal hücreler, vasküler yapılar ve ekstraselüler matrikste yaşlanmaya bağlı olan değişiklikler nedeniyle düşmektedir. Yaşlanan deride

dermisin intrinsik ya da ekstrinsik etkilerle zarar görmesi durumunda epidermis üzerinde yapısal, vasküler, rejeneratif ve nemlenmeyi artırıcı pozitif etkileri azalır. Antioksidan aktivitede azalma nedeniyle ultraviyole ışınların zararlı etkisi artar. Sonuçta termoregülasyon, duyu, vasküler rezerv negatif olarak etkilenir. (113)

Dermal ve epidermal seviyede gerçekleşen bu histolojik ve fizyolojik değişikliklerin sonucunda bazı klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Atrofi, laksite artışı, kırışıklık, kuruluk, pigment bozuklukları ve lekeler, neoplaziler, tırnak ve saç değişiklikleri gibi klinik değişiklikler tüm deri fonksiyonlarının etkilenmesi ile birliktedir. (Tablo 5) (113)

Subkutan dokuda olan değişiklikler:

Yaşlanma sürecinde özellikle ultraviyole ışınların subkutan yağ dokusuna etkileri gösterilmiştir. Akut ultraviyole maruziyeti subdermal seviyede adipositlerde hacim artışına neden olurken kronik maruziyet sonucunda adipositlerin yerini myofibroblastlar alır. Bu değişiklik sonucunda subkutan dokuda düzensiz fibrozis gelişerek heterojen bir deri yapısı ve hacim kaybı gerçekleşir. (136) (Şekil 12)



Şekil 12: Subkutan dokuda ultraviyole ışın maruziyetinin etkisi (136)

Tablo 5: Yaşlanma ile deride oluşan değişiklikler ve klinik sonuçları (113)

Azalmış Gerilme Gücü • Bül oluşumuna yatkınlık • Morarmada kolaylık • Artmış Çatlaklar • Frajil ve katlanmış tırnaklar • Purpura • Sürtünmeye duyarlılık • Laksite artışı • Yara ayrışması ve enfeksiyonunda artış • Travma ve basıda ülser oluşumunda kolaylık	Hücrel Yaşlanma • Yavaş hücre döngüsü • Yavaş ve eksik yara iyileşmesi • Büyüme faktörlerine azalmış cevap • Artmış selüler atipi ve kanseröz neoplazi oranı • Anormal hücrel büyüme ve non-kanseröz neoplazi • Ultraviyole (121) ve oksidatif hasara azalmış onarım cevabı • Apoptozda azalma • D-vitamini eksikliği
Deri Bariyerinde Bozulma • Kontakt dermatit riskinde artış • Kuruluk • Kaşınma • Pullanma, çatlama • Bant yapıştırma sonrası kolay yaralanma • Topikal kimyasal ve ilaç emiliminde artış • Kolay maserasyon • Kuruluğa bağlı sık dermatit	Protetik Fonksiyonda Azalma • Güneş hasarına artmış duyarlılık • İrregüler pigmentasyon • Dermal kapiller akımda azalma • Sinir miktar ve fonksiyonunda azalma nedeniyle protetik etkiye azalma • Azalmış lenfatik aktivite • Kontakt dermatit ve iritanlara artmış duyarlılık
Azalmış İmmünite • Kanserler • Artmış yüzeysel ve derin enfeksiyon • T-hücreli lenfomalar • Artmış otoimmün hastalık riski	Deri Eki ve Vasküler Problemler • İnce ve beyaz saç ve tüyler • Sebase hiperplazi ve azalmış sebum • Azalmış terleme ve bozulmuş termoregülasyon • Azalmış kapiller perfüzyon ve vasküler rezerv

Yaşlanma ile birlikte oluşan tüm bu histolojik ve klinik değişikliklerin geri döndürülebilmesi ya da hafifletilebilmesi amacıyla günümüzde uygulanan birçok invazif ve non-invazif tedavi yöntemi mevcuttur. (3)

2.2.3 Tedavi seçenekleri:

Güzel yaşlanma kavramı, sağlıklı olmaya ve günlük hayatta aktif rol almaya odaklanırken yaşlanmanın deri, yüz ve vücut üzerindeki etkilerini azaltmaya yönelik uygulanabilecek olan konseptleri kapsar. Gençleştirme terapilerinin temel amacı sağlıklı, pürüzsüz, mat olmayan, esnek bir deri elde etmektir. (3)

Deri gençleştirme stratejileri aşağıdaki tabloda olduğu gibi sınıflandırılabilir. (Tablo 6) Burada sınıflandırılan tedavi seçeneklerinin cerrahi tedavi seçeneklerini içermediği görülmektedir. Cerrahi tedaviler, dolgu enjeksiyonları ve nörotoksinler kas aktivitesine ve subkutan dokulara etki eder fakat derinin kendi yapısını etkilemez. (137)

Non-invazif Tedavi Seçenekleri:

Non-invazif deri bakımı ve gençleştirmede kozmetik ürünler; topikal, sistemik tedavi seçenekleri kullanılabilir (6)

a-Kurumuş Deri Bakımı:

- Cilt temizleyiciler: Genel olarak sıvı ya da kalıp halindeki sürfaktanları içerirler (sabunlar).
- Nemlendiriciler: Oklüzif materyaller (yağlı içerikler), su tutucular(Gliserin) yumuşatıcılar,
- Hidroksi Asitler: Keratinizasyonu hızlandırır (Laktik asit, glikolik asit, salisilik asit)

b-Hassas Deri Bakımı:

Akne, flushing, kaşınma, dermatit bulgularının izlendiği deri tipidir.

- Topikal kortikosteroidler
- Sistemik siklooksijenaz inhibitörleri
- Topikal salisilik asit
- Sülfür sülfasetamid
- Doğal ürünler:

Aloe vera, papatya, ginseng, meyan kökü, ginseng, bazı mantarlar, yulaf, selenyum, zerdeçal, selenyum

Tablo 6: Deri gençleştirme tedavi seçeneklerinin sınıflandırılması (3)

Kozmetik Bakım	• Günlük deri bakımı • Doğru güneş koruması • Non-invazif estetik prosedürler
Topikal Ajanlar	• Antioksidanlar • Hücre regüle edici ajanlar
İnvazif Uygulamalar	• Kimyasal soyma • Görülebilir ışık uygulamaları • Yoğun atımlı ışık (IPL) uygulamaları • Lazer uygulamaları • Radyofrekans uygulamaları • Biyouyarıcı ajan enjeksiyonları • Dinamik kırışıklıkların önlenmesi (Botulinum toksini) • Statik-anatomik kırışıklıkların düzeltilmesi • Yağ dağılımının düzenlenmesi, kontur ve hacim düzenlenmesi (Dolgular)
Sistemik Ajanlar	• Hormon replasman tedavisi • Antioksidanlar
Dış Etkenlerden Korunma, Yaşamın Düzenlenmesi	• Tütün kullanımı • Hava kirliliği • UV maruziyeti • Günlük Stres • Beslenme düzenlenmesi • Fiziksel aktivite artırılması • Genel sağlık kontrolü sağlanması

c-Pigmente Deri Bakımı:

- Tirozinaz inhibitörleri (hidrokinon, hidroksikumarin)
- Melanozom transfer inhibitörleri (Niasinamid)

d-Kırışmış Deri Bakımı:

- Retinoidler
Antioksidanlar (C-vitamini, E-vitamini, koenzim-Q, üzüm ekstresi, resveratrol, yeşil çay, likopen)

İnvazif Tedavi Seçenekleri:

a- Yüzey yenileme teknikleri

Yüzey yenileme tekniklerinde genel olarak deriye kontrollü hasar verilerek yara iyileşme potansiyeli en üst seviyeye çıkarılır ve skar formasyonu en aza indirilir. Yara iyileşmesi üç ayrı formda gerçekleşir: reepitelizasyon, skar formasyonu ve kontraksiyon. (138)

Yüzey yenileme tekniklerinde daha pürüzsüz ve tazelenmiş deri görünümü elde etmek amaçlanır. (1) Yüzey yenileme teknikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (5, 139)

- Ablatif Lazer Uygulamaları
Fraksiyone Lazer
Non-Fraksiyone Lazer
- Non-Ablatif Lazer Uygulamaları
Fraksiyone Lazer
Non-Fraksiyone Lazer
- IPL Uygulamaları (Ablatif, Non-Ablatif)
- Kimyasal soyma uygulamaları
Yüzeysel
Orta Derinlikte (Ablatif)
Derin (Ablatif)
- Dermabrazyon (Ablatif)
- Mikrodermabrazyon
- Mikroiğne Uygulamaları
- Ultrason, radyofrekans, kriyolipoliz uygulamaları

b- Botulinum toksini uygulamaları

Botulinum toksini derinin yapısına etki etmez ve yaşlanma sürecini yavaşlatmaz. Bununla birlikte düzenli botulinum toksini uygulaması ile dinamik kırışıklıkların önüne geçilerek yaşlanma belirtileri görünmez hale getirilebilir. (3)

Botulinum toksini anaerobik bakteri olan Clostridium botulinum tarafından salgılanan bir toksindir. (140) Botulinum toksini spesifik olarak son motor nörondan asetilkolin salgılanmasını bloke eder. Bu etki geçici bir etki olarak ortaya çıkmaktadır. Bu toksinin ilaç olarak kullanılabilmesi için izole edilmesi, saflaştırılması ve stabilize edilmesi gerekmektedir. (141) Toksinin yedi ayrı antijenik tipi vardır (Botulinum toksin-A, B, C, D, E, F, G). C ve D subtipleri insan sinir sisteminde etki göstermemektedir. (140, 142) Tip-A estetik amaçlı kullanımlarda açık ara en sık kullanılan toksindir. Tip-B'nin estetik prosedürlerde kullanımı da tarif edilmiştir. (143)

Bu etkiler sayesinde frontal, glabellar, periorbital, perioral, servikal yüzeyel kırışıklıkların ve hiperhidrozun geçici tedavisi sağlanabilir. (144)

c- Yumuşak doku dolguları

American Society of Plastic Surgeons verilerine göre 2017'de Amerika Birleşik Devletleri'nde 2,69 milyon yumuşak doku dolgu uygulaması yapılmıştır. Yaşlanma, kontur defektleri, kırışıklıklar ve skar dokunun tedavisinde dolgu yöntemleri giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır. (7) Bu prosedürlerde kullanılmak üzere piyasaya sunulmuş yaklaşık 200 ürün bulunmaktadır. (145)

İdeal bir dolgu maddesinin non-immünojenik, hipoallerjenik, immobil, kalıcı, uygulamaya hazır ve ucuz olma; minimal enfeksiyon riski taşıma, kolay ulaşılabilme gibi özellikleri taşıması istense de şimdiye kadar bu özelliklerin hepsini birden karşılayan bir dolgu maddesi henüz tanımlanmamıştır. Sık olarak uygulanan dolgu maddelerinde en büyük sorun ise bu ürünlerin kalıcılıklarının bir yıldan daha az olması ve tekrarlayan uygulamalar gerektirmesidir. (7)

İdeal dolgu maddesinden beklenen özellikler aşağıdaki tabloda yer aldığı şekilde özetlenebilir. (146) (Tablo 7)

Tablo 7: İdeal dolgu maddesinden beklenen özellikler

Başlık	Beklenen Özellik
Materyal	Biyouyumluluk
	Non-Antijenik
	Non-Toksik
	Non-Karsinojenik
	Non-teratojenik
Performans	Tekrarlanabilme
	Kalıcı Sonuç
	Kalıcı Hacim
	Şekillendirilebilme
	Çok Güvenli Olma
	Minimal Uzak Doku Reaksiyonu
	Enjeksiyon Alanından Minimal Migrasyon
Teknik	Kolay Uygulanabilir Olma
	İstenilen Bölgeye Enjeksiyonu Sağlayacak Formda Olma
	Uygun Enjeksiyonu Sağlayacak Şekilde Değişken Olmayan Formda Olma
Subjektif Tatmin	Öngörülebilir Sonuç
	Minimal Beklenmeyen Etki
	Hızlı Sonuç Verme
Diğer	Profesyonel Topluluk ya da Hükümetlerce Onaylanma
	Çok Yönlü Uygulama Olanağı
	Ulaşılabilir ve Ucuz Olma
	Geri Dönüşümlü Olma

Gerek rekonstrüksiyon olgularında gerekse kozmetik yaklaşım gerektiren olgularda yumuşak doku augmentasyonu amacıyla kullanılabilecek dolgu maddeleri çeşitli özellikleri göz önünde bulundurularak sınıflandırılabilir. (Tablo 8) (146)

Tablo 8: Yumuşak doku dolgularının sınıflandırılması

Sınıflama	Alt Sınıf	Tipik Örnek
Kalıcılık	Kalıcı Olmayan	Kollajen, Hyaluronik asit
	Yarı Kalıcı	Poli-L-Laktik Asit, Kalsiyum Hidroksiapatit, Hyaluronik Asit
	Kalıcı	Polimetilmetakrilat, Poliakrilamid, Silikon
Kaynak	Otolog	Yağ Grefti
	Biyolojik	Kollajen, Hyaluronik asit
	Sentetik	Poli-L-Laktik Asit, Kalsiyum Hidroksiapatit, Hyaluronik Asit
Uygulama Zorluğu	Düşük Derece	Polimetilmetakrilat, Poliakrilamid, Silikon
	Orta Derece	Kollajen, Hyaluronik asit
	Yüksek Derece	Yağ Grefti, Poli-L-Laktik Asit, Kalsiyum Hidroksiapatit, Polimetilmetakrilat, Poliakrilamid, Silikon

d- Biyouyarıcı ajan enjeksiyonları

Birçok çalışmada deri gençleştirme tedavi stratejilerinin hedefi, fibroblastların biyosentetik kapasitesini artırmak, doku düzeyinde optimal fizyolojik çevreyi oluşturmak, hücrel aktiviteyi artırmak, hidrasyon sağlamak ve bunların yanında kollajen, elastin, hyaluronik asit gibi ekstraselüler matriks komponentlerinin sentezini artırmaktır. İstenen bu etkileri sağlamak için hyaluronik asit, vitaminler, mineraller, hormonlar, büyüme faktörleri, amino asitler, otolog kültüre fibroblastlar tek başına ya da kokteyller halinde dermise enjekte edilebilir. (3)

Laboratuvar ortamında elde edilen büyüme faktörleri ya da bu faktörleri taşıyan ticari skafold yapılar ve viral vektörler kullanılarak biyouyarıcı etki elde edilebilir.(147) Otolog dokulardan elde edilen PRF ve SVF de in vivo olarak belirgin büyüme faktörü salınımı yapmaktadır. (148-150) Ayrıca tıpkı PRP gibi platelet konsantresi olan PRF'nin otolog doku rejenerasyonunda kullanılabilen kompleks, doğal bir skafold olduğu gösterilmiştir. PRF'nin yara iyileşmesi ve rejenerasyon özellikleri daha önce tanımlanan PRP'ye göre daha gelişmiştir. (151)

Plateletten Zengin Plazma (PRP) ve Plateletten Zengin Fibrin (PRF)

Trombositler periferik kandan izole edilebilen otolog büyüme faktörü kaynaklarıdır. Trombositler içerdikleri büyüme faktörleri yardımıyla temel olarak hemostaz ve yara iyileşmesi aşamalarında etki göstermektedirler. (152) Bu faktörler ayrıca yara iyileşmesinin regülasyonu, stimülasyonu kritik öneme sahiptir. Bunun yanında hücre mitogenezi, kemotaksisi, diferansiasyonu ve metabolizmasının regülasyonunda önemli rol oynar. (153)

Doğal şartlarda yara iyileşmesini başlatan temel mekanizma yaralanma bölgesinde oluşan trombosit ve fibrin içerikli tıkaçtır. Bu tıkaç %95 eritrosit, %5 trombosit ve %1'den daha az oranda lökosit ile birlikte bol miktarda fibrin içermektedir. PRP, hızlı ve tam yara iyileşmesini başlatabilmek amacıyla daha zengin ve trombositten yoğun hale getirilmiş tıkaç elde edilmesi için basit bir stratejidir. PRP içeriğinde %4 eritrosit, %95 trombosit, %1 lökosit bulundurmaktadır. (152)

Normal şartlar altında insan kanında mikrolitredeki trombosit sayısı $150-350 \times 10^3$ iken bu sayı 10×10^6 ve üzerine çıktığında klinik olarak bazı pozitif etkileri olduğu görülmüş. (150) (154)

Trombositlerin yoğun olarak barındırdıkları iki ayrı bazik granül yapısı vardır. Bunlar alfa granüller ve yoğun granüllerdir. Alfa granüllerde en azından yedi ayrı protein yapılı büyüme faktörü bulunur. Bunlar: platelet kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) üç ayrı alt grubu, dönüştürücü büyüme faktörü-beta'nın (TGF- β) iki ayrı alt grubu, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epitelyal büyüme faktörüdür (EGF). (150) Alfa granülleri ayrıca fibrinojen, fibronektin ve vitronektin olmak üzere üç ayrı adezyon molekülünü de içerir. (149) İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), endotelial hücre büyüme faktörü (ECGF) ve platelet kaynaklı anjiyogenez faktörünün (PDAF) de alfa granüllerde bulunduğu saptanmıştır. (148, 149)

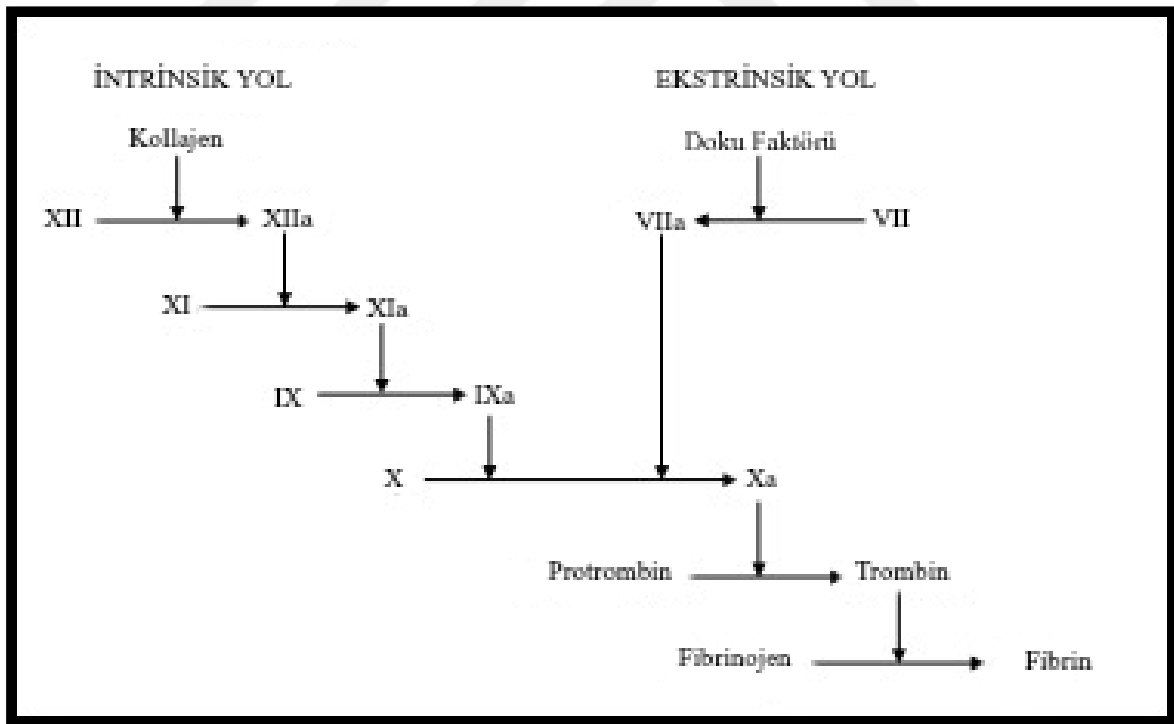
Yoğun granüllerde serotonin, histamin, kalsiyum, dopamin, adenosin gibi yara iyileşmesinde etkili biyoaktif moleküllerin bulunduğu gösterilmiştir. (149)

Geleneksel PRP tam kanın antikoagülanların eklenmesi sonrasında iki aşamalı olarak santrifüjden geçirilmesi ile elde edilen konsantre trombosit süspansiyonu olarak nitelendirilebilir. Birinci santrifüj ile trombositlerin eritrositler ve plazmadan ayrılması sağlanır. İkinci santrifüje geçerken eritrositlerin olduğu tabaka atılarak plazma ve platelet karışımı tekrar santrifüj işlemine tabi tutulur. İkinci santrifüj işlemi plateletlerin çökmesini sağlar. Çökmesi sağlanan platelet tabakası bir miktar plazma ile birlikte alınarak PRP elde edilmiş olur. (155)

Daha önce bahsedildiği gibi trombositler granüllerinde çeşitli büyüme faktörleri içermektedir. Bu faktörlerin salınımı için trombositlerin aktive edilmesi gerekmektedir. Trombositlerin aktivasyonu için trombin, kalsiyum klorid, kollajen, adenozin 5-difosfat ile muamele edilmesi gerekmektedir. (156)

PRF, ikinci kuşak PRP olarak adlandırılmış ve ilk olarak Choukroun ve arkadaşları tarafından tanımlanarak oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılmıştır. (157)

PRF, yöntemi bulan Choukroun tarafından tanımlandığı şekliyle 10 ml tam kanın antikoagülan içermeyen plastik tüpte toplanarak 3000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilmektedir. Santrifüj sonrasında yüzeye yakın olan ve PRF olarak adlandırılan turuncu renkli katman tam kandan ayrışmaktadır. Santrifüj sırasında merkezden daha uzağa giden ve tüpün tabanına yönelen koyu renkli kısımda ise kanın diğer şekilli elemanları bulunmaktadır. (158) Enjekte edilebilir formda PRF elde edebilmek için antikoagülan maddeler kullanılabileceği gibi, koagülasyon kaskadının tamamlanmasından önceki süre gözetilerek ek bir katkı maddesi kullanımı önlenebilmektedir. (Şekil 13) İnsanda bu süre yaklaşık olarak 10 dakikadır. (159)



Şekil 13: Koagülasyon kaskadı

PRF, doku rejenerasyonu ve fizyolojik yara iyileşmesinde gerekli olan endojen protein içeriğinin fazla olması ve kolay elde edilebilmesi nedeniyle biyomühendislikte yaygın kullanım alanı bulmuştur. (160)

PRF sadece içeriğindeki trombositlerden kaynaklanan bir etkiye sahip değildir, aynı zamanda fibrin matriksin de doku düzeyinde etkileri mevcuttur. Fibrin hücre infiltrasyonu için doğal bir matriks oluşturur ve aynı zamanda anjiogenik etkiye sahiptir. (161)

Fibrin enjekte edildiği dokuya yapışarak çevresindeki hücreler ve kan yoluyla ulaşan hücreler için bağlanma, migrasyon, proliferasyon bölgesi olarak görev yaparak doku rejenerasyonunu indükler. (162)

Fibroblast infiltrasyonu sayesinde otolog kollajen üretimi gerçekleşir ve degrade olan fibrin yerini kalıcı olan otolog kollajene bırakır. (7)

Antikoagülan ve trombin derivesi ürünlerin kullanımını gerektirmemesi PRF'nin en önemli avantajlarından biridir. PRF basit teknikler ile elde edilebilmektedir. Trombositler hapsoldükleri fibrin tıkaç içerisinde aktive olarak büyüme faktörü salınımına başlar ve bu büyüme faktörleri de trombositler gibi fibrin tıkaç içerisinde hapsolur. Birçok çalışmada PRP'den olan 24 saatlik hızlı büyüme faktörü salınımının aksine PRF'den etkin büyüme faktörü salınımının 28 güne kadar devam ettiği gösterilmiştir. (16, 163)

İnsan kolunda dermis ve subdermise PRF enjeksiyonu sonrasında 7. günde yapılan histopatolojik çalışmada bu bölgedeki fibroblastların aktive olduğu ve belirgin yeni kollajen üretiminin olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada 19. günde selüler atipi bulgusu saptanmaksızın belirgin anjiogenez ve adipogenez saptandığı bildirilmiştir. Onuncu haftada ise fibroblast cevabının devam etmesi yanında yeni kollajen üretimi ve anjiogenezin devam ettiği gösterilmiştir. (19)

Yapılan bir çalışmada PRF ve SVF ile karıştırılarak enjekte edilen otolog yağ greftinin dördüncü haftada yeni adipöz doku üretimine neden olduğu görülmüş ve 24 hafta sonunda adipöz dokuların yeni oluşmuş kan damarlarıyla birlikte hacim kaybına uğramadan varlığını sürdürdüğü gösterilmiştir. (16)

PRP; anjiogenik etkisi olan, zengin kanlanma yardımıyla yağ grefti viabilitesini artıran, preadipositlerin ve adipöz doku kaynaklı kök hücrelerin proliferasyonunu artırmış bir üründür. Bu etkilerin istendiği durumlarda ideal bir bileşim olarak görülmüştür. PRP'nin bu etkilerine ek olarak daha uzun etki sağlayan, fibrin etkisini kombine eden PRF'nin gençleştirme prosedürlerinde PRP'ye göre daha belirgin ve güçlü bir etki ortaya koyacağı söylenebilir. (164)

Yağ Grefti ve Stromal Vasküler Fraksiyon

On dokuzuncu yüzyılda tanımlanan otolog yağ grefti aynı zamanda tanımlanan ilk yumuşak doku dolgusudur. Tanımlandığı zamandan bu yana yağ greftlerinin elde edilmesi ve transferi için birçok teknik tanımlanmıştır. (165) Otolog yağ grefti rekonstrüktif cerrahide olduğu gibi estetik cerrahide de sıklıkla kullanılmaktadır ve çoğunlukla yağ aldırma yoluyla elde edilmektedir. (Şekil 14) (8) Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin en popüler uygulamalarından biri olan liposakşın uygulaması 1974'te Fisher tarafından tanımlanmıştır. Liposakşın tekniğinin tanımlanması ile birlikte 1985'te Klein tarafından tümesan liposakşın tekniğinin tanımlanması otolog yağ doku transplantasyonunun gelişimini hızlandırmıştır. (9, 10) 1980'lerden bu yana otolog yağ transplantasyonu plastik cerrahi tarafından uygulanan en popüler prosedürlerden biri haline gelmiştir. (8)

Pratik uygulamada transplante edilen yağ dokusunun %40-70 oranlarında atrofiye uğraması ve sonucun belirsizliği nedeniyle tekrarlayan seanslara hemen her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. (166, 167) Yoshimura ve arkadaşlarının yağ dokusu kaynaklı kök hücreler ile zenginleştirilmiş yağ doku transferi uyguladıkları klinik çalışmalarda, sonuçların klasik lipoenjeksiyonlara göre daha başarılı olduğu, yağ birikiminin arttığı, seans sayısının azaldığı tespit edilmiştir. (15, 168) Matür yağ hücreleri dayanıklı değildir ve hipoksiye olan duyarlılıkları yağ dokusu kaynaklı kök hücrelere göre daha fazladır. Bu nedenle matür yağ dokusu viabilitesinin artırılması amacıyla kök hücreden zenginleştirilerek uygulanabilir. (151, 169)

Yoshimura ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada intakt yağ dokusunun sayıca %16 adiposit, %30 adipoz kökenli kök hücre, %15 endotel, %9 kan orijinli hücreler ve %30 diğer hücrelerden oluştuğu bildirilmiştir. (170)

Kültüre edilmiş, modifiye edilmiş veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin laboratuvar ortamında kullanımında her geçen gün ilerlemeler olmaktadır. Bununla birlikte bu hücrelerin klinik kullanımı da hızla yaygınlaşmaktadır. (171)

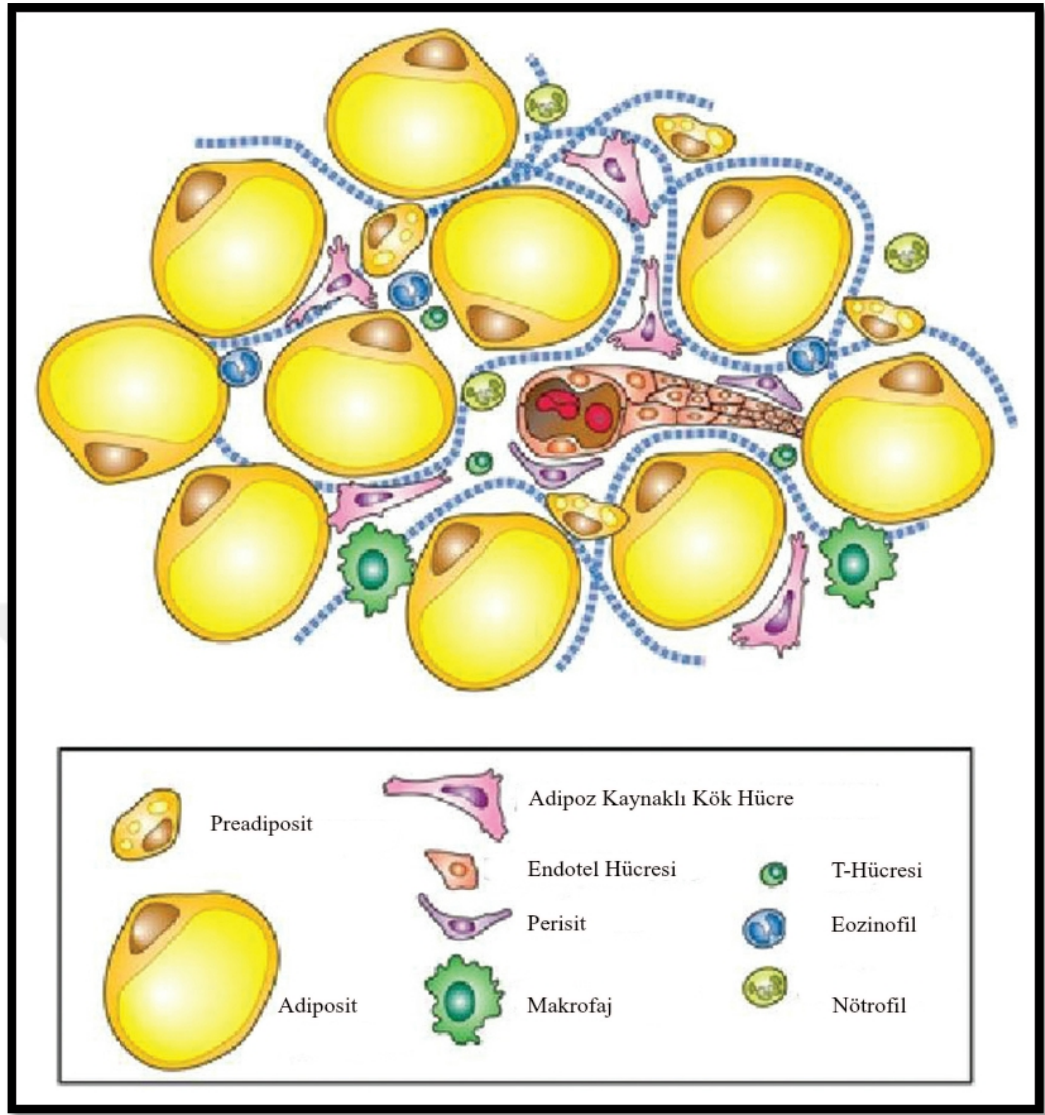
Adipoz kaynaklı kök hücrelerinden yüksek miktarlarda büyüme faktörü salınımı olduğu gösterilmiştir. Bu büyüme faktörleri epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), plateletten türemiş büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), insülin büyüme faktörü (IGF) ve beyinden türemiş nörotrofik faktör (BDNF)'dir . (172) Bu büyüme faktörleri temel olarak anjiogenik, anti-apoptotik etki gösterir ve hipoksik ortamlarda sekresyonları belirgin olarak artar. (173-175)

Preklinik ve klinik çalışmalar adipoz kaynaklı kök hücrelerin transplantasyon sonrasında aktarıldıkları alanda yaşamaya devam ettiklerini, pluripotent diferansiasyon özelliklerini devam ettirdiklerini, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar özellik gösterdiklerini, anjiogenik fonksiyonları olduğunu göstermiştir. (171, 176-180)



şekil 14: Lipoaspirat

Adipoz kaynaklı kök hücrelerin yağ doku içerisindeki tam lokalizasyonu hakkında kesin bir ortak fikir olmasa da bu hücrelerin stromada diğer hücrelerle birlikte bağ doku içerisinde ya da perivasküler alanlarda yoğun olarak yerleştiğini bildiren yayınlar mevcuttur. (16, 171, 181) (şekil 15)



Şekil 15: Yağ dokusunun yapısı ve içeriğindeki hücrelerin şematik görünümü (181)

Adipoz doku kaynaklı kök hücre elde etmek son yıllarda kolay bir yöntem haline gelmiştir. Buna rağmen kültür yöntemleri kullanılarak klinik kullanım için yeterli miktarda kök hücre elde etmek zaman isteyen, pahalı, güvenilirliği tartışmalı bir durumdur. (182)

Adipoz kaynaklı kök hücreler klinikte izole kök hücre süspansiyonları halinde kullanılmak yerine çoğunlukla lipoaspiratlardan mekanik ya da enzimatik yollarla elde edilen stromal vasküler fraksiyonun bir komponenti olarak kullanılmaktadır. (171)

Stromal vasküler fraksiyon (SVF) hücreleri için klasik tanım ‘‘kollajenaz ile sindirilmiş adipoz dokudan santrifüj ile elde edilebilen ve endotel hücreleri, perisitler, düz kas hücreleri, mast hücreleri, lökositler, adipoz kaynaklı kök hücreler, ekstraselüler matriks, fibröz doku, eritrositlerden oluşan heterojen bir hücre grubu’’ şeklindedir. (176, 183-185) Bu klasik tanıma

rağmen kollajenazın kullanılmadığı ve SVF'nin mekanik olarak elde edilebildiği birçok yöntem de vardır. (171)

SVF myokard enfarktüsü, kozmetik cerrahi, osteoartrit, kemik rejenerasyonu, inflamatuvar barsak hastalıkları ve kronik yaralar gibi birçok alanda yapılan çalışmalarda kullanılmıştır. (186-189)

SVF hücreleri kültür yapılmasını gerektirmeksizin, adipoz doku rejenerasyonu için alternatif bir hücre kaynağı olarak kullanılabilir. SVF hücrelerinin kullanımı ex-vivo hücre kültürü ve taşıma basamaklarında gelişebilecek olan hücresel dönüşümlerin de önüne geçmektedir. (16)

SVF'nin, özellikle de adipoz kaynaklı kök hücreler ve endotelyal progenitor hücrelerin anjiyogenik ve neovaskülojenik etkileri gösterilmiştir. (190)

Ratlarda SVF intradermal olarak uygulandığında üçüncü ve yedinci günlerde fibroblast migrasyonu, stimülasyonunda belirgin artış saptanmış ve otuzuncu günde bu uyarı kollajen sentezinde artışla sonuçlanmıştır. (191)

Yapılan bir in-vitro çalışmada fibroblast ve SVF hücrelerinin ekstraselüler matriks sentez kapasiteleri değerlendirilmiştir. SVF hücrelerinin kollajen ve GAG sentezlediği gösterilmiştir. SVF hücrelerinin kollajen sentez kapasitesi fibroblastlara göre %50-52 ve GAG sentezleme kapasitesi %70-74 olarak saptanmıştır. Bu doğrultuda ekstraselüler matriks sentezleme kapasitesi yaklaşık olarak %60 olarak bildirilmiştir. (192)

Günümüzde SVF elde etme yöntemleri enzimatik ve mekanik yöntemler olmak üzere temelde iki ana grup altında incelenebilir. (171)

Enzimatik yöntemler SVF hücrelerinin doku düzeyinden serbestlenmesini sağlamak amacıyla çeşitli yıkama, santrifüj, eritrosit lizis, filtrasyon işlemlerinin yanı sıra lipoaspiratın kollajenaz, tripsin, dispaz gibi enzimler ile sindirilmesi aşamasını içeren yöntemlerdir. (193, 194)

Mevcut enzimatik teknikler mekanik teknikler ile karşılaştırıldığında enzimatik tekniklerin mekanik tekniklere kıyasla 1000 kata kadar etkili sonuçlar sağlayabildiği gösterilmiştir. Bu farklılığı sağlayan ise kollajenazın kök hücrelerin ve stromal hücrelerin ekstraselüler matriksten serbestlenmesini tanımlanmış mekanik yöntemlere göre daha efektif yapmasıdır. (171)

Kollajenaz bazlı tekniklerle elde edilen SVF hücre sayısı farklı kaynaklarda 5×10^3 ile 1.3×10^6 arasında değişen sayılarda bildirilmiştir. Bu karışımlarda bildirilen kök hücre oranları da %1'den az olabilmekte ya da %15'e kadar çıkabilmektedir. (171)

Kollajenazın SVF hücrelerini serbestlemek yanında bu hücrelerdeki yüzey moleküllerini de etkileyebileceği ve hücrelerin doku düzeyinde davranışlarını değiştirebileceği fikri tartışmaya açık bir konudur. (195)

Kollajenaz aşaması içeren tekniklerin tamamı gram lipoaspirat başına maliyet açısından mekanik tekniklere göre daha pahalı bulunmuştur. (171, 196, 197)

Enzimatik yöntemler manuel olarak gerçekleştirilebildiği gibi çok sayıda tam ya da yarı otomatik enzimatik SVF izolasyon cihazı da piyasada mevcuttur ve aktif olarak klinik kullanıma sunulmuştur. (194)

Mekanik Yöntemler SVF hücrelerinin doku düzeyinden serbestlenmesi işlemleri sırasında kimyasal ya da enzimatik herhangi bir işlemin uygulanmadığı yöntemlerdir. Bu yöntemlerde temel olarak santrifüj, vibrasyon, çalkalama, süzme, radyasyon uygulama, basınç uygulama işlemlerinden bir ya da birden fazlası kullanılmaktadır. (171, 194)

Mekanik yöntemler enzimatik yöntemlere göre daha hızlı sonuç elde edilen yöntemlerdir. Lipoaspiratın elde edilmesinden sonra SVF hücrelerinin elde edilmesine kadar geçen süre ortalama 15-20 dakika iken enzimatik yöntemlerde bu süre yaklaşık olarak 90-120 dakikadır. (171)

Mekanik yöntemlerle elde edilen SVF hücre sayıları 1×10^4 ile 2.4×10^5 arasında değişmektedir. (171, 197-199)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyisel çalışma olarak kurgulanan bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu'na verilen çalışma projesinin onayının ardından Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım kılavuzunda belirtilen şartlarda bakımı yapılan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Deneyisel Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanan 24 adet, 8-12 aylık, 2.5-3 kg ağırlığında, dişi Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı.

Deney Hayvanlarının Bakımı

Deney hayvanları uluslararası deney hayvanı bakım ve deney kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 23 ± 2 santigrat derece ($^{\circ}\text{C}$), 12 saat gündüz/gece siklusu) kafeslere alındı. Deney hayvanları Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda standart koşullarda beslenerek takip edildi.

Denekler standart tavşan yemi ve suyun yanında haftanın iki günü taze marul ve havuç ile beslendi. Cerrahi sonrası ilk bir hafta insizyon hattında hiperemi, ödem, enfeksiyon takibi açısından günlük olarak povidon iyot ve steril gazlı bez ile yapılan konvansiyonel pansumanlar ile denekler izlendi. Pansuman malzemelerinin korunmasını sağlamak ve otomutilasyonu engellemek için kumaştan yapılmış koruyucular giydirildi.

Anestezi şekli

Bu çalışmada kullanılan deneklerin anestezisi, 35 mg/kg ketamin (Ketalar 500mg/10ml Flakon. Pfizer İlaçları Ltd. Şti.) ve 5 mg/kg ksilazin klorür (Basilazin 500mg/25ml Flakon Bavet İlaç A.Ş) intramüsküler olarak uygulanarak sağlanmıştır.

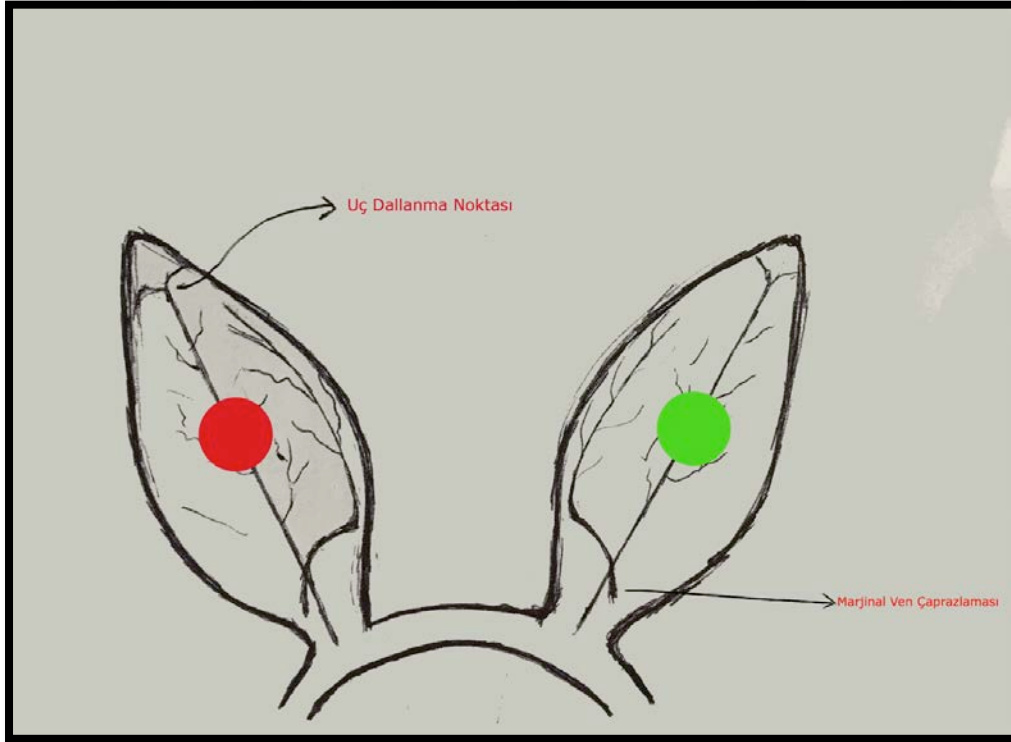
Hayvan Modeli

PRF ve SVF'nin doku düzeyinde etkileri, tavşan kulağında yapılan subdermal enjeksiyonlar sonrasında araştırıldı. Enjeksiyon bölgesi belirlenirken tavşan kulağında santral arterin marjinal ven ile kesiştiği nokta ile santral arterin uç dallanma noktası işaretlendi. Bu

iki nokta arasındaki mesafenin orta noktası merkez olarak referans alınarak 2 cm çapında dairesel alan belirlendi ve bu alana enjeksiyon yapıldı (Şekil 16).

Deney Grupları

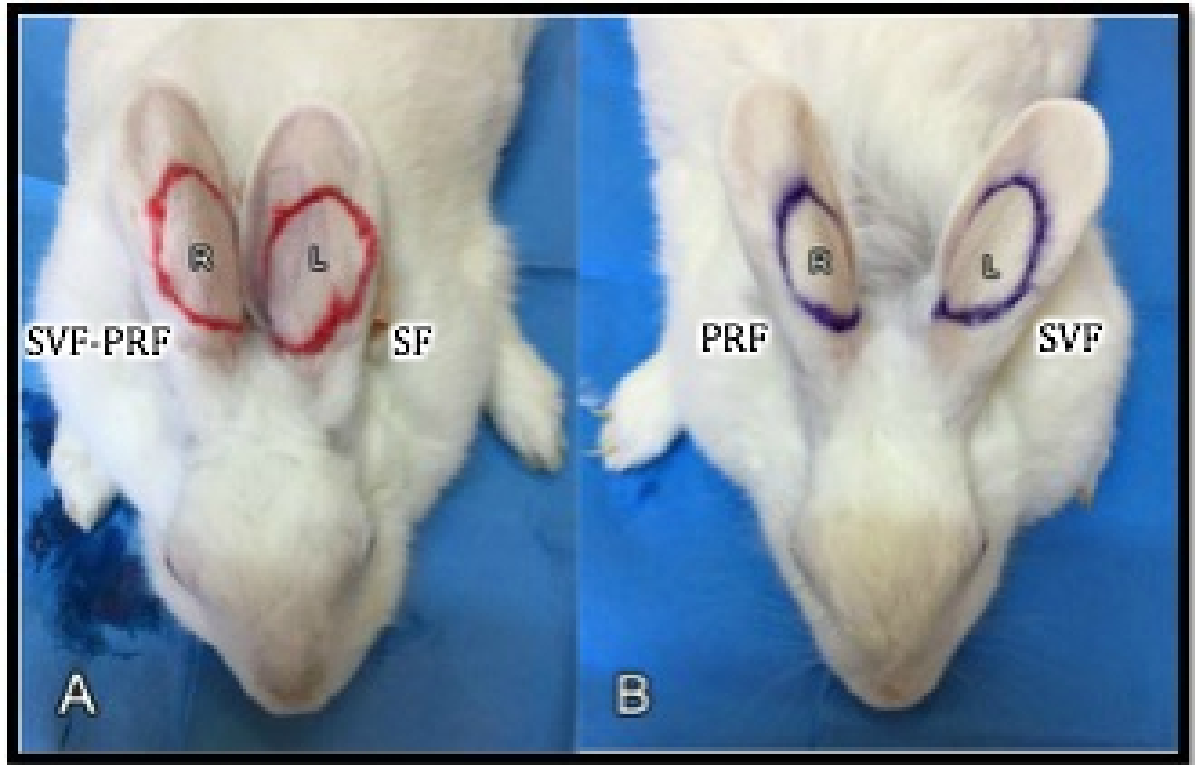
Denekler iki ana sınıfa ayrıldıktan sonra kullanılan her deneğin sağ kulağı bir grubu ifade ederken diğer kulağı başka bir grubu ifade edecek şekilde çalışma grupları planlanmıştır. Birinci denek sınıfında sol kulakta **Serum Fizyolojik (SF)**, ve sağ kulakta **SVF+PRF** yer alırken; ikinci denek sınıfında sol kulakta **SVF** ve sağ kulakta **PRF** yer alacak şekilde **4 ayrı çalışma grubu 2 ayrı denek sınıfında** modellendirilmiştir (Tablo 9, Şekil 17). Birinci ve ikinci denek sınıflarında eşit şartların sağlanması amacıyla her birinde inguinal bölgelere cerrahi işlem uygulanacak ve eşit miktarlarda tam kan örneği alınacak şekilde çalışma grupları belirlenmiştir. Grupların denek sınıflarında dağılımı sayesinde cerrahi uygulanan ve uygulanmayan denek sınıfları oluşmamıştır; uygulanan prosedürler açısından homojen bir dizayn oluşturulabilmiştir. Deney hayvanları birinci hafta, birinci ay, ikinci ay ve üçüncü ay sonunda her gruptan üç denek sakrifiye edilerek doku örnekleme alınacak şekilde zamana göre de gruplandı. (Şekil 18)



Şekil 16: Hayvan modeli. Tavşan kulağında enjeksiyon yapılan alanlar kırmızı ve yeşil renkli daireler olarak gösterilmektedir. Tavşan kulağında santral arter uç dallanması ve marjinal ven ile proksimal seviyedeki çaprazlanma çizimde görülmektedir.

Tablo 9: Deney grupları ve yapılan işlemler

Gruplar	İşlem
SF	Dermal ve subdermal 2 ml % 0,9 NaCl enjeksiyonu
SVF+PRF	Dermal ve subdermal 1 ml PRF + 1 ml SVF enjeksiyonu
SVF	Dermal ve subdermal 2 ml SVF enjeksiyonu
PRF	Dermal ve subdermal 2 ml PRF enjeksiyonu

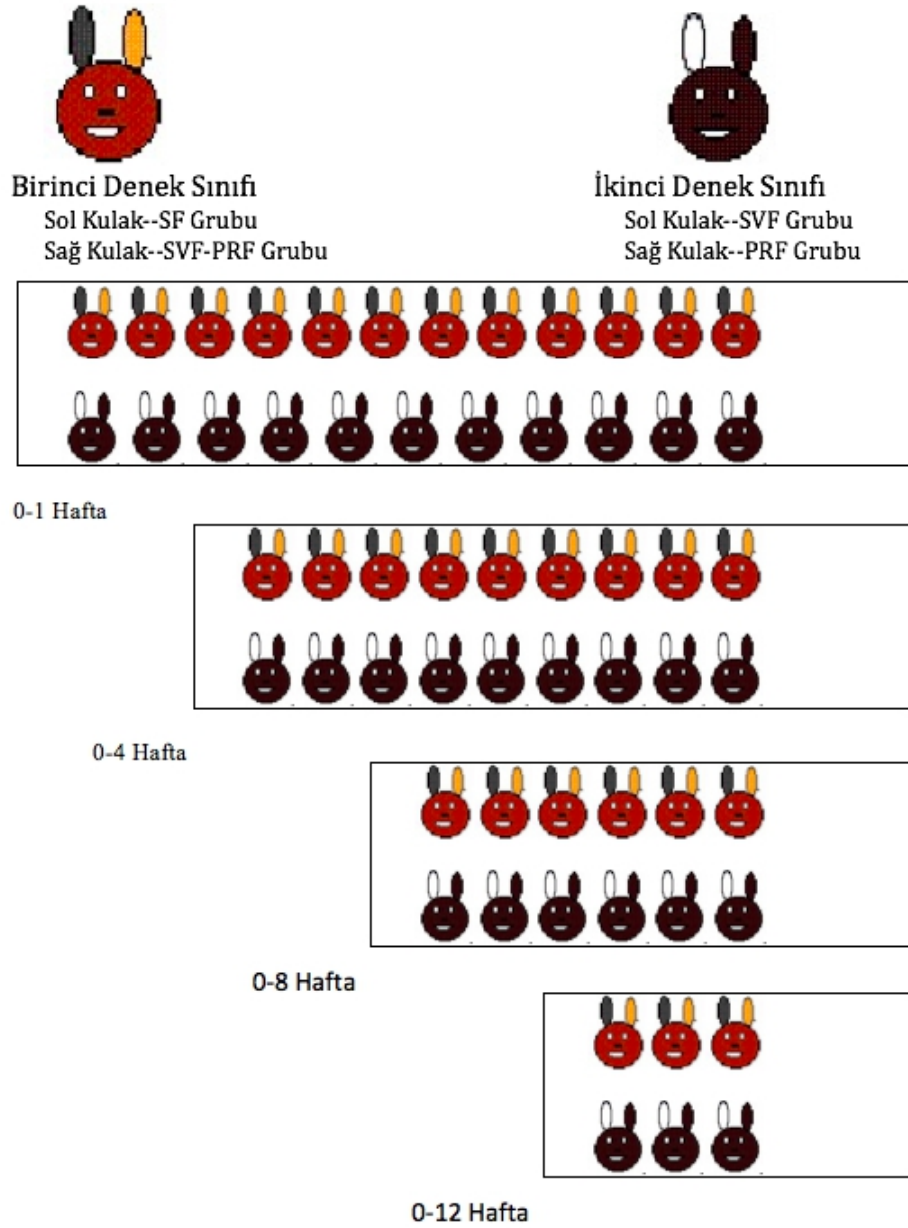


Şekil 17: Deney grupları. A: Birinci ve ikinci grupların yer aldığı tavşan sınıfı B: Üçüncü ve dördüncü grupların yer aldığı tavşan sınıfı

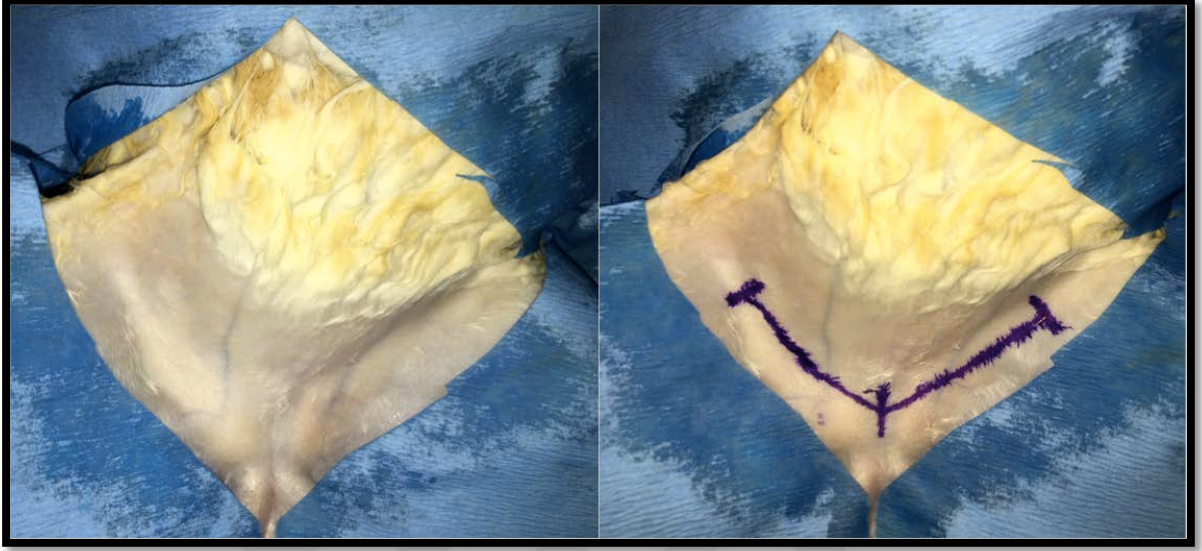
3.2 Cerrahi Yöntem (İnguinal Diseksiyon ile Adipoz Doku Elde Edilmesi)

Anestezi ve tüylerin tıraşı sonrasında inguinal bölge Povidoneks (%10, 1000 ml povidon iyodin poli iyot kompleksi Kimpa İlaç Lab. ve Tic. Ltd. Şti.) solüsyonla temizlendi. Kasık bölgesinde yaklaşık 5 cm'lik transvers insizyon yapıldı. Diseksiyonla 20-25 mililitre (ml) yağ dokusu steril koşullarda alınarak kesi hattı 4/0 poliglaktin 910 sütür materyali ile sütüre edildi.

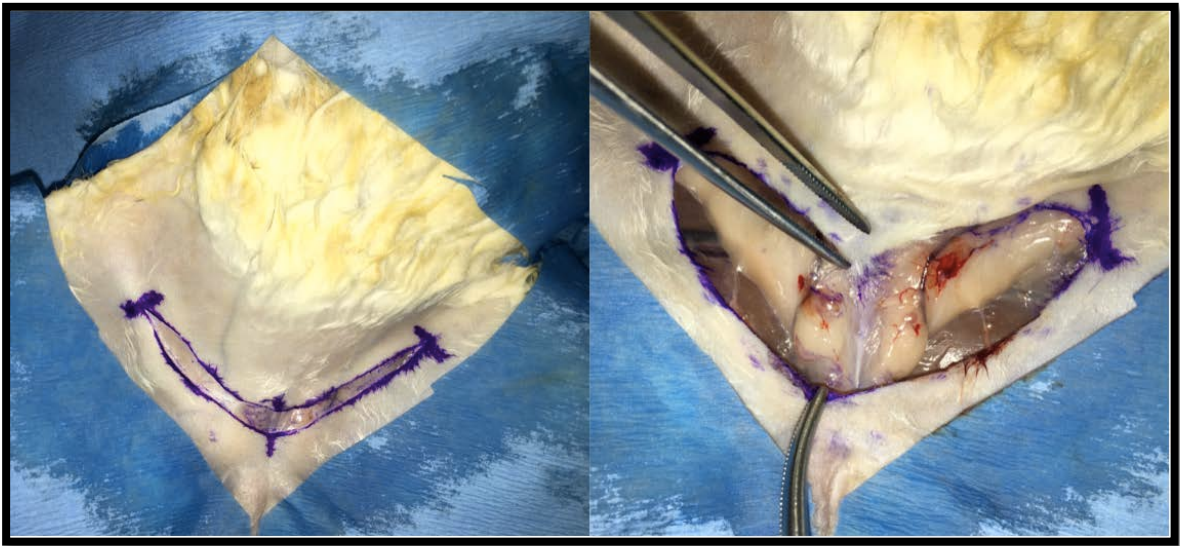
(Şekil 19-22) Elde edilen yağ dokusu, doku makasıyla küçük parçalara ayrılarak stromal vasküler fraksiyon elde etmek için steril kaplara alındı.



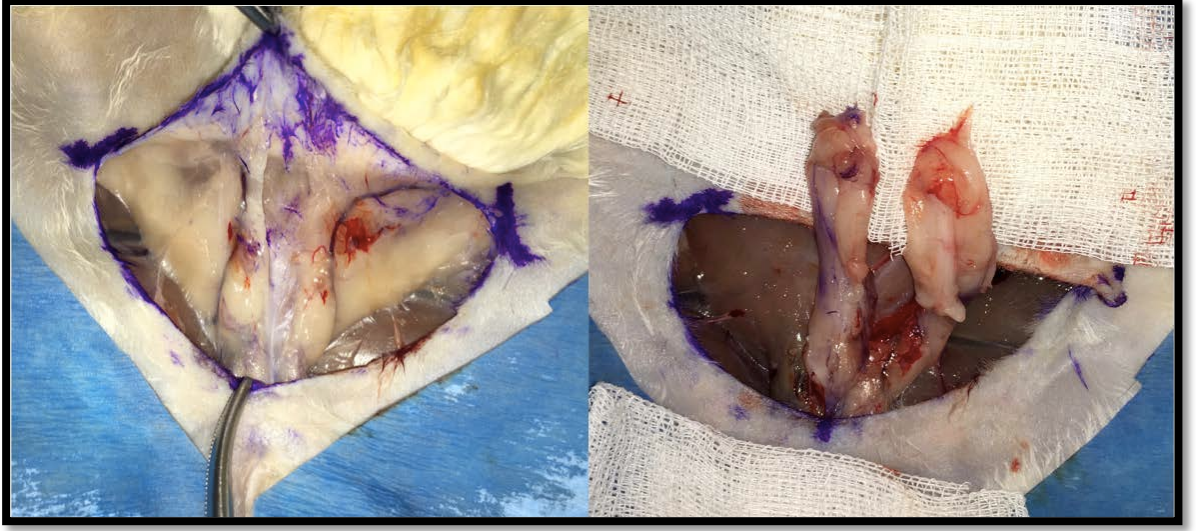
Şekil 18: Deneysel grupların dizaynı ve zamana göre grupların değişimi



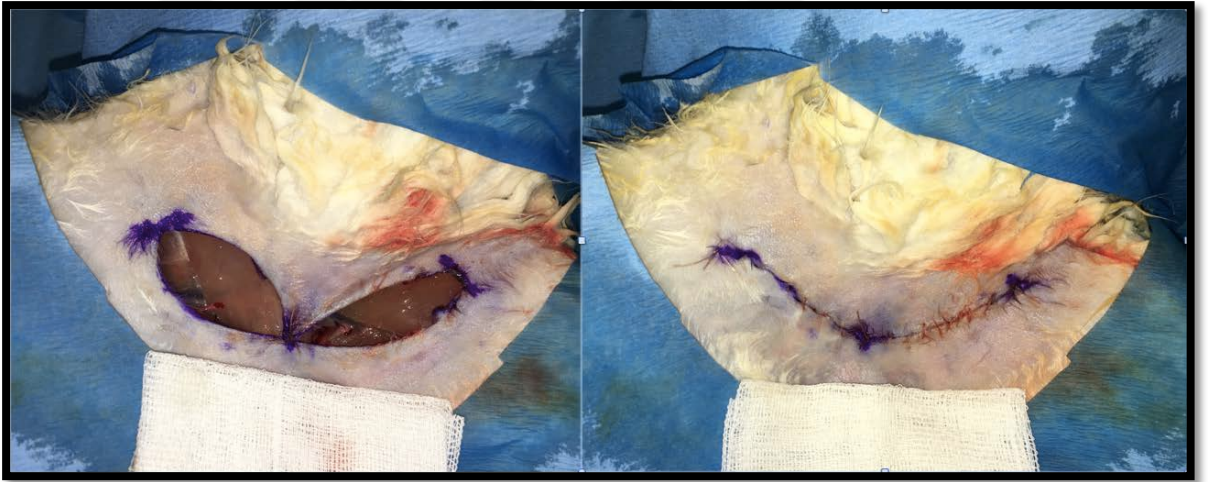
Şekil 19: İnguinal bölgenin tıraşlanması sonrasında preoperatif görünümü (sol) İnsizyon yapılacak olan bölgenin işaretlenmesi (sağ)



Şekil 20: Deri insizyonu sonrasındaki görünüm (sol) ve inguinal bölgeyi örten deri fleplerinin eleve edilmesi (sağ)



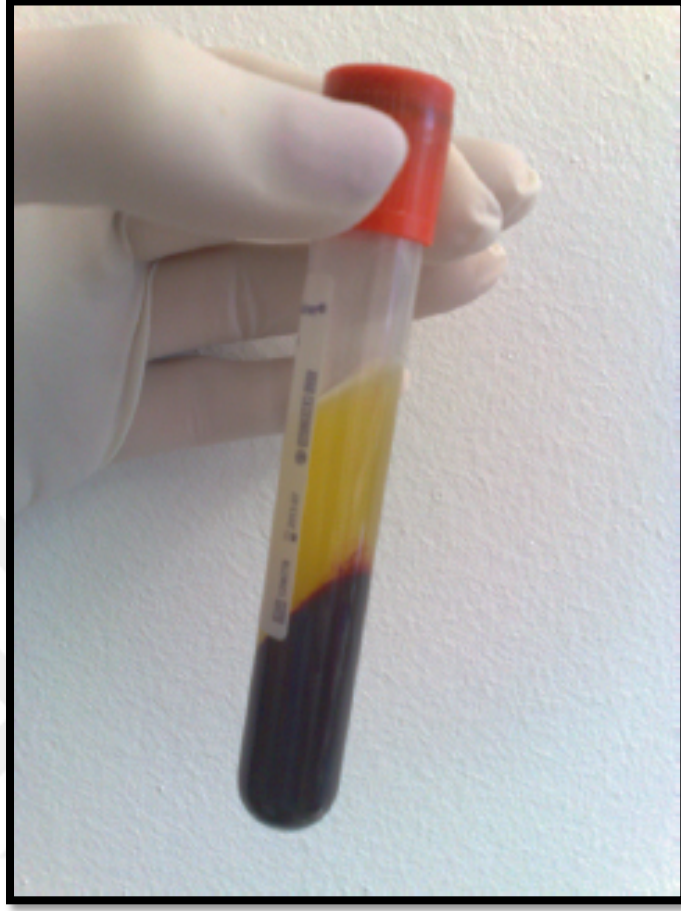
Şekil 21: İnguinal yağ yastıkçıklarının yerleşimi (sol) ve yastıkçıkların diseksiyonu sonrasındaki görünüm (sağ)



Şekil 22: Yağ doku elde edildikten sonra insizyon hattının kapatılması

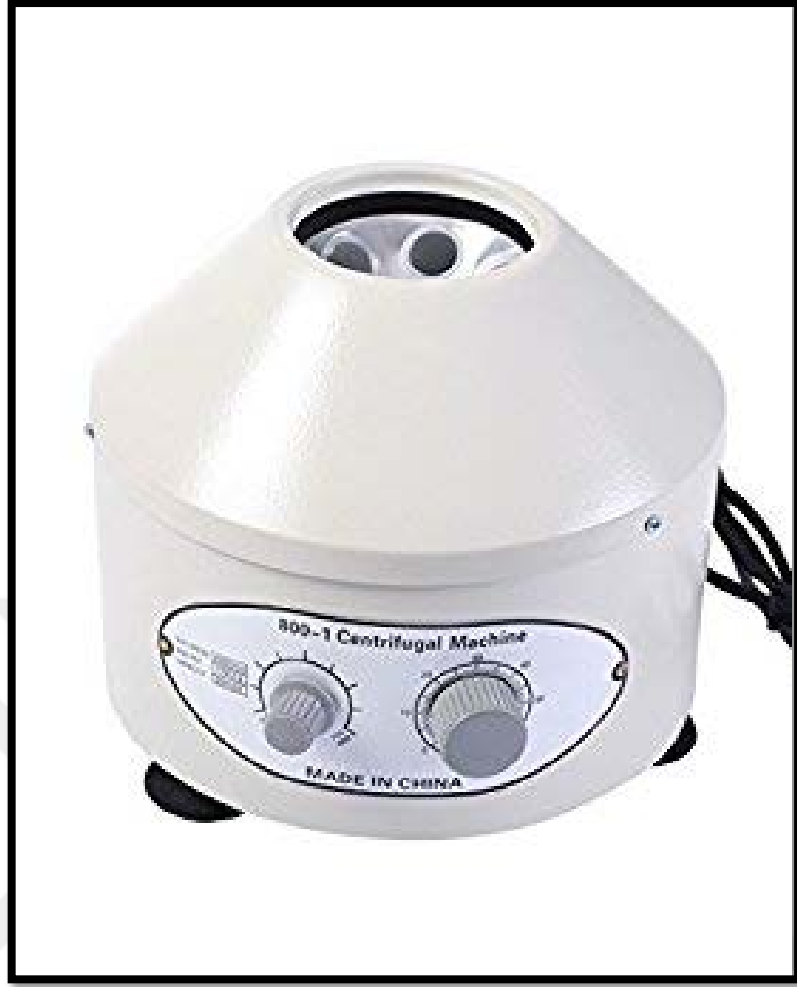
3.3 Plateletten Zengin Fibrin Elde Edilmesi

Yöntemi bulan Choukroun tarafından 9 ml tam kanın antikoagülan içermeyen plastik tüpte toplanarak 700 devir/daikikada 3 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilmiştir. Santrifüj sonrasında yüzeye yakın turuncu renkli olarak ayrışan ve PRF olarak adlandırılan katman tam kandan ayrıştırılmıştır. Merkezden daha uzağa giden ve tüpün tabanına yönelen koyu renkli kısımda ise kanın diğer şekilli elemanları bulunmaktadır ve bu katman kullanılmamıştır. (Şekil 23). 9 ml tam kandan yaklaşık olarak 4-5 ml'ye kadar PRF elde edilebilmektedir.(159)



Şekil 23: Tam kandan santrifüj ile elde edilmiş PRF. Üstteki turuncu-sarı renkli kısım elde edilen PRF'nin görünümü iken, altta kalan koyu renkli kısım kanın şekilli elemanlarını içermektedir.

Bu çalışmada deneklerden 5 ml tam kan alınarak orjinal yöntemine uygun olarak sabit 45 derece açılı rotoru olan santrifüj cihazında (S&H Labware 800D) santrifüj edilmiştir ve 2 ml PRF elde edilmiştir. (Şekil 24) Tam kanın damardan alınması ardından PRF'nin elde edilmesi ve dokuya enjeksiyonuna kadar geçen süre 10 dakikanın altında tutularak enjekte edilebilir form korunmuştur.



Şekil 24: Santrifüj cihazı

3.4 Yağ grefti ve Stromal Vasküler Fraksiyon Elde Edilmesi

SVF elde etme yöntemi olarak enzimatik yöntemler yerine karıştırma ve santirfüj fonksiyonlarını içeren mekanik yöntem tercih edilmiştir.

İnguinal diseksiyon ile elde edilen yağ dokusu bistüri ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra hazırlanmış olan özel santrifüj mekanizmasından geçirilerek mekanik olarak SVF hücreleri toplandı. SVF izolasyonu sırasında yağ greftine sadece mekanik müdahale yapılmış olup enzimatik ya da kimyasal müdahale yapılmamıştır.

Kullanılan mekanizmada, ilk aşamada 20-25 ml lipoaspirat 50 ml hacminde konik uçlu enjektöre aktarıldı. Enjektör içine elektrikli motordan tahrikli, rotasyon hareketi aracılığı ile merkezkaç hareketi sağlayan ve karıştırıcı özelliği olan metal koni yerleştirildi. Gözenekli metalden yapılmış olan koninin rotasyonel hareketi sayesinde lipoaspiratın sürekli karıştırılması sağlandı. Aynı zamanda oluşan merkezkaç kuvveti sayesinde santralde yüksek basınçlı bir alan oluşturularak serbest yağ ve olgun adipositlere göre daha yoğun olan hücresel

içeriğin konik uca bağlı hazneye yönlendirilmesi sağlandı. (Şekil 25) Sistem yaklaşık olarak 15-20 dakika boyunca çalıştırılarak haznede biriken çökelti alındı.

Bahsedilen sistem ile elde edilen SVF içeriği deney aşamasından önce test edildi. Sistemin test edilmesi aşamasında Dokuz Eylül Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği tarafından yapılan rutin cerrahi işlemlerden elde edilen ve tıbbi atık olarak yok edilmesi planlanan lipoaspirasyon materyalleri kullanıldı. Lipoaspiratlar yukarıda anlatıldığı şekilde işleminden geçirildi.

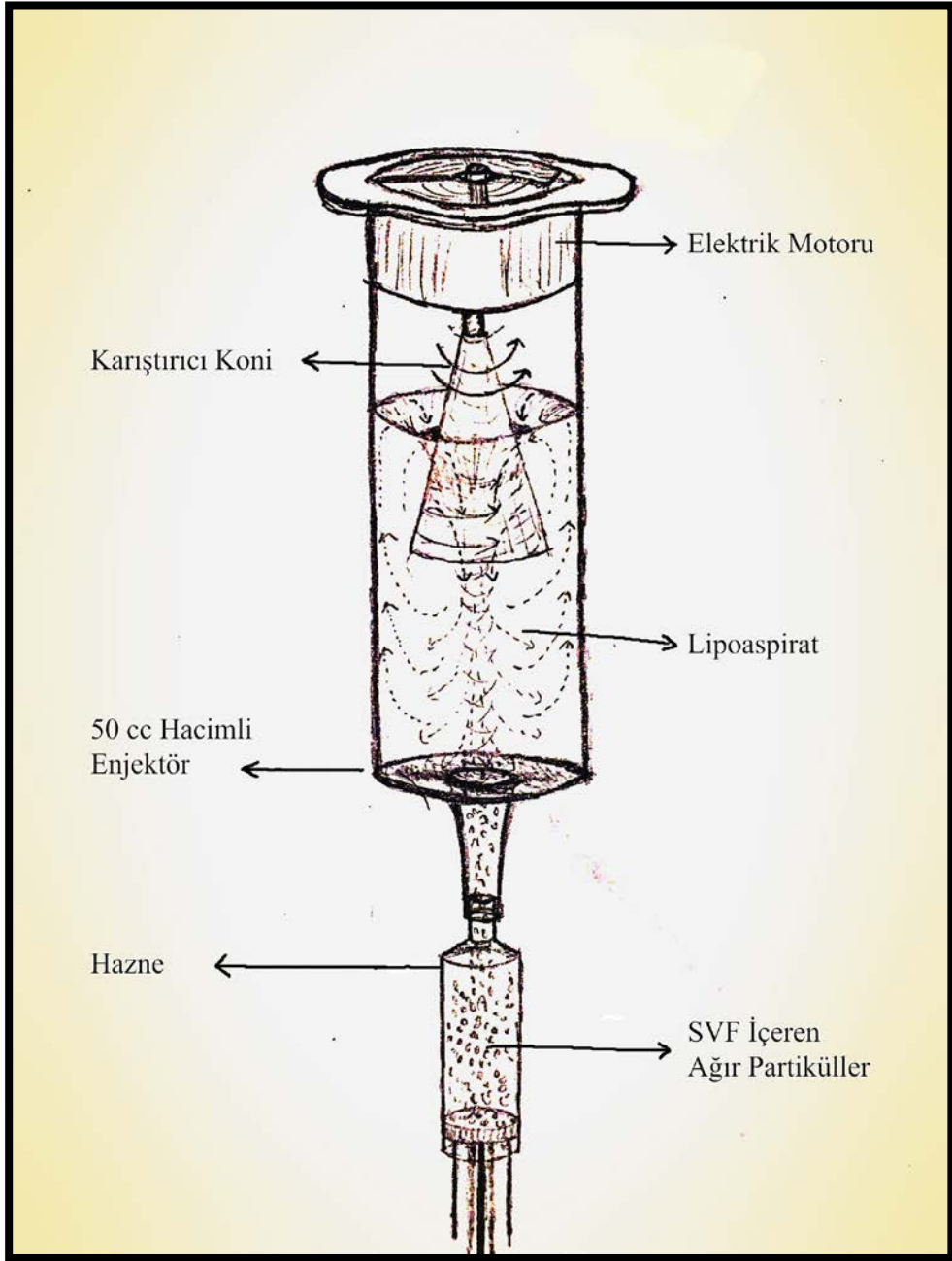
Elde edilen SVF öncelikle lam üzerine yayılarak hematoksil-eozin ile boyandı. Işık mikroskopunda incelendi. Hücrelerin olağan morfolojisinin korunduğu, fibrin ve ekstraselüler matriksten kaynaklanan debris üzerinde yoğun hücresel kümeler oluşturduğu gözlemlendi. (Şekil 26)

Işık mikroskopunda hücresel bütünlük konfirme edildikten sonra elde edilen stromal vasküler fraksiyondaki hücre profili değerlendirildi. Bu amaçla akım sitometrik inceleme yapıldı. Akım sitometrik inceleme yapılırken hematojenik kök hücreler dışlanarak bu hücre grubu dışındaki hücre popülasyonu incelendi. Bu aşamada hematojenik yüzey molekülü olan CD45 antijenine ait antikor tutulumundan faydalanıldı.

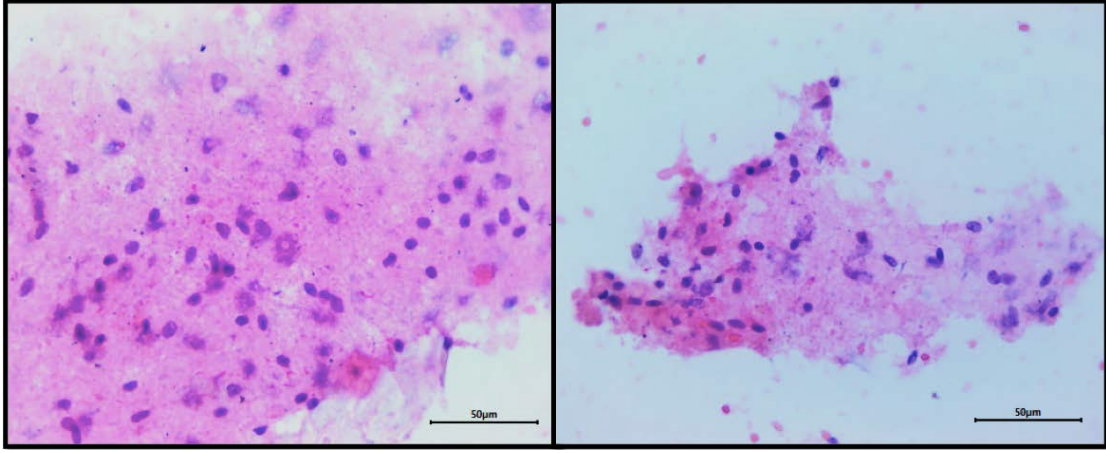
Elde edilen çökeltinin akım sitometrik incelemelerinde başlangıçta hematojenik yüzey molekülü olan CD45 (Anti human CD45-V500 BD-655873 Becton Dickinson) ile işaretleme yapıldı. CD45 antikor tutulumunun olmadığı hücre grubu belirlenerek bu hücre popülasyonu incelendi.

CD45 (-) hücre grubu belirlendikten sonra mezenkimal kök hücre yüzey molekülleri olan CD34 (Anti human CD34-PE-Cy7 BD-348811 Beckton Dickinson) ve CD90 (Anti human CD90-FITC BD Pharmingen-561969) yanında vasküler hücre yüzey molekülü olan CD31(Anti human CD31-APC-Cy7 BD Pharmingen-563653) antikorları ile işaretlendi. Akım sitometrik incelemede %9 (tüm hücreler içinde %10,7) oranında mezenkimal kaynaklı kök hücre yani CD45 (-), CD34 (+) ve CD90 (+) hücreler saptandı. Endotelial progenitör hücre yoğunluğu (CD45 negatif, CD34 ve CD31 pozitif) CD45(-) hücre grubunda %1,6 (tüm hücreler içinde %1,9) olarak saptandı. (Şekil 27,28)

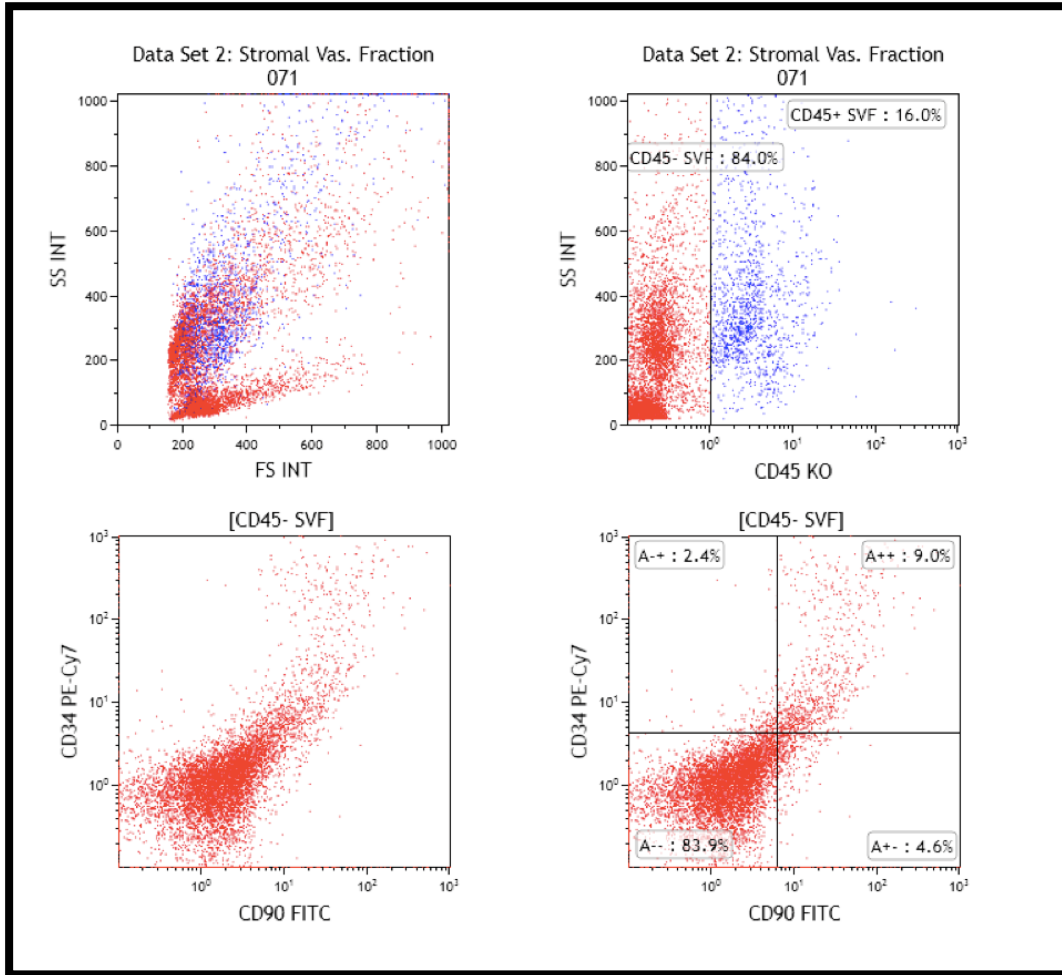
Kültüre edilmiş kök hücrelerin yüzey molekülü profillerinin pasaj sayısı arttıkça değişmesi ve kültüre edilmemiş kök hücrelerden farklı yüzey molekülü ekspresyonu yapması bu çalışmada dikkate alındı. Akım sitometrik analiz sırasında kültüre edilmemiş hücrelerin incelenmesi nedeniyle mezenkimal kaynaklı kök hücre fenotipi CD34⁺, CD90⁺, CD31⁻, CD45⁻ olarak değerlendirildi. Vasküler progenitör hücre fenotipi CD34⁺, CD90⁺, CD31⁺, CD45⁻ olarak değerlendirildi. (200)



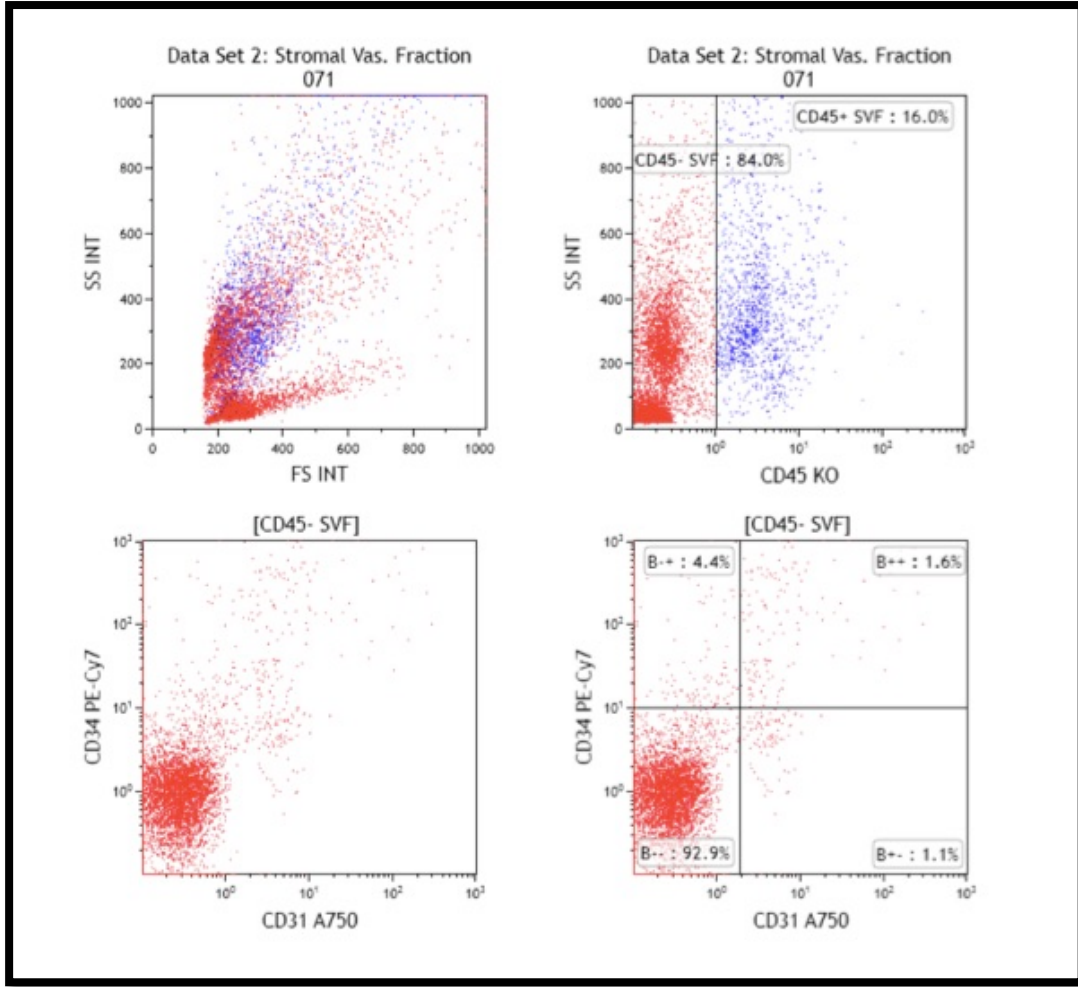
Şekil 25: Kullanılan santrifüj temelli karıştırıcı mekanizmanın şematik görünümü



Şekil 26: Elde edilen SVF'nin hematoksilen-eozin boyama görüntüleri



Şekil 27: Akım sitometrisi analizlerine ait grafikler. Sol üst grafik: Tüm hücrelerin dağılımı. Sağ üst grafik: CD45 (-) ve CD45 (+) hücrelerin ayrımı. Kırmızı renk CD45 (-) hücreler (%84) ve mavi renk CD45 (+) hücreler (%16). Sol alt grafik: Tüm CD45 (-) hücrelerin CD34 ve CD90 ile boyanma grafiği. Sağ alt grafik: Tüm CD45 (-) hücrelerin CD34 ve CD90 ile boyanma grafiği. Bu grafikte sağ üst kadrant CD45 (-) hücre grubu içerisindeki CD34 ve CD90 (+) olan hücreleri (mezenkimal kök hücreleri) temsil ediyor (%9)



Şekil 28: Akım sitometrisi analizlerine ait grafikler. Sol üst grafik: Tüm hücrelerin dağılımı. Sağ üst grafik: CD45 (-) ve CD45 (+) hücrelerin ayrımı. Kırmızı renk CD45 (-) hücreler (%84) ve mavi renk CD45 (+) hücreler (%16). Sol alt grafik: Tüm CD45 (-) hücrelerin CD34 ve CD31 ile boyanma grafiği. Sağ alt grafik: Tüm CD45 (-) hücrelerin CD34 ve CD31 ile boyanma grafiği. Bu grafikte sol üst kadranda CD45 (-) hücre grubu içerisindeki CD34 ve CD31 (+) olan hücreleri (vasküler progenitör hücreler) temsil ediyor (%1,6).

3.5 Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Doku Örneklerinin Alınması

Birinci hafta; birinci, ikinci ve üçüncü aylar tamamlandığında yüksek doz eter anestezisi ile denekler sakrifiye edildi. Sakrifikasyon ardından, her bir kulakta daha önce anatomik olarak belirlenen ve renkli kalemle çevresi işaretlenen enjeksiyon alanlarının santralinden tam kalınlıkta doku örnekleri bistüri yardımıyla eksize edildi.

3.6 Histolojik Değerlendirme

Birinci hafta, birinci ay, ikinci ay ve üçüncü ay tamamlandığında sakrifiye edilerek alınan doku örnekleri % 10'luk formalin (4% NB Formaldehide Novagen Diagnostik

Laboratuvar ve Sağlık Hizmetleri San. Ve Tic. Ltd. Şti.) solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin bloklar şeklinde hazırlandı. Doku örnekleri ışık mikroskopunda incelenmek üzere hematoksilen-eozin, masson-trikrom, anti-VEGF, Ki-67 ile boyandı.

3.6.1 Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom boyama incelemesi

Doku morfolojisini incelemek amacıyla rutin protokol uygulandı ve 5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin ve Masson-Trikrom ile boyandı.

Tablo 10: Hematoksilen-eozin boyama protokolü

İşlem	Ortam	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüv	Bir gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100 alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

Hematoksilen-eozin boyama için alınan kesitler deparafinizasyon amacıyla 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından birincisi 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Rehidratasyon işlemi için 5 değişik azalan alkol serisinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70,%80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 10)

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilolde tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile suda çalkalandıktan sonra Masson Trichrome boyama seti (5022, GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 5 damla Weigert demirli hematoksilin A solüsyonu ile 5 damla Weigert demirli hematoksilin B solüsyonu damlatılarak nükleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletildi. Yıkama işlemi yapılmadan preparatlar 5 dakika kurutulduktan sonra Pikrik asit alkolik çözeltisi C solüsyondan 10 damla damlatılarak 4 dakika bekletildi ve eritrositlerin boyanması sağlandı. Distile su ile hemen (3-4 saniye) yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 10 damla Gelincik kıızı fuksin çözeltisi D solüsyonu 4 dakika bekletilerek hücre sitoplazmalarının boyanması sağlandı. Sonra preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra Fosfomolibdik asit çözeltisi E solüsyonundan 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan preparatlar 5 dakika kurutuldu. Masson anilin mavisi çözeltisi F solüsyonundan 10 damla damlatıp 5 dakika bekletilerek bağ dokusunun boyanması sağlandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilol ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 11)

Bu histopatolojik incelemelerde dermal kalınlık, kollajen yoğunluğu ve dizilimi, hücresel proliferasyon incelendi. Dermal kalınlık dermoepidermal bileşkeden aynı taraf perikondrium tabakasına kadar yapılan ölçümler ile milimetrik olarak değerlendirildi. Her örnekte üç farklı alandan ölçüm yapıldı.

Tablo 11: Masson-trikrom boyama protokolü

İşlem	Ortam	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	A + B solüsyonu	10 dakika
Boyama	C solüsyonu	Çalkalama
Yıkama	Distile su	4 dakika
Boyama	D solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	E solüsyonu	10 dakika
Boyama	F solüsyonu	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100 alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2 İmmünohistokimyasal inceleme

Kesitlerin immünohistokimyasal incelemesinde vasküler yoğunluk değerlendirildi. Vasküler yapıların yoğunluğu değerlendirilirken anti-VEGF antikorlar kullanıldı. Her 100'lük

büyütme alanındaki immünopozitif boyanma gösteren yapılar sayıldı. Rasgele beş alanda sayımlar yapıldı.

Tablo 12: İmmünohistokimyasal boyama protokolü

İşlem	Ortam	Süre
Deparafinizasyon	Ksilen	5
Deparafinizasyon	Ksilen	5
Rehidratasyon	%100'lük alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%95'lik alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%70'lik alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%50'lik alkol	3 dakika
Peroksidaz Blokajı	%3 Hidrojenperoksit + Metanol	10 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Boyama	Sitrat-95°	10 dakika
Soğutma	Oda sıcaklığı	20 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Protein Blokajı	Fetal bovin serum	1 saat
Boyama	Primer Antikor	1 gece
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Boyama	Sekonder Antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	Peroksidaz Substrat Solüsyonu	5 dakika
Yıkama	PBS	2 dakika
Yıkama	PBS	2 dakika
Yıkama	PBS	2 dakika
Yıkama	Akan su	10 dakika
Dehidratasyon	%95'lük alkol	5 dakika
Dehidratasyon	%95'lük alkol	5 dakika
Dehidratasyon	%100'lük alkol	5 dakika
Dehidratasyon	%100'lük alkol	5 dakika
Kapama		

Hücresel proliferasyon değerlendirilirken hematoxilen-eosin boyamada görülen fokal proliferasyon alanları Ki-67 immünohistokimyasal boyama ile konfirme edildi.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

Histolojik değerlendirmede dermal kalınlık, mikrovasküler yoğunluk değerlendirildi. Elde edilen veriler arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı SPSS 22.0 programında değerlendirildi. Dört çalışma grubunun zamana bağlı olarak kendi içinde ve farklı zaman dilimlerinde farklı grupların birbiriyle karşılaştırılması amacıyla veriler ikili gruplar halinde Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

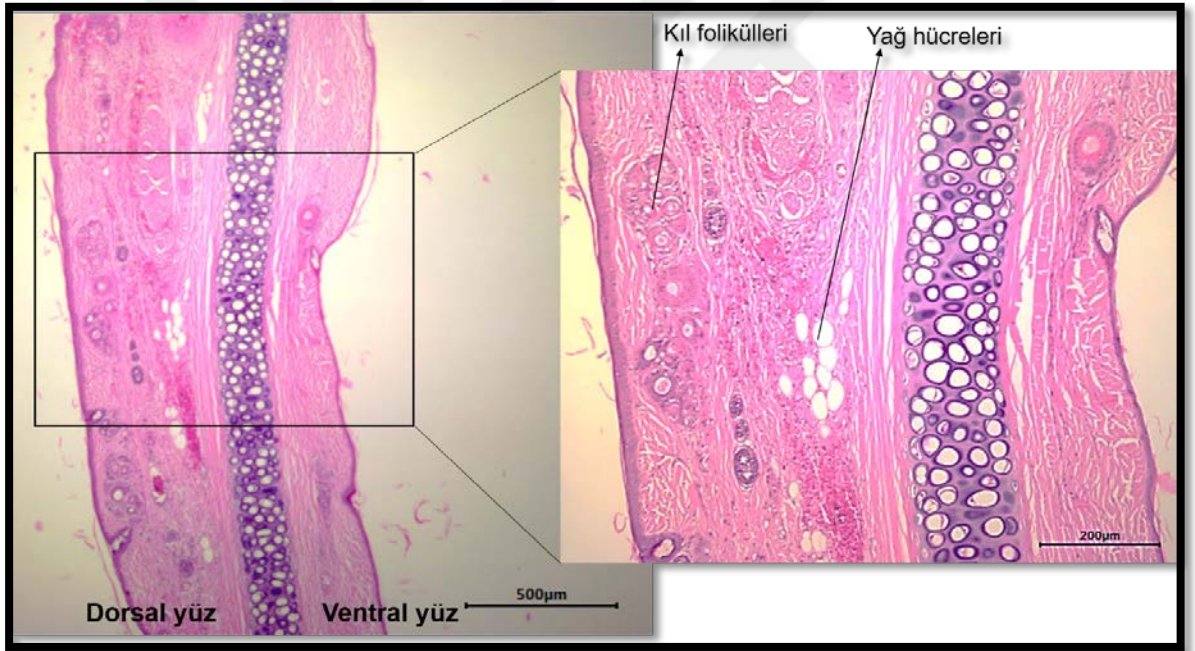


4. BULGULAR

4.1 Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom Boyama Bulguları

Tavşan kulaklarında daha önce anatomik olarak belirlenen enjeksiyon alanlarından tam kalınlıkta doku örnekleri alındı. Rutin hematoksilen-eozin ve masson trikrom üçlü boyaları ile boyanan kesitler ışık mikroskobunda histolojik olarak değerlendirildi. Hematoksilen-Eozin boyası dokunun genel mikro yapısını incelememizi sağlarken, Masson-Trikrom histokimyasal boyası bağ dokunun miktar ve organizasyonunu özellikle kollajen lif açısından değerlendirmemizi sağlamıştır.

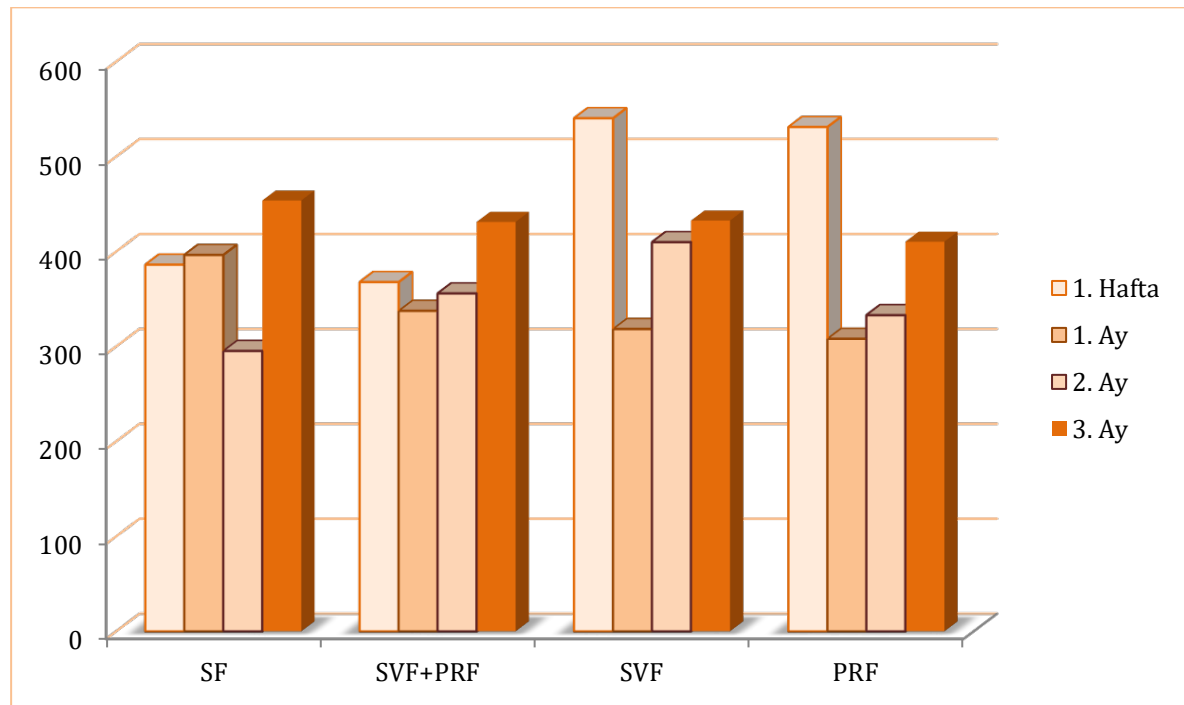
Hematoksilen-eozin boyama ile gruplar zamana bağlı olarak kendi içinde ve her zaman diliminde farklı gruplar birbiriyle karşılaştırıldı. Hücresel yoğunluk, dermal kalınlık, dermal ve subdermal inflamasyon değerlendirildi.



Şekil 29: Tavşan kulağının kesitine ait genel histolojik görünüm

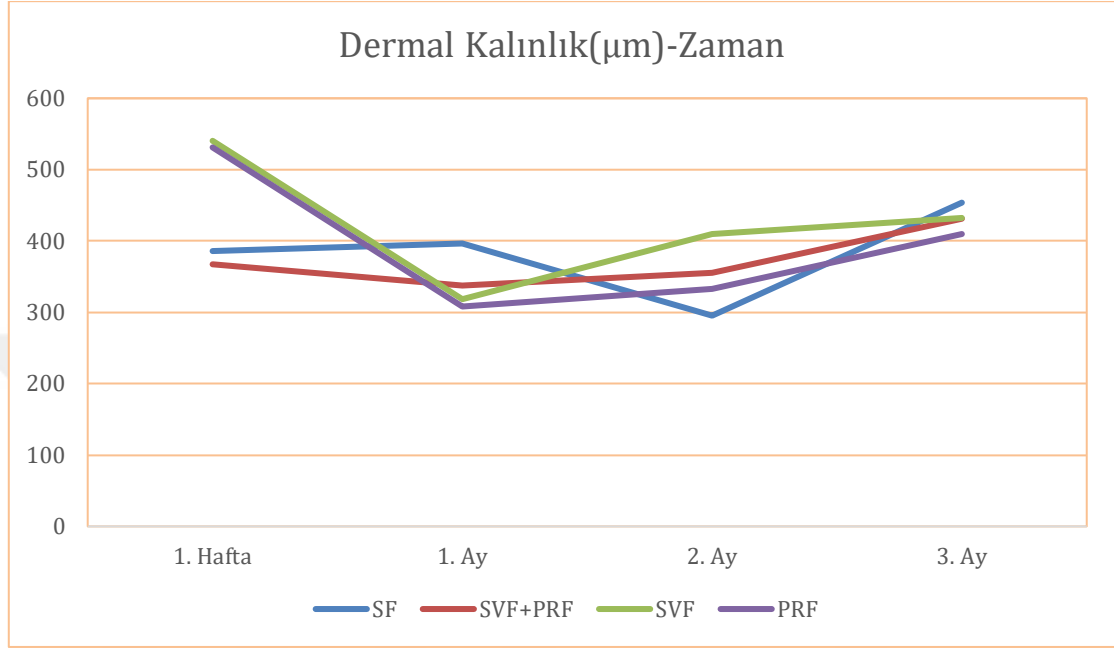
Tablo 13: Dermal kalınlık değerleri

Grup		Dermal Kalınlık (µm)			
		1. Hafta	1. Ay	2. Ay	3. Ay
SF	Ortalama	386,16	396,45	295,37	453,77
	Std. Sapma	84,04	114,88	31,58	31,78
SVF-PRF	Ortalama	367,90	337,57	355,9	431,23
	Std. Sapma	67,63	47,53	45,15	217,48
SVF	Ortalama	540,43	318,45	409,92	432,63
	Std. Sapma	105,43	47,99	112,26	100,91
PRF	Ortalama	531,18	308,16	333,03	410,40
	Std. Sapma	128,42	59,55	86,49	51,46



Şekil 30: Dermal kalınlık değerleri grafiği

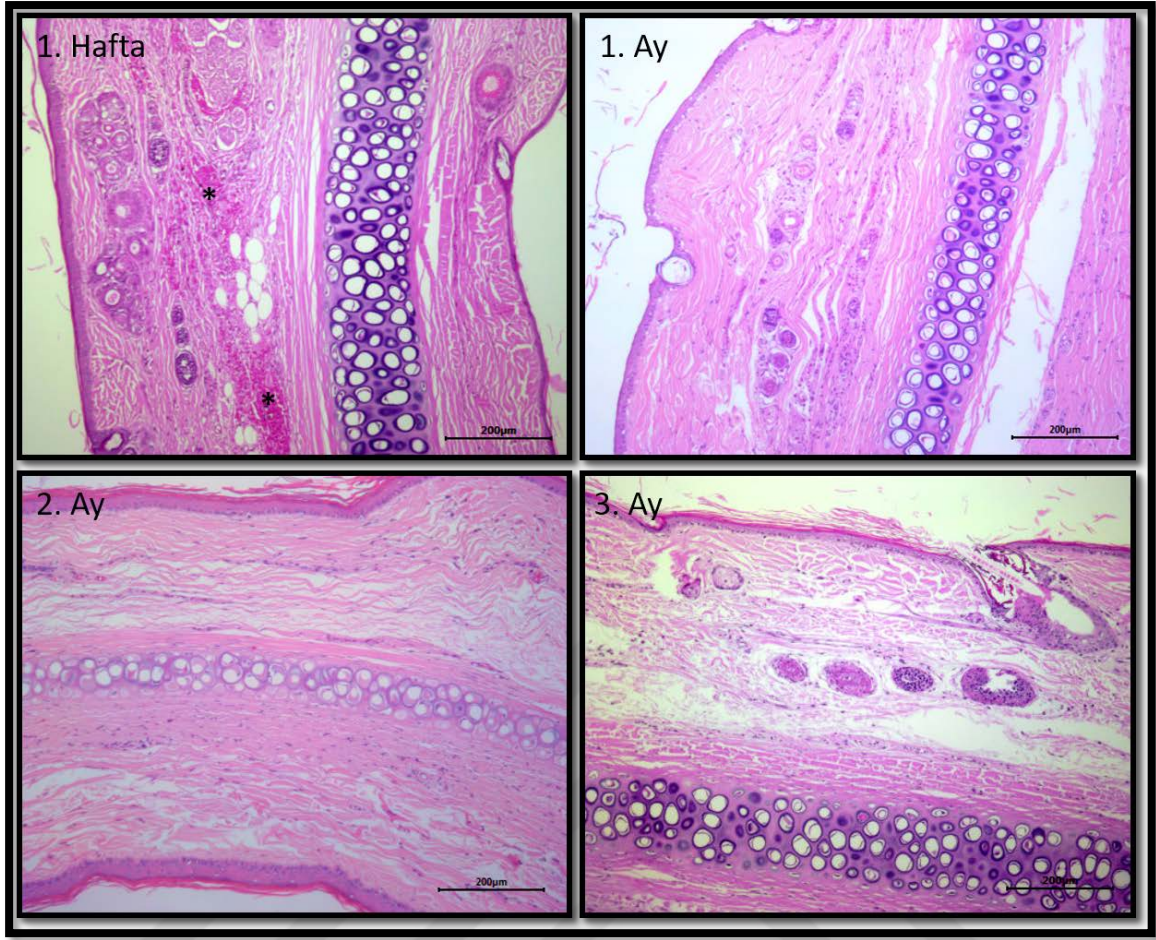
Yapılan dermal kalınlık ölçümlerinde; grup içinde zamana bağılı fark saptanmadı. Gruplar arasında aynı zaman dilimlerinde ya da farklı zaman dilimlerinde anlamlı fark saptanmadı. (Tablo 13), (Şekil 30-31)



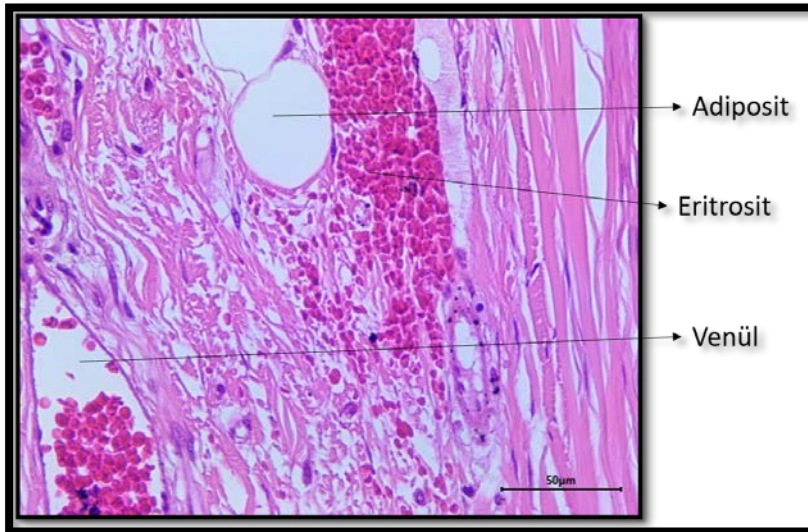
Şekil 31: Zamana göre dermal kalınlık değişimi grafiği

4.1.1 SF Grubuna ait bulgular

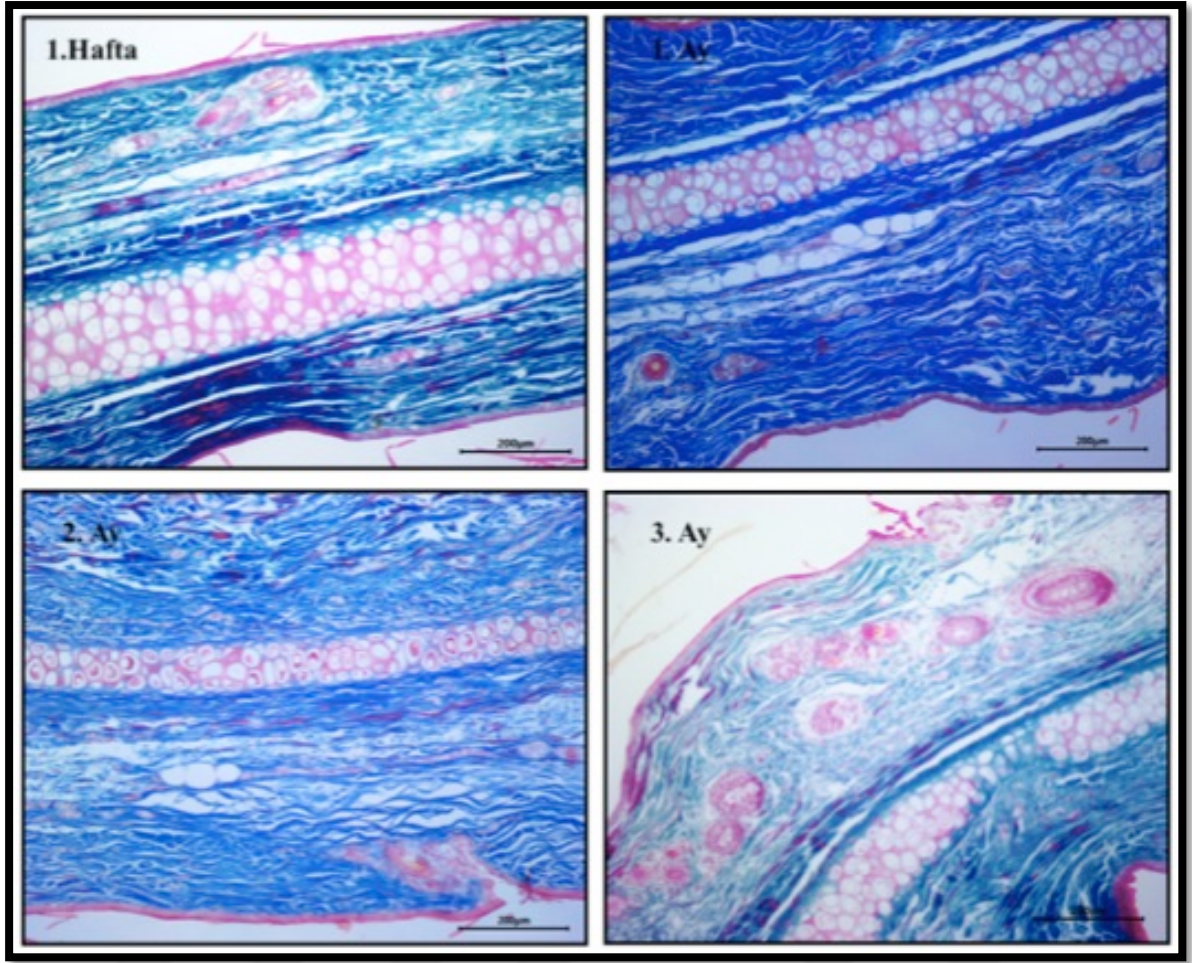
Hematoksilen-eozin boyamasında serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan gruplarda ilerleyen zaman dilimleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Birinci hafta grubunda enjeksiyon sırasındaki mekanik travmaya bağlı olduğu düşünülen subkutan hemorajik alanlar (*) ve venöz dolgunluk gözlemlendi. (Şekil 33) Birinci, ikinci ve üçüncü aya ait örneklerde anlamlı histolojik değişiklikler gözlenmedi. Hematoksilen-eozin ile bakısı yapılan örneklerde olağan kollajen dizilimi, sağlam kıkırdak yapısı ve sağlıklı hücresel yapı gözlemlendi. (Şekil 32) Masson-Trikrom boyamasının bu bulguları destekler nitelikte olduğu görüldü. (Şekil 34)



Şekil 32: Serum fizyolojik grubuna ait hematoksilen-eozin boyama görüntüleri. Hemorajik alanlar (*)



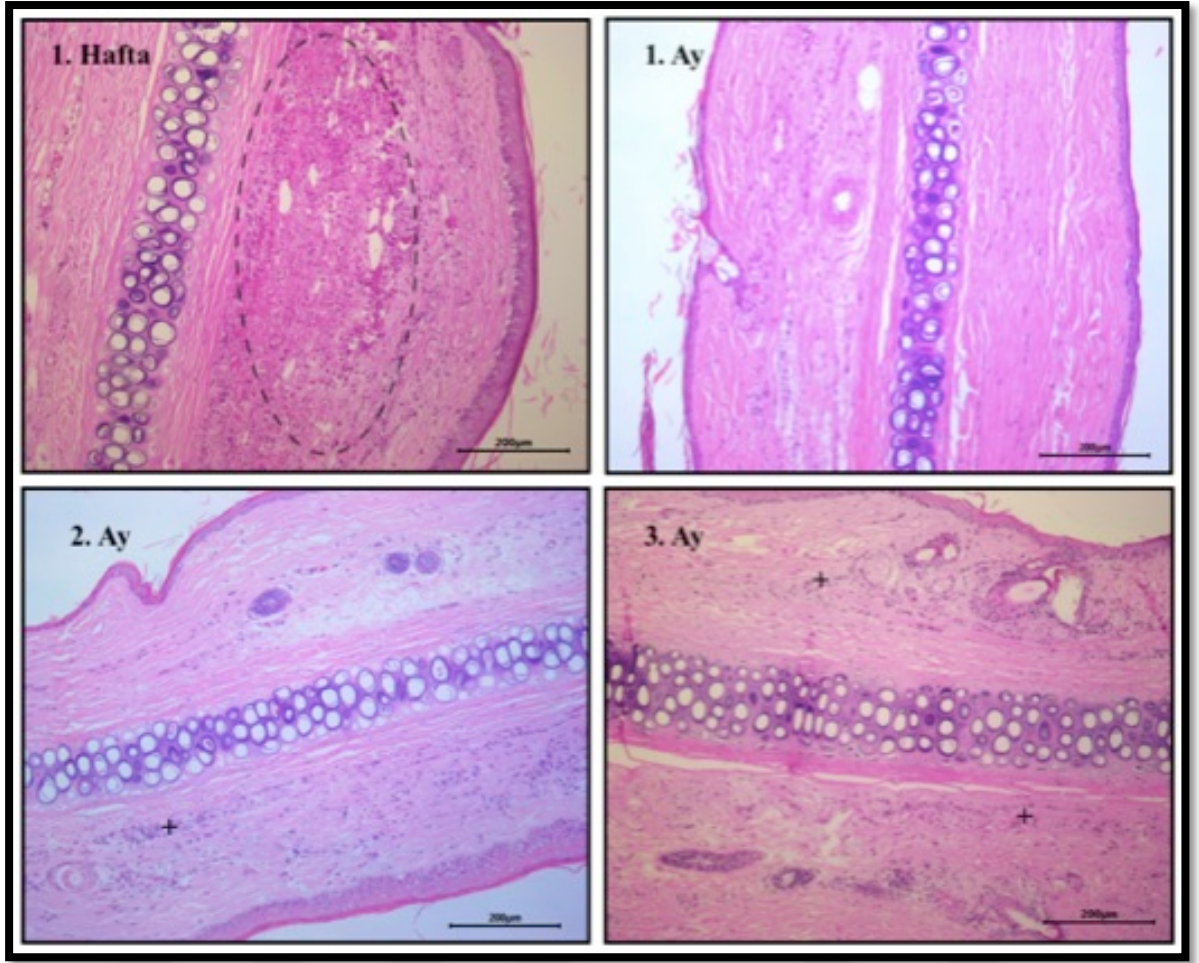
Şekil 33: Birinci haftada dermiste gözlenen hemorajik alan



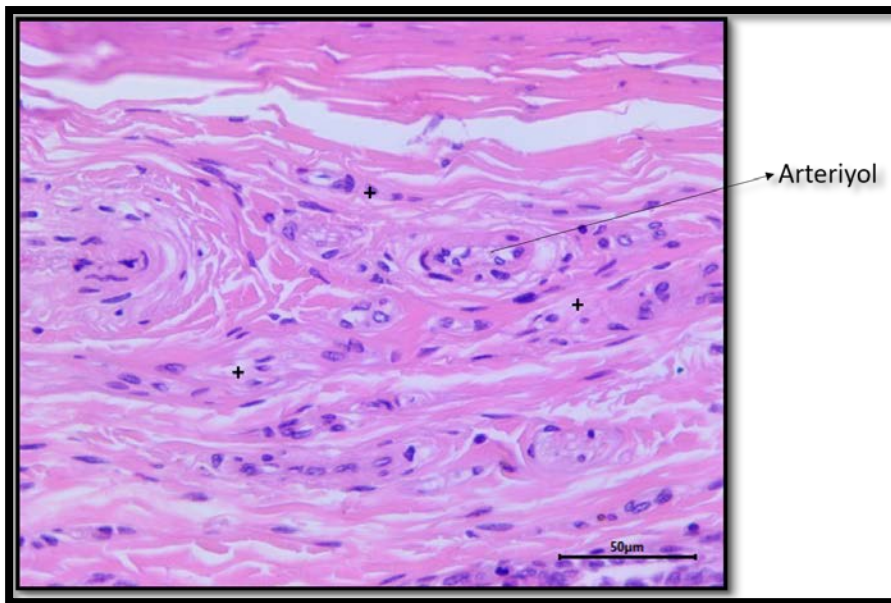
Şekil 34: Serum fizyolojik grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri

4.1.2 SVF + PRF Grubuna Ait Bulgular

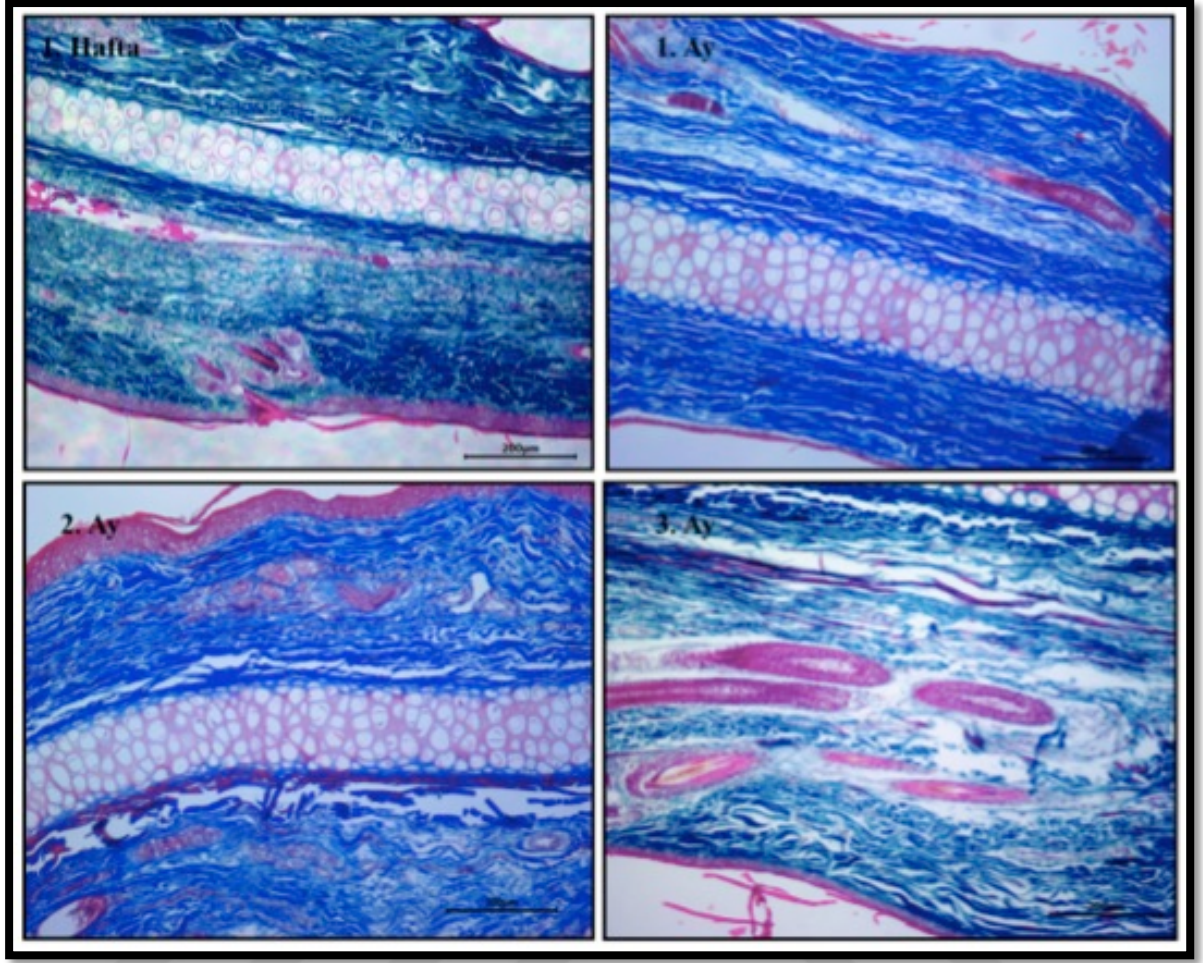
Birinci haftada SF ve PRF gruplarına göre daha yoğun mononükleer hücresel infiltrasyon (kesikli çizgilerle işaretli alan) ve ödem gözlemlendi. Devam eden aylarda ödemin gittikçe azaldığı ve dokuda fokal yoğun hiperselülerite alanlarının (+) ortaya çıktığı görüldü. (Şekil 35,37) Masson-trikrom boyamada dermisteki kollajen fibrillerin seyri olağan izlendi. (Şekil 36)



Şekil 35: SVF + PRF grubuna ait hematoxilen-eozin boyama görüntüleri. Kesikli çizgi ile işaretli alan mononükleer hücresel infiltrasyon alanı (+) ile işaretlenmiş alanlar fokal hiperselülerite izlenen alanlar.



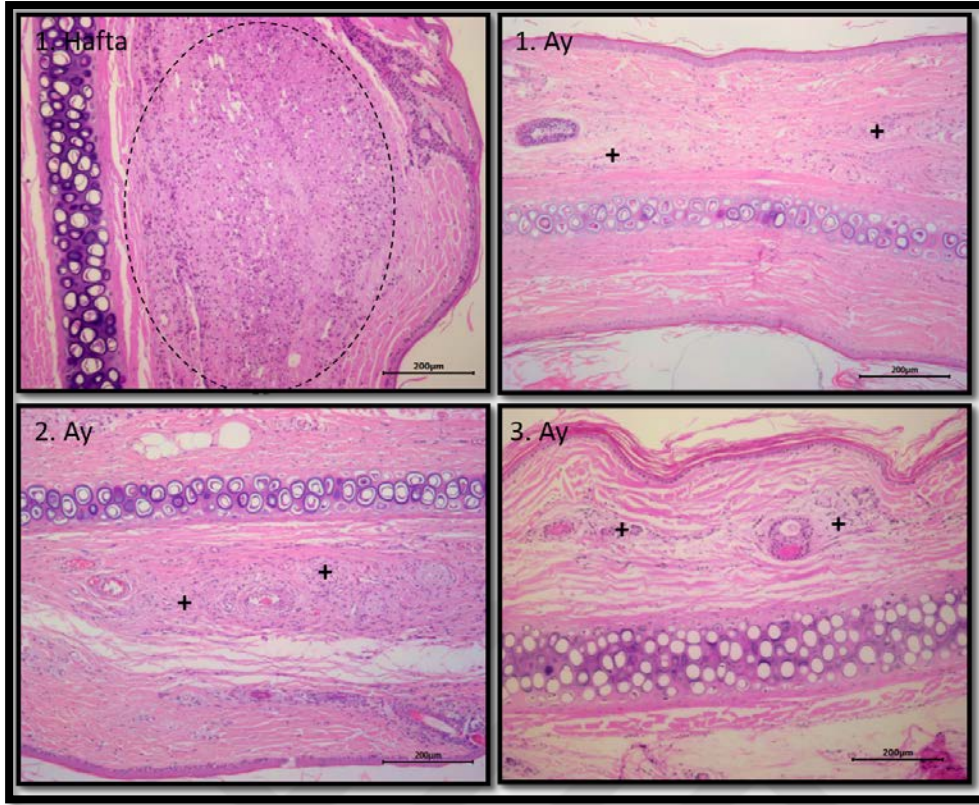
Şekil 36: Perivasküler hiperselüler alanlar



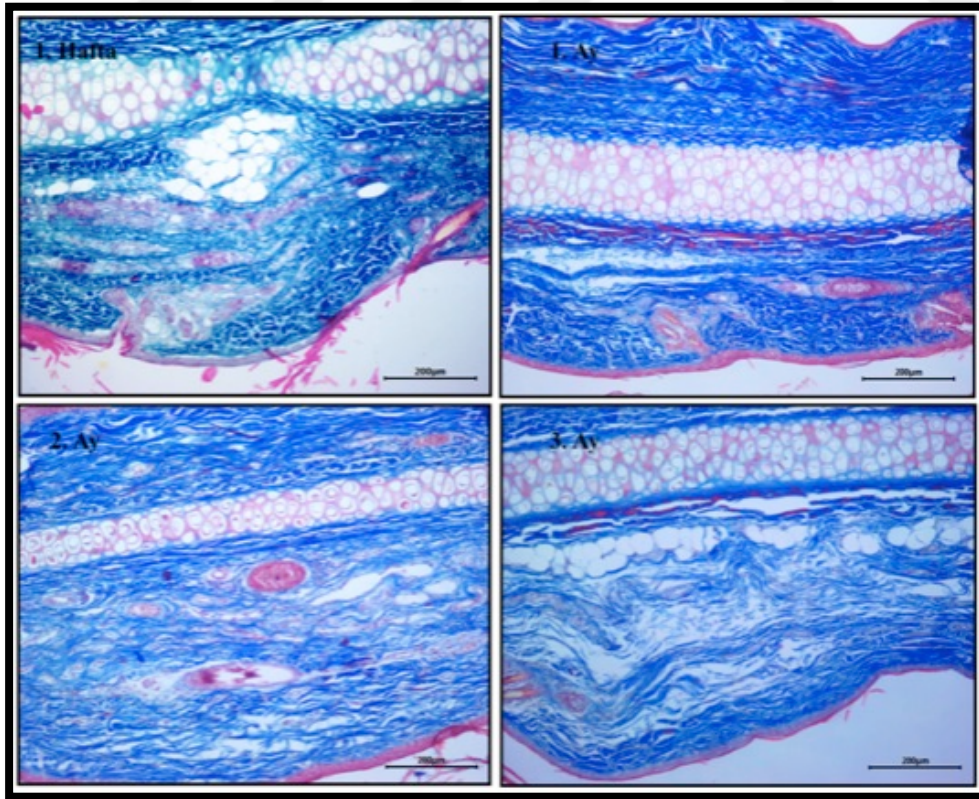
Şekil 37: SVF + PRF grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri

4.1.3 SVF Grubuna Ait Bulgular

Birinci hafta grubunda SVF + PRF grubuna benzer şekilde yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu (kesikli çizgilerle işaretli alan) ve ödem gözlenmektedir. İlerleyen zamanlarda ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonu gittikçe azalmakta ve SVF + PRF grubuna benzer şekilde dokuda fokal yoğun hiperselülerite alanları (+) gözlenmektedir. (Şekil 38) Masson-Trikrom boyamada dokudaki kollajen fibrillerin yoğunluğu SVF+PRF grubuna göre daha az olmakla birlikte fibrillerin düzenli olduğu gözlenmektedir. (Şekil 39)



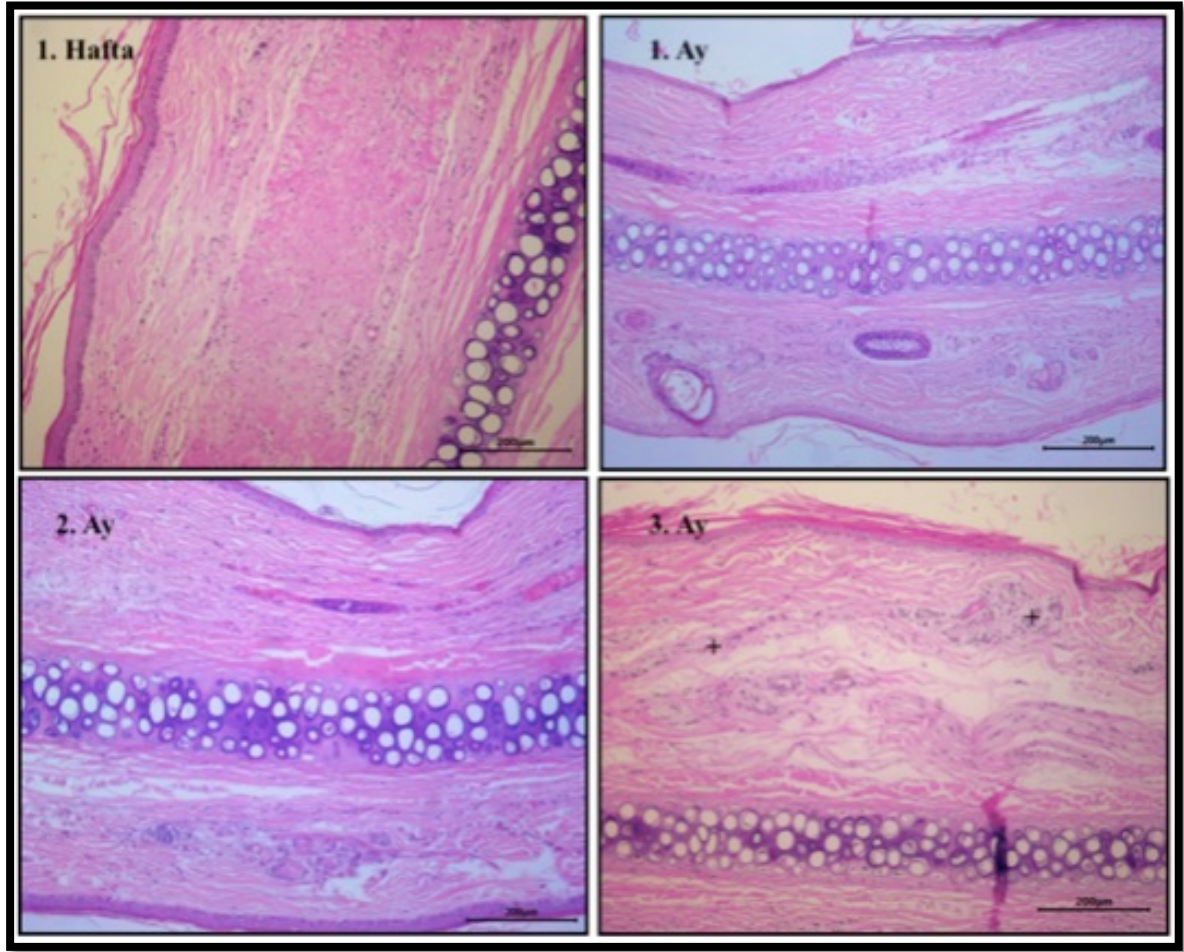
Şekil 38: SVF grubuna ait hematoksilin-eozin boyama görüntüleri. Kesikli çizgi mononuklear hücresel infiltrasyon alanı, (+) focal yoğun hiperselülerite göstermektedir



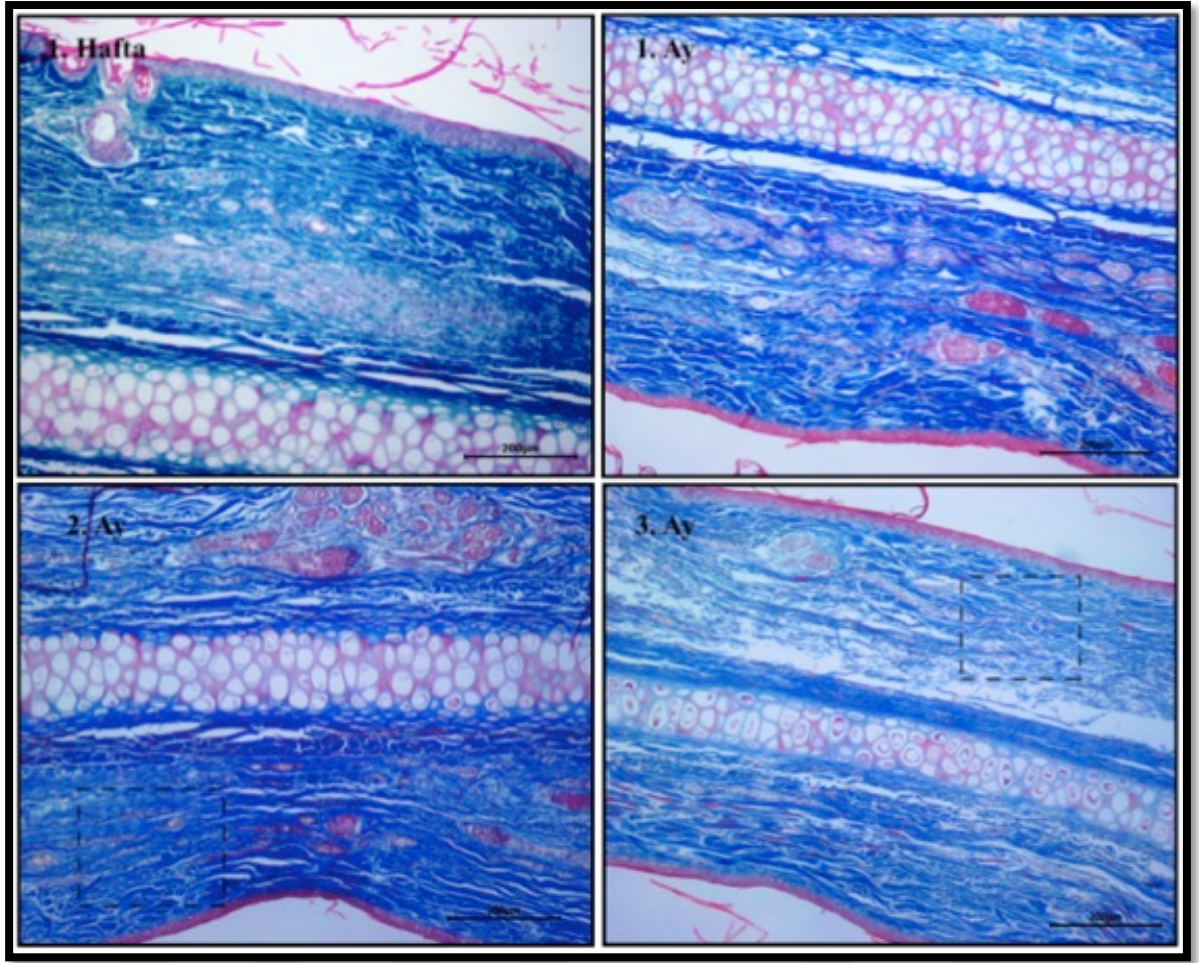
Şekil 39: SVF grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri

4.1.4 PRF Grubuna Ait Bulgular

Elde edilen hematoksilin-eozin boyama sonuçları ilk haftada SVF+PRF ve SVF grubuna göre daha az, SF grubuna göre daha belirgin mononükleer infiltrasyon bulguları göstermektedir. Fokal selülerite alanları bu grupta SVF+PRF ve SVF gruplarına göre daha az iken SF grubuna göre daha belirgin izlenmiştir. (Şekil 40) Masson-Trikrom boyamada kollajen fibrillerin yoğunluğunda ikinci ay grubuna göre üçüncü ayda azalma olduğu gözlenmiştir. (Şekil 41)



Şekil 40: PRF grubuna ait hematoksilin-eozin boyama görüntüleri. (+) ile işaretli bölgeler fokal hiperselülerite izlenen bölgeleri göstermektedir.



Şekil 41: PRF grubuna ait Masson-Trikrom boyama görüntüleri. Üçüncü ayda kollajen yoğunluğu ikinci aya göre daha az (Kesikli çizgilerle gösterilen alanlar).

4.2 İmmünohistokimyasal Değerlendirme Bulguları

Anti-VEGF ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirme ile birinci hafta ve üçüncü aylardaki vasküler yapıların yoğunluğu değerlendirildi. (Şekil 42)

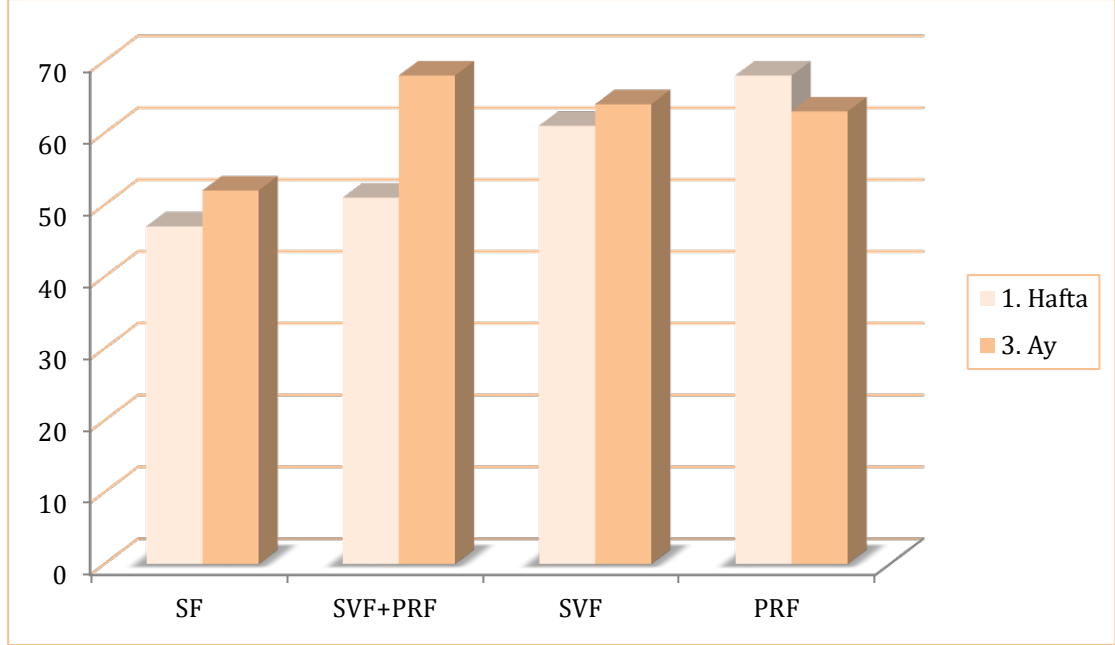
Mikrovasküler yoğunluk ve neovaskülarizasyon değerlendirmesinde SF grubunun (Şekil 43) diğer gruplara göre mikrovasküler yoğunluk açısından daha geride olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değilse de $p=0,05$ değerinin tam üstündeydi. Bunun yanında SVF-PRF (Şekil 44) , SVF (Şekil 45) ve PRF (Şekil 46) gruplarında grup içi ya da gruplar arasında mikrovasküler yoğunluk açısından fark gözlenmedi.

Serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan deneklerde birinci hafta ile üçüncü ay mikrovasküler yoğunlukları değerlendirildiğinde anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,077$).

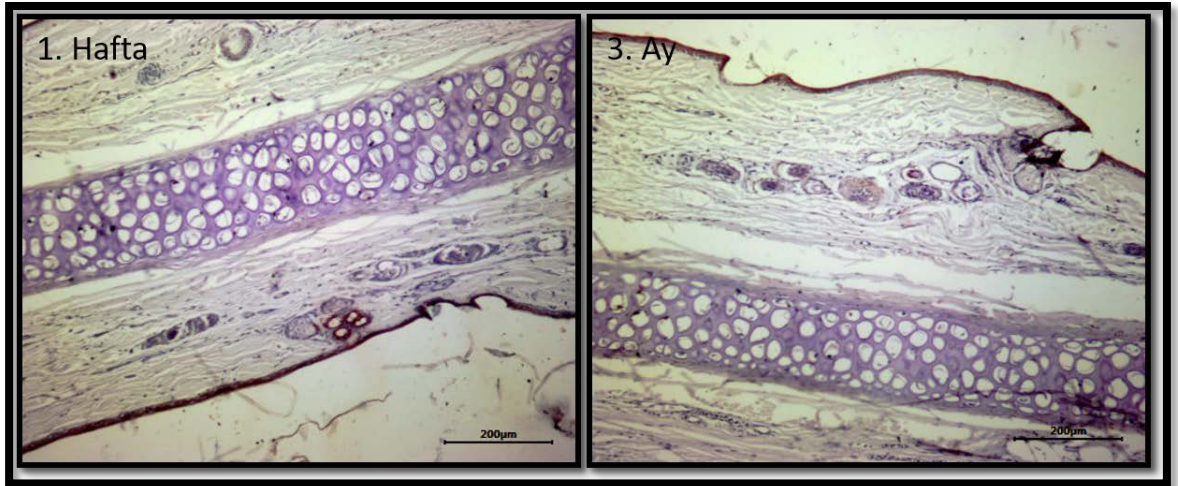
SVF-PRF ve SVF gruplarına ait üçüncü ay mikrovasküler yoğunluk değerlerinin SF grubunun birinci hafta ve üçüncü ay değerlerine göre daha fazla olduğu görüldü. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,05$).

Ayrıca SF grubuna ait birinci hafta mikrovasküler yoğunluğunun PRF grubuna ait hem birinci hafta hem de üçüncü ay değerlerine göre daha az olduğu görüldü ($p=0,05$).

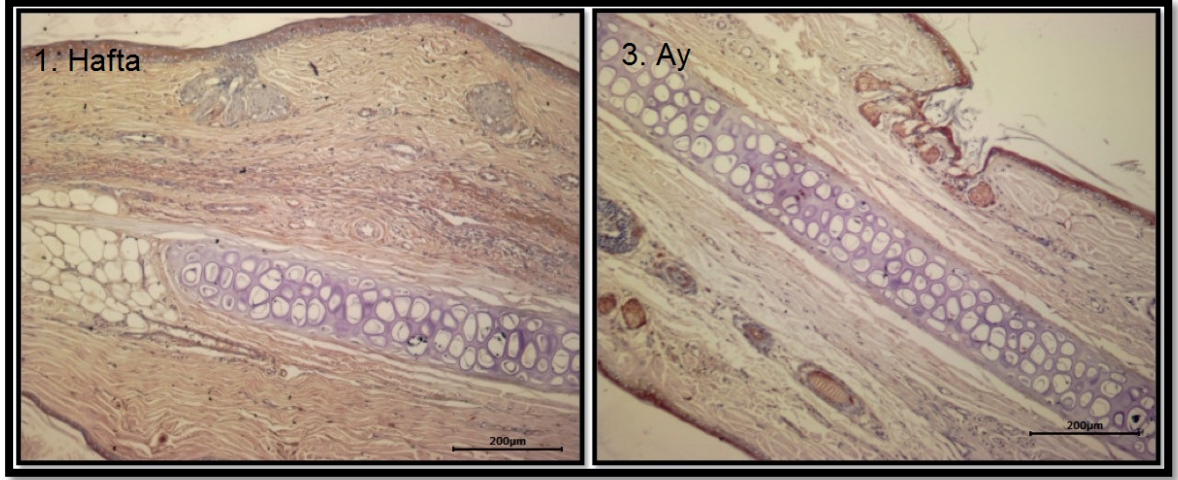
SF grubuna ait üçüncü ay mikrovasküler yoğunluk değerleri PRF grubuna ait birinci hafta değerlerine göre düşük izlendi ($p=0,05$); bu fark SF grubunun üçüncü ayı ile PRF grubunun üçüncü ayı arasındaki mikrovasküler yoğunluk farkına göre daha fazla saptandı ($p=0.275$).



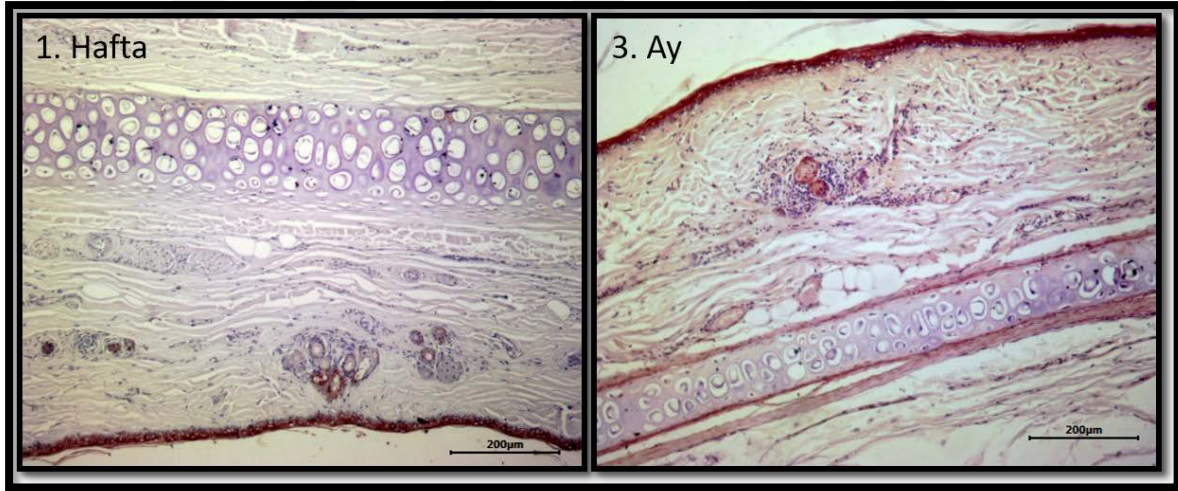
Şekil 42: Mikrovasküler yoğunluk grafiği



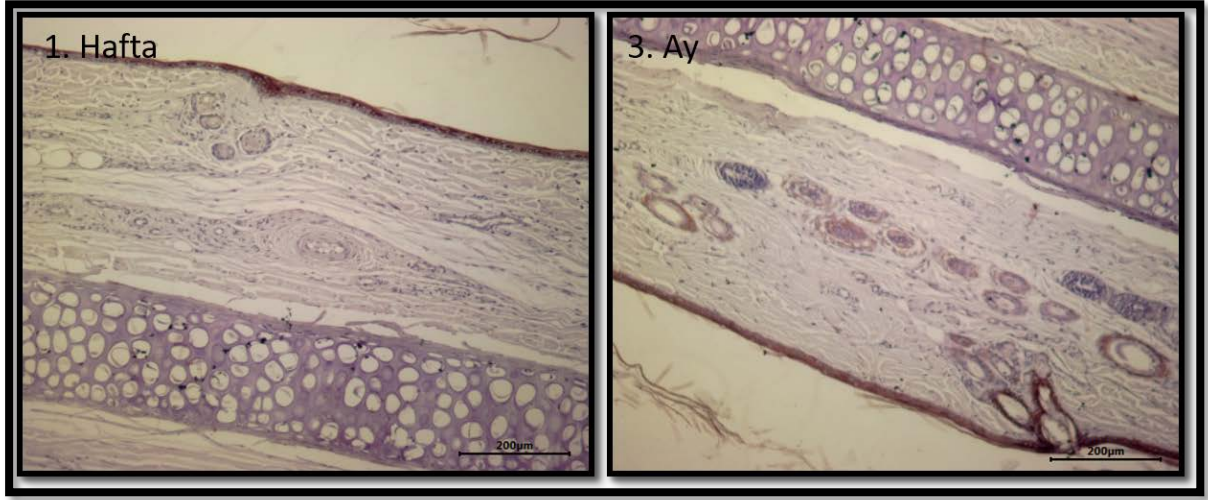
Şekil 43: SF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri



Şekil 44: SVF+ PRF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri

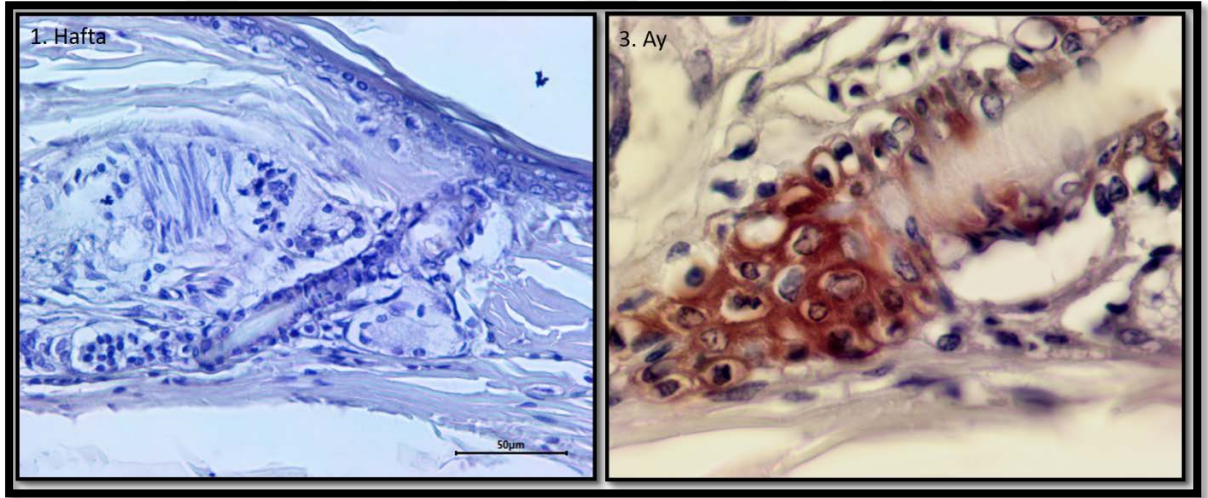


Şekil 45: SVF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri



Şekil 46: PRF grubuna ait VEGF boyama görüntüleri

Hematoksilen-eozin boyamada hiperselüler olarak görünen proliferasyon alanları yapılan Ki-67 boyamasıyla konfirme edildi. (Şekil 47)



Şekil 47: Ki-67 boyama. Soldaki fotoğraf Ki-67 boyanmanın negatif olduğu alanları gösterirken sağdaki fotoğraf (intraselüler: sitoplazmik) pozitif boyanmayı gösteriyor

5. TARTIŞMA

Yaşlanma çok çeşitli organ, doku ve hücrede farklı şekillerde varlığını gösteren değişiklikler bütünüdür. Deri yaşlanması da mozaik şeklindeki bu oluşumun önemli bir parçasıdır. İç organlardaki yaşlanma bulguları çevredeki insanlar tarafından görülemeyecek şekilde maskelenmiş olsa da deri bulguları yaşlanmanın en belirgin bulgularını insanlara sunar. (3)

Yaşlı deri makroskopik olarak incelendiğinde intrinsik yaşlanma sonucunda ince ve atrofik görünümlü, ince kırışıkların izlendiği, kuru görünüm göze çarpar. Ekstrinsik ya da prematür deri yaşlanmasında (özellikle de güneşe maruziyet) ise tipik olarak epidermisi kalın olan, pigment bozuklukları olan, derin kırışıklıkların izlendiği, mat, laksitesi artmış ve pürüzlü görünüm hakimdir. (3, 108-111) Deri bileşenlerinde bu bulgulara neden olan ve histolojik olarak ortaya konmuş birçok değişiklik vardır.

Epidermisin dermal uzantılarında düzleşme ve dermal papillalarda inceleşme ile birlikte dermoepidermal bileşkede düzleşme görülür. Normal şartlarda dermoepidermal bileşkede bazal hücrelerde mevcut olan ve dermise uzanım gösteren hücresel çıkıntılar altıncı dekatta kaybolur. (120) Subepidermal pleksusta mevcut olan kapiller damarlarda zamanla gelişen azalmayla birlikte kıvrılma, uzama, dezorganize ve dilate görünüm gelişir. Perisitlerin miktarında azalma oluşur. Bu değişikliklerin sonucunda dermoepidermal ilişki zayıflar, kapiller perfüzyon azalır. (113, 121, 122)

Mikrosirkülasyon üzerinde yapılan morfolojik ve fizyolojik çalışmalar yaşlanma ile birlikte derinin kanlanması düşme olduğunu göstermiştir. (132) Ultraviyole ışınlar ile oluşturulan yaşlanma modellerinde dermal matrikste anjiogenezin aktive olduğu gösterilmiş olsa da kronik ultraviyole ışın maruziyetinin deride kapiller yoğunluğu düşürdüğü gösterilmiştir. (133-135)

Yaşlanma ile birlikte dermiste fibroblast yoğunluğu belirgin ve progresif olarak azalmaktadır. Dermiste en fazla bulunan hücre grubu olan fibroblastların yoğunluğunun azalması aynı zamanda kollajen ve elastik lifler gibi interselüler alanın tüm komponentlerinde azalmasına neden olur. (123) Fibroblastların sadece sayısı değil aynı zamanda fonksiyon kapasiteleri de azalır. Yaşlanan fibroblastların sentez özellikleri değişir. (124)

Deri gibi mitotik dokuların yaşlanmasında önemli mekanizmalardan birinin dokularda zamanla daha fazla biriken yaşlanmış hücreler olduğu düşünülmektedir. Yaşlanmış hücreler köken aldıkları dokudan daha farklı genetik, morfolojik, davranışsal özellikler göstermektedirler ve hücresel döngüleri geri dönüşümsüz olarak durmuştur.

Yaşlanmış hücreler çevredeki hücreleri, ekstraselüler matriksi ve yapısal bileşenleri etkileyerek bunların yaşlanma belirtileri, kanser ve hastalıkları geliştirmesine neden olmaktadır. (80)

Hücrel yaşlanmanın nedenleri serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif stres, telomer kısalması, apoptozis, diyet, intraselüler sinyal yollarında bozulma, vasküler değişiklikler, sitokin değişiklikleri, çevresel değişiklikler ve çeşitli deri lezyonlarıdır. (80, 81)

Yaşlanma sürecinde endojen antioksidan sistemlerin etkisi azalır. (86) Bu da temelde DNA hasarı olmak üzere birçok yapının hasarına neden olur. (87) DNA hasarına bağlı protein sentezinin modifikasyonu, RNA transkripsiyonunda blokaj, hücre ölümü, metabolik redoks dengesinin bozulması oksidatif stresin artmasına bağlı olarak gelişen hasarlardır. Topikal ve sistemik antioksidan tedavi yöntemleri ile temelde bu hasarın önüne geçilmeye çalışılmaktadır.

Hücre yaşlanmasında temel mekanizma olan telomerler hücre bölünmesini sınırlandırarak aberran hücre proliferasyonunun önüne geçmektedir. Bunun sonucunda da hücrel yaşlanma ve yaşlılık bulguları ortaya çıkmaktadır. (91)

Yaşlanma sürecinde telomerlerin kısalmasının en önemli nedenlerinden biri erişkin hücrelerinde telomeraz aktivitesinin zamanla azalmasıdır. Telomeraz enziminin doku rejenerasyonu sırasında sürekli bölünen hücrelerde telomerlerin kayıp hızına karşı gelememesi telomer kısalmasıyla sonuçlanmaktadır. (94) Memelilerde telomerlerin sonlanmasını önleyen temel mekanizma telomeraz enzimi ile bu yapının uzatılmasıdır. (93) Derinin proliferasyon ve fonksiyonunun devamı için telomeraz aktivitesinin önemi gösterilmiştir. (96) Telomeraz aktivitesi deri yaşlanmasında ve onkogenezinde önemli rol oynamaktadır. (97) Telomeraz ekspresyonu embriyonik hayatta yüksek seviyelerde gerçekleşirken doğumdan birkaç hafta sonra birçok hücre grubunda azalmaya başlamaktadır. Kök hücreler, lenfositler ve deri fibroblastları gibi hücre grupları ise telomeraz aktivitesinin korunduğu hücrelerdir. (94) Progenitör hücrelerden zengin bir karışım olan SVF doku düzeyinde fibroblast migrasyonu ve stimülasyonuna neden olmaktadır. (191) Bu nedenle SVF enjeksiyonu sonrasında progenitör hücreler direk olarak dokuda artarken ve fibroblastların migrasyona uğrayarak doku düzeyinde artmasını sağlamaktadır. Telomeraz aktivitesinin korunduğu bu hücre gruplarının deride artmasının yaşlanma sürecindeki değişikliklerin tam tersi etki oluşturduğunu düşündük. Daha sonra bahsedilecek olan birçok diğer rejeneratif özellik yanında bu özelliği SVF'yi çalışmamızda kullanacağımız hücre kaynağı olarak seçmemizde önemli bir neden oldu.

Yaşlanma sürecinde yukarıda belirtilen değişiklikler sonucunda dermal kollajen sentezi azalır ve dermal ekstraselüler matriks miktarı azalır. Dermal ekstraselüler matriksin önemli bileşenleri olan GAG'ların miktarında (özellikle hyaluronik asit ve dermatan sülfat) azalma ile birlikte dermisin su tutma kapasitesinde ve turgorunda azalma meydana gelir. (125) Kollajen fiberlerinde rastgele dağılım, kırılma, kalınlaşmaya bağlı dezorganize görünüm ve sonuçta total dermal dezorganizasyon gelişir. (120)

Dermal hücreler, vasküler yapılar ve ekstraselüler matrikste yaşlanmaya bağlı olan değişiklikler nedeniyle dermisin rejeneratif kapasitesi düşmektedir. Yaşlanan deride dermisin intrinsik ya da ekstrinsik etkilerle zarar görmesi durumunda epidermis üzerinde yapısal, vasküler, rejeneratif ve nemlenmeyi artırıcı pozitif etkileri azalır. Antioksidan aktivitede azalma nedeniyle ultraviyole ışınların zararlı etkisi artar. Sonuçta ısı regülasyonu, duyu, vasküler rezerv negatif olarak etkilenir. (113)

Bu değişiklikler gözden geçirildiğinde yaşlanma ile birlikte derinin kanlanması azalma, ekstraselüler matriks miktarında azalma, hücresel yoğunluk ve ekstraselüler matriks sentez kapasitesinde azalma dikkat çekmektedir. (120, 123, 124, 132-135)

1980'li yıllarda toplumun sadece ünlü ve ayrıcalıklı kesimleri kozmetik yaklaşımları kullanmaktaydı. Bu dönemde sıklıkla kullanılan yöntemler estetik cerrahi ve derin kimyasal soyma işlemleriydi. (201) Günümüzde ise sağlıklı deriye sahip olmak neredeyse tüm toplum tarafından amaçlanmaktadır. Bu amaç ile büyük araştırmalar ve harcamalar yapılmaktadır. Buna rağmen birçok kişi bu hedefe ulaşamamaktadır. Sağlıklı bir deri görüntüsüne sahip olmak günümüzde gerçek yaştan uzak, saf ve sağlıklı bir görünüme ulaşmanın önemli bir yolu olarak görülmektedir. (3)

Yaşlanma mekanizmasında önemli etkenler olan radyasyon, güneşe maruziyet, ultraviyole ışın etkisi, serbest radikal etkisi, beslenme bozuklukları, genetik ve benzeri faktörlerin etkisini azaltmak için önleyici tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin hiçbirisi risk faktörlerini tamamen ortadan kaldırmak için yeterli olamamaktadır. Bu nedenle yaşlanma bulgularının tedavisi için farklı yöntemler bilim insanları tarafından aranmaktadır. (202)

Bulunduğumuz dönem eskisinden farklı olarak insanların minimal invazif, hemen etki gösteren, sosyal hayatı kısıtlamayan, hızlı iyileşme süreci sağlayan, ucuz teknikleri aradığı bir dönemdir. Toplum invazif estetik cerrahi işlemlerin getirdiği problemlerden uzaklaşmaktadır; ağrısız, kolay yöntemlerle genç ve güzel görünebilmenin yollarını aramaktadır. (201)

Biz de bu çalışmaya başlarken benzer beklentilerin karşılanmasını sağlayabilecek bir tekniği ortaya koymayı amaçladık.

Yaşlanma ile birlikte oluşan histolojik ve klinik değişikliklerin geri döndürülebilmesi ya da hafifletilebilmesi amacıyla günümüzde uygulanan birçok invazif ve non-invazif tedavi yöntemi mevcuttur. (3)

Mevcut cerrahi dışı tedavi stratejileri incelendiğinde yaşlanma etkenlerini optimal seviyeye getirmek için günlük yaşamın düzenlenmesinden başlayan ve topikal deri bakımı ajanlarına, sistemik replasman tedavilerine uzanan birçok non-invazif tedavi seçeneği olduğu görülebilir. (3, 6) Bu alandaki invazif yöntemler ise; kimyasal ve mekanik yüzey yenileme yöntemleri, enerji bazlı dermoepidermal biyouyarıcı yöntemler (lazer, radyofrekans, IPL gibi), nörotoksin uygulamaları, biyouyarıcı ajan enjeksiyonları, dermal ve subdermal dolgu yöntemleridir. (3)

Botulinum toksin uygulamalarının dermal fibroblastlarda tip-1 kollajen sentezini artırdığı bildirilmiştir. (203) Buna rağmen daha yaygın olan bilgi botulinum toksini derinin yapısına etki etmediği, yaşlanma sürecini yavaşlatmadığı yönündedir ve ancak botulinum toksini düzenli olarak uygulandığında dinamik kırışıklıkların önüne geçilerek yaşlanma belirtileri görünmez hale getirilebilir. (3) Bu etkiler sayesinde frontal, glabellar, periorbital, perioral, servikal yüzeyel kırışıklıkların ve hiperhidrozun geçici tedavisi sağlanabilir. (144) Botulinum toksini uygulamalarının yaşlanma bulgularının geçici tedavisini sağlıyor olmasına rağmen yaşlanan deride ihtiyaç duyulan selüler ve ekstraselüler proliferatif etki ile rejüvenasyonu sağlamak konusunda yetersiz olduğu görülmektedir.

Yumuşak doku dolguları belirgin kırışıklıkların ve yumuşak doku hacim kaybının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. (204) Yumuşak doku dolgu uygulaması morluk, kızarıklık, ödem, ağrı, hassasiyet gibi sık görülen minör komplikasyonları ve enfeksiyon, nekroz, alerjik reaksiyon, nodüler reaksiyon, görme kaybı gibi birçok komplikasyonu yanında getirmektedir. (205) Yaygın olarak kullanım alanı bulan yumuşak doku dolgularının bu komplikasyonları nedeniyle otolog yumuşak doku dolgu arayışı ortaya çıkmıştır. (206) Bu noktada PRF'nin ucuz, ulaşılabilir, geniş alanları tedavi edebilecek miktarda elde edilebilen ve hem yumuşak doku hacimlendirilmesinde hem de kırışıklıkların tedavisinde dolgu maddesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. (207, 208) Ayrıca PRF çevre dokuda oluşturduğu proliferatif etki ile de deri elastisitesini artırabileceği ve yüzeyel kırışıklıkların tedavisini sağlayabileceği bildirilmiştir. (206)

Deri gençleştirme tedavilerinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden olan yüzey yenileme yöntemleri lazer uygulamaları, kimyasal soyma uygulamaları, radyofrekans uygulamaları, mikroğne uygulamaları ve dermabrazyon uygulamalarıdır. (209)

Lazer kullanılarak yapılan yüzey yenileme uygulamaları 1960'lı yıllarda kullanılmaya başlanmış ve kısa sürede popüler olmuştur. 1980'li yıllarda kullanılmaya başlanan karbondioksit lazer uygulamasıyla birlikte estetik yüzey yenileme konusunda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Devamlı atım kullanılan karbondioksit lazer yöntemi sonrasında pigmentasyon bozuklukları, skar formasyonu, eritem, enfeksiyon, deri döküntülerinin oluşması gibi komplikasyonlar yüksek sıklıkta görülmüştür. Ayrıca ağrı, etkinin geç ortaya çıkması gibi sık görülen etkiler de prosedürün rahatsızlık verici olmasına neden olmuştur. Daha sonra geliştirilen lazer teknolojileri bu istenmeyen etkileri azaltmayı başarmıştır. (209) Non-ablatif lazer yöntemleri gibi yeni geliştirilen yöntemlerde komplikasyonlar çok daha az görülse de alınan sonuçlar istenen derecede etkili değildir. (202)

Kimyasal soyma yöntemleri ise çeşitli kimyasal ajanların deri yüzeyine uygulanması ardından keratoliz ve keratokoagülasyona neden olması ile etki eder. Bu uygulama kontrollü olarak epidermin ve dermin hasar görmesine neden olur. Bu hasar ardından derinin katmanları dökülerek yara iyileşme süreci başlar. Kimyasal soyma uygulanan bölge rejenerasyon ve remodelling aşamalarından geçerek iyileşir. Bunun sonucunda daha iyi yapıda ve görünümde deri elde edilmesi amaçlanır. Kimyasal soyma yöntemlerinin de yanma hissi, eritem, kaşınma, ödem, bül oluşumu, akne benzeri döküntü, enfeksiyon, dirençli eritem, demarkasyon hattı oluşması, pigment bozuklukları, skar formasyonu gibi birçok olağan komplikasyonu vardır. (210) Alerjik reaksiyonlar, laringeal ödem, toksik şok sendromu, böbrek hasarı, kardiyotoksisite, korneal hasar, alt göz kapağı ektropiyonu gibi yaşamı tehdit edici komplikasyonlar yanında belirgin skar formasyonu, ciddi pigmentasyon bozukluğu gibi majör komplikasyonları da mevcuttur. (211)

Yüzey yenileme tekniklerinin rejüvenasyon etkileri eskiden bu yana kullanılmaktadır. Bu tekniklerin uygulanmasına karar verildiğinde olası komplikasyonların kişiyi daha iyi görünüm elde etmekten uzaklaştırabilecek minör komplikasyonlardan başlayıp hayatı tehdit eden komplikasyonlara kadar uzanabildiği görülmektedir. Hem lazer uygulamaları hem de kimyasal soyma uygulamaları etkinin ortaya çıkması için yara iyileşme süreci gerektirmektedir. (202, 210) Yukarda vurgulandığı gibi kullanılan fiziksel, kimyasal uyarılar ve yara iyileşmesi nedeniyle yüzey yenileme teknikleri çeşitli komplikasyonlara açıktır. Oysa bu uygulamaların temel prensibi olan yara iyileşmesi ile indüklenen süreç yerine "rejeneratif

tıp” ortamın rejeneratif kapasitesini artırabilecek ajanları sağlar. (212) Çalışmada kullanmış olduğumuz SVF ve PRF uygulamalarında da etkinin ortaya çıkması için yara iyileşme sürecinin uyarılmadığı görülebilir. (157, 163, 168, 181, 183, 187, 213, 214) Doku bütünlüğünün bozulmadığı bu uygulamalardan daha az sayıda ve daha az ciddi komplikasyon beklenmesinin de yanlış olmadığı söylenebilir. Ayrıca PRP’de olduğu gibi otolog dokuların alerjik reaksiyonlara neredeyse hiç açık olmaması (209) da bu tekniklere karşı önemli bir avantaj olarak görülebilir.

Burada sıklıkla vurgulanan “rejuvenasyon” kelimesi gençleştirme, genç görünüme ulaştırma ve canlandırma anlamlarına gelmektedir. Rejeneratif tıp ise yaşa, hastalıklara, çeşitli hasarlara, konjenital defektlere bağlı gelişen doku ve organ fonksiyonlarının kaybını gidermek için canlı, fonksiyonel doku oluşturma sürecidir. (215)

Rejuvenasyon amacıyla yapılan tedavi stratejilerinde belirlenen hedefler fibroblastların biyosentetik kapasitesinin artırılması, doku düzeyinde optimal fizyolojik çevrenin oluşturulması, hücresel aktivitenin artırılması, hidrasyon sağlanması ve bunların yanında kollajen, elastin, hyaluronik asit gibi ekstraselüler matriks komponentlerinin sentezinin artırılmasıdır. İstenen bu etkileri sağlamak için hyaluronik asit, vitaminler, mineraller, hormonlar, büyüme faktörleri, amino asitler, otolog kültüre fibroblastlar gibi birçok uyaran tek başına ya da kokteyller halinde dermise enjekte edilmiştir. (3)

Mezoterapi tanımı medikal ve kozmetik amaçlarla bitki ekstraktları, ilaçlar, vitaminler ve birçok biyoaktif maddenin küçük dozlarda, ince iğnelerle çok sayıda intradermal-subdermal enjeksiyonudur. Temelde bir ilaç uygulama yoludur. (216) Mezoterapi prosedürlerinde kullanılan ekipmanların ulaşılabilir olması, diğer birçok prosedüre göre daha az deneyim gerektirmesi, kullanılan ilaçların düşük dozlarda uygulanması, ilaç yan etkilerinin göreceli olarak düşük olması, sonuçların hızlı ortaya çıkması, göreceli olarak ucuz olması (seans başına ortalama 200-600 Amerikan Doları) bu prosedürlerin genel kabul görmesine neden olmuştur. Bütün bu pozitif noktalara rağmen mezoterapi uygulamalarının etkinliğini ve güvenilirliğini ortaya koyan yeterince çalışma yoktur. (217) Bu amaçla (mezoterapi) kullanılan içeriklerin çoğu FDA tarafından onaylanmış ilaçların FDA tarafından önerilmemiş olan şekilde kullanımı şeklinde uygulanmaktadır. Bunun yanında birçok ilacın ve ilaç dışı içeriğin karışımı olarak uygulanması nedeniyle tamamen farklı yeni bir ilaç olarak algılanabileceğinden kullanımı tartışmalı bir tedavidir. (217) Ağrı, bulantı, kusma, kaşınma, ödem, eritem, subkutan nodül oluşumu gibi geçici ve nispeten sık görülen komplikasyonlar dışında ciddi hipersensitivite reaksiyonları, deri nekrozu, enfeksiyon, skar formasyonu gibi nadir ama ciddi komplikasyonlara da sebep olabilmektedir. (217)

Mezoterapi tedavilerinde kullanılan içeriklerin standardize olmaması yanında etkinliğini ve güvenilirliğini gösteren çalışmaların yetersiz olduğu göz önünde bulundurulduğunda olası komplikasyonlar ortaya çıktığında önemli kalıcı deformiteler ve ciddi medikolegal problemlerle karşılaşılabilceği öngörülebilir.

Dokuların tam fonksiyonlu olarak ex-vivo üretimini ve hasarlı alana yerleştirilmesini hedefleyen ‘‘doku mühendisliğinin’’ aksine sonradan tanımlanan ‘‘rejeneratif tıp’’ hasarlanan bölgede rejenerasyon ya da skarsız iyileşmeyi sağlayacak olan ve hammadde niteliğindeki materyalleri sağlar. Son yıllarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp sıklıkla birlikte anılmaktadır. Rejeneratif tıp konsepti bütün olarak üretilmiş fonksiyonel dokunun ilgili alana yerleştirilmesinden çok doğal yara iyileşmesi cevabını destekleyen ve bu cevabı artıran bir yaklaşıma sahiptir. Bu alanda geliştirilen tedavi yöntemleri dokularda rejenerasyon için esansiyel olan üç farklı komponent sağlar: hücreler, büyüme faktörleri ve skafold. (212)

Çalışmanın başlangıcında rejeneratif tıp yaklaşımından faydalanarak rejuvenasyon sağlamayı hedefledik. Bu hedefe ulaşabilmek için pahalı ticari büyüme faktörleri, hücre kültürleri ya da bu faktörleri taşıyan ticari skafold yapılar ve viral vektörleri kullanmak yerine tamamen otolog dokulardan elde edilen doku konsantrelerinin dermal yapılarda proliferasyon sağlayabileceği ve rejeneratif etki oluşturabileceği hipotezini araştırdık.

Otolog dokulardan elde edilen PRF ve SVF’nin rejeneratif özelliği olan birçok büyüme faktörü salınımı yaptığını literatür araştırması sırasında gördük. (148-150) Ayrıca tıpkı PRP gibi platelet konsantresi olan PRF’nin otolog doku rejenerasyonunda kullanılabilen kompleks, doğal bir skafold olduğunu gördük. PRF’nin yara iyileşmesi ve rejenerasyon özelliklerinin daha önce tanımlanan PRP’ye göre daha gelişmiş olduğunu görerek çalışmamızı PRF’ye yönlendirdik. (151) Bu doğrultuda biyouyarıcı olarak otolog dokulardan elde edilen PRF (tam kandan) ve SVF’yi (yağ dokudan) subdermal plana enjekte ederek bu ajanların ayrı ayrı ve kombinasyon halinde dermal ve subdermal komponentlere etkisini araştırdık.

Geleneksel otolog PRP tam kandan santrifüj yoluyla ayrıştırılan yüksek yoğunluklu trombosit konsantresidir. İçerdiği birçok büyüme faktörü sayesinde hücre migrasyonu, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyon ile birlikte ekstraselüler matriks sentezini uyarmaktadır. Bunlar yara iyileşmesi aşamalarında da görülen ve birçok invazif yüzey yenileme tedavisinde kontrollü travma sonrasında uyarılmaya çalışılan etkililerdir. Bu özellikleri nedeniyle PRP deri gençleştirme konusunda dikkatleri üzerine çekmiştir. (3) Kimyasal, mekanik ya da biyolojik dış uyaran uygulanmaksızın, tamamen otolog doku

bileşenleri ile bu etkilerin ortaya çıkarılabilmesi çalışmamızın otolog dokular üzerine şekillenmesini sağlayan önemli bir çıkış noktası olmuştur.

PRP rejeneratif tıp kavramının gerektirdiği üç bileşen olan hücre, büyüme faktörü ve skafolddan ikisini sağlayabilmektedir (büyüme faktörleri ve skafold). (212) PRF, doku rejenerasyonu ve fizyolojik yara iyileşmesinde gerekli olan endojen protein içeriğinin fazla olması ve kolay elde edilebilmesi nedeniyle biyomühendislikte yaygın kullanım alanı bulmuştur. (160)

PRP'nin ilk tanımlandığı şeklinden sonra ikinci kuşak PRP olarak adlandırılan PRF ilk olarak Choukroun ve arkadaşları tarafından tanımlanarak oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılmıştır. (157) PRF içeriğindeki trombositlerin alfa granüllerde çok sayıda protein yapılı büyüme faktörü bulunur. Bunlar PDGF, TGF- β , VEGF, EGF, IGF, FGF, ECGF ve PDAF'dir. (148-150) PRF sadece içeriğindeki trombositlerden ve büyüme faktörlerinden kaynaklanan bir etkiye sahip değildir. Aynı zamanda içerdiği fibrin matriksin de doku düzeyinde etkileri mevcuttur. Fibrin hücre infiltrasyonu için doğal bir matriks oluşturur ve aynı zamanda anjiogenik etkiye sahiptir. (161) Bu da PRP ile karşılaştırıldığında PRF'nin daha gelişmiş rejeneratif özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. (151) Fibrin enjekte edildiği dokuya yapışır; çevresindeki hücreler ve kan yoluyla ulaşan hücreler için bağlanma, migrasyon, proliferasyon bölgesi olarak görev yaparak doku rejenerasyonunu indükler (skafold fonksiyonu). (162) Fibroblast infiltrasyonu sayesinde otolog kollajen üretimi gerçekleşir ve degrade olan fibrin yerini kalıcı olan otolog kollajene bırakır. (7) PRF'de mevcut olan fibrin komponentinin selüler ve aselüler yapıların yerleşerek fonksiyon gösterebileceği bir iskelet yapısı oluşturması nedeniyle PRF'ye doku düzeyinde indirekt olarak hücresel içerik de sağladığı söylenebilir. PRF'nin bu özelliklerini dikkate aldık. Sonuçta doku mühendisliği ve rejeneratif tıp konseptinin temel şartları olan hücre, skafold ve büyüme faktörlerinin hepsini birden karşılayabildiğini düşündük. Böylelikle PRF'yi rejeneratif tıp için ideal bir biyoyararıcı ajan olarak gördük.

Bahsedilen pozitif ayırıcı etkilerinin yanında PRF'nin istenen bazı diğer özelliklerinin de olduğunu gördük. Antikoagülan ve trombin derivesi ürünlerin kullanımını gerektiren PRP ile karşılaştırıldığında sadece santrifüj uygulanarak elde edilen PRF'nin tam olarak otolog olduğu görülmektedir. (151, 214) Tamamen otolog olması PRF'nin otolog olmayan diğer birçok ürüne kıyasla en önemli avantajlarından biri olarak görülebilir. Ayrıca tam kandan elde edilen bir ürün olması, basit teknikler ve ucuz ekipmanlar ile elde edilebilmesi nedeniyle tekrarlayan uygulamaların gerektiği klinik durumlarda kolaylıkla uygulanabilir. PRF'de bulunan trombositler hapsoldükleri fibrin tıkaç içerisinde aktive olarak büyüme faktörü

salınımına başlar ve bu büyüme faktörleri de trombositler gibi fibrin ağı içerisinde hapsolür. Fibrin ağı degrade oldukça bu faktörlerin salınımı gerçekleşir. Yapılan çalışmalarla PRP'nin 24 saatlik hızlı büyüme faktörü salınımının aksine PRF'nin etkin büyüme faktörü salınımının 28 güne kadar devam ettiğı gösterilmiştir. (16, 163)

PRF jel formunda kullanılabildiğı gibi fibrin ağının tam olarak oluşmadığı enjekte edilebilir formda da kullanılabilmektedir. Tam kanın santrifüj edilmesiyle koagülasyon kaskadının tamamlanmasından önceki süre gözetilerek ek bir katkı maddesi kullanımı gerektirmeksizin PRF ayrıştırılabilmektedir. Elde edilen PRF koagülasyon kaskadı tamamlanıp fibrin tıkaç oluşmadan önce enjekte edilebilir formda iken yaklaşık olarak 10 dakikalık süre geçtikten sonra jel formu kazanmaktadır. (218) PRF her iki formda da kullanılabilmektedir. (155, 214)

Bu çalışmada uygulama kolaylığı sağlaması, ek cerrahi insizyon gerektirmemesi, minimal invazif yaklaşıma olanak sağlaması nedeniyle enjekte edilebilir PRF tercih edildi. PRF jel kullanımı deri insizyonu ve jel tabakanın yerleştirilebileceğı alanın diseksiyonunu gerektireceğı için bu formun kullanılmasından uzaklaşıldı.

PRF rejeneratif tıp konseptinin gerektirdiğı temel üç içeriğı sağlamasına rağmen selüler komponentini doku düzeyinde dolaylı olarak hücre migrasyonunu indüksiyonu ile sağlamaktadır. (161, 162)

Bu nedenle PRF'yi; plastik cerrahide sıkça kullanılan, yağ dokudan elde edilen ve progenitör hücreleri de içeren bir hücre kokteyli olan SVF ile kombine ettik.

SVF klasik olarak "kollajenaz ile sindirilmiş adipoz dokudan santrifüj ile elde edilebilen ve endotel hücreleri, perisitler, düz kas hücreleri, mast hücreleri, lökositler, adipoz kaynaklı kök hücrelerden oluşan heterojen bir hücre grubu" şeklinde tanımlanabilir. (183, 184) Bu klasik tanıma rağmen herhangi bir aşamada kollajenazın kullanılmadığı ve sadece mekanik olarak SVF'nin elde edilebildiğı birçok yöntem de tanımlanmıştır. (171)

Yağ dokunun elde edilmesinden sonra SVF hücrelerinin elde edilmesine kadar geçen süre şimdiye kadar tanımlanan mekanik yöntemlerde ortalama 15-20 dakika iken; manuel ve otomatik sistemlerin kullanıldığı enzimatik yöntemlerde bu süre yaklaşık olarak 90-120 dakikadır. (171) Bu çalışmada kullandığımız mekanik yöntemin çalışma süresi de 20-30 cc lipoaspirat için yaklaşık olarak 20 dakikadır.

Enzimatik yöntemler SVF hücrelerinin doku düzeyinden serbestlenmesini sağlamak amacıyla çeşitli yıkama, santrifüj işlemlerinin yanı sıra yağ dokunun kollajenaz enzimi ile sindirilmesi aşamasını içeren yöntemlerdir. (193, 194) Mekanik yöntemlerde ise kimyasal ya da enzimatik herhangi bir işlem uygulanmamaktadır.

Bu yöntemlerde temel olarak santrifüj, vibrasyon, çalkalama, süzme işlemlerinden bir ya da birden fazlası kullanılmaktadır. (171, 194) Bu çalışmada kullanılan mekanik SVF elde etme yönteminde santrifüj ve karıştırma fonksiyonlarından yararlanılmaktadır.

Kök hücre ile yapılan çalışmalarda malign transformasyon kaygısı önemli bir kısıtlayıcı nedendir. Trofik etkileri ve hasarlı dokulara yönelme gibi özellikleri nedeniyle kök hücrelerin tümörlü dokuda tümör büyümesini tetiklediği ve metastaz oranlarını artırdığı in-vitro çalışmalarda ve in-vivo hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. (219) İnsanda adipoz kaynaklı kök hücrelerin malign transformasyona yol açtığı gösterilmemiştir. (220) Yağ dokudan izole edilen kök hücre süspansiyonlarının kullanımından önce sıklıkla hücre kültürü aşamasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda in-vitro ortamda yapılan kök hücre pasajlarında üçüncü pasajdan sonra elde edilen kök hücrelerde malign transformasyon olasılığının arttığı gösterilmiştir ve bu aşamadaki hücrelerin tercih edilmemesi gerektiği düşünülmektedir. (220) SVF ise hücre kültürü aşamasını gerektirmeksizin doku rejenerasyonu için alternatif bir hücre kaynağı olarak kullanılabilir. SVF'nin hücre kültürü yapılmadan kullanılabilmesi, kök hücre kullanılırken sıklıkla uygulanan ex-vivo hücre kültürü ve taşıma basamaklarında gelişebilecek olan hücresel dönüşümlerin de önüne geçmektedir. (16)

SVF'nin doku düzeyinde birçok rejeneratif etkisi mevcuttur. SVF'nin; özellikle de içeriğinde yer alan adipoz kaynaklı kök hücreler ve endotelial progenitor hücrelerin anjiyogenik, neovasküler etkileri gösterilmiştir. (190)

Ratlarda SVF intradermal olarak uygulandığında üçüncü ve yedinci günlerde fibroblast migrasyonu, stimülasyonunda belirgin artış saptanmış ve otuzuncu günde bu uyarı kollajen sentezinde artışla sonuçlanmıştır. (191) SVF'nin dolaylı olarak neden olduğu ekstraselüler matriks sentezi artışının yanında doku düzeyinde direkt olarak ekstraselüler matriks sentezi yeteneği olduğu da görülmüştür. Yapılan bir in-vitro çalışmada fibroblastların ve SVF hücrelerinin ekstraselüler matriks sentez kapasiteleri değerlendirilmiştir. SVF hücrelerinin kollajen ve GAG sentezlediği gösterilmiştir. SVF hücrelerinin fibroblastlara göre kollajen sentez kapasitesi %50-52 ve GAG sentezleme kapasitesi %70-74 olarak saptanmıştır. Bu doğrultuda ekstraselüler matriks sentezleme kapasitesi yaklaşık olarak %60 olarak bildirilmiştir. (192)

Yaşlanma süreci kronik ve düşük şiddetli inflamasyonla seyretmektedir. (221) Ultraviyole radyasyon maruziyeti, beslenme bozuklukları, kronik deri hastalıkları ve diğer intrinsik ve ekstrinsik yaşlanma nedenleri deride inflamasyona neden olmaktadır. (80, 222)

Yaşlı deride oranı artan yaşlanmış hücreler inflamatuvar sitokinler, kemokinler, ekstraselüler matriks yıkımına neden olan proteazların salınımına neden olur. (80) SVF içeriğindeki mezenkimal kök hücreler birçok anti-inflamatuvar faktör ve immünmodülatör enzim salgılayarak lokal immünmodülatör etki gösterir. Ayrıca regülatör T-hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak otoimmün reaksiyonları da baskılayabilmektedir. (223) İzole mezenkimal kök hücrelere göre ve SVF'nin otoimmün reaksiyonları daha fazla baskıladığı gösterilmiştir. (224)

Görüldüğü gibi SVF hücreleri; neovaskülarizasyon üzerinden doku kanlanmasını artırıcı etkisi, fibroblastlar üzerinden dolaylı olarak ekstraselüler matriks sentezi sağlaması, direkt olarak ekstraselüler matriks sentezleme kapasitesi ile rejeneratif tıp yaklaşımının birçok gereğini karşılamaktadır. Ayrıca yaşlanma sürecinde önemli bir basamak olan kronik inflamasyon karşısında immünmodülatör etkisi vardır. SVF'nin elde edilmesi ardından kültür aşamasından geçmemesi ve kısa sürede elde edilebilmesi pratik kullanıma uygun olmasını sağlamaktadır. Doku düzeyindeki rejeneratif etkilerinin yanında kolay elde edilebilir olması SVF'nin PRF ile kombine edilmesi planlanan rejeneratif hücre kaynağı olarak seçilmesinde önemli bir neden olmuştur.

Ayrıca SVF ve PRF kombinasyonu yağ grefti ile birlikte doku hacimlendirilmesi için kullanıldığında yağ grefti viabilitesinin sadece yağ grefti uygulamasına, SVF ve yağ grefti uygulamasına, PRF ve yağ grefti uygulamasına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. (16) Aynı çalışmada yağ grefti ile birlikte SVF ve PRF kombinasyonunun kullanıldığı uygulamalarda mikrovasküler yoğunluğun ve greft hacminin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle yaşlanmaya bağlı gelişen, aynı zamanda belirgin hacim sağlanması gereken durumlarda SVF ve PRF'nin proliferatif etkisi yağ grefti ile birlikte kullanılarak yaşlanma bulgularının geri döndürülmesi beklenebilir.

Yağ grefti uygulamalarında viabilitenin kişiden kişiye değişmesi ve absorpsiyon oranlarının %30-70 gibi yüksek oranlarda bildirilmesi (225) nedeniyle elde edilen yağ greftlerinin saklanabilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yağ greftlerinin soğutularak saklandığında viabilitesinin ve greft olarak kullanılabilirliğinin değerlendirildiği bir çalışmada -20, -80, -196 °C' de saklanan yağ greftlerinin viabilite çalışmalarında gruplar arasında fark olmadığı bildirilmiştir. (8) Bunun yanında bir diğer çalışmada herhangi bir kriyoprotektan madde kullanılmadan -20 ve -80 °C'de saklanan yağ greftleri incelenmiş ve adipositlerin viabilitesi belirgin olarak düşük olarak saptanmış, hücre kültürü yapılamadığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre yağ grefti viabilitesinin yüksek oranda sağlanabilmesi ve kültürün

yapılabilmesi aşamalı soğutmayla (dakikada 1°C) ve kriyoprotektan maddelerin kullanılmasıyla mümkün olmuştur. (226) Aynı çalışmada yağ greftlerinin içermiş olduğu stromal vasküler fraksiyon hücrelerinin viabilitesi de değerlendirilmiş ve tıpkı adipositlerde olduğu gibi aşamalı soğutma yapıldığında ve kriyoprotektif maddeler kullanıldığında viabilitenin yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmada yağ grefti ve SVF hücrelerinin viabilitesinde önemli faktörler greftin alınma tekniği, donörün yaşı, kullanılan yıkama solüsyonları, santrifüj şekli, saklama aşamasında kullanılan taşıyıcı ortam, kriyoprotektan ve saklama sıcaklığı olarak bildirilmiştir. Saklama aşaması sonrasında greftin uygulandığı alıcı bölgeye ait özellikler ve uygulama şekli de diğer önemli faktörler olarak belirtilmiştir. (226) SVF ve yağ greftinin soğutulmuş olarak saklandığı bir başka çalışmada toplam hücre sayısının azalmasına rağmen viabilitesini koruyan SVF hücrelerinin proliferatif özelliklerini devam ettirdiği; hematogenik yüzey moleküllerinin azalması daha fazla mezenkimal ve adipojenik yüzey molekülleri ekspresyonu sağladığı; yağ greftinin doku düzeyinde taze yağ grefti ile aynı özellikleri gösterdiği ortaya konmuştur. (227) SVF'nin saklanma koşullarının optimize edilmemiş olması ve henüz bu konuda görüş birliği sağlanmamış olmasına rağmen bu hücre grubunun soğutulmuş olarak saklanması mümkün olduğu görülmektedir. Hastalardan genç yaşlarda elde edilen yağ grefti ve progenitor hücrelerden zengin olan SVF hücrelerinin ideal şartlarda saklanabilmesi yaşlanma sürecinde bu hücrelerin tekrar kullanılmasını sağlayabilir. Bu sayede daha az hücre içeren, proliferasyon ve sentez özellikleri azalan yaşlanmış hücrelerin oranının arttığı yaşlı deriye yapılacak uygulamalar ile rejeneratif kapasite artırılabilir.

SVF yağ dokudan ayrıştırılırken kullanılan temel metot yağ dokunun kollajenaz enzimi ile parçalanması sonrasında çeşitli yıkama ve tampon sıvılarından geçirilmesi ve santrifüj işlemine tabi tutulması şeklindeki temel enzimatik metottur. (171) Bu metot günümüzde SVF elde etmek için kullanılan temel metottur. (228) Temel enzimatik metodun kullanıldığı, kültür aşamasını içermeyen birçok otomatik ve yarı otomatik sistem günümüzde piyasaya sürülmüştür. Bu sistemlerin dezavantajları son ürünlerde kollajenaz enziminin saptanabilir seviyelerde bulunabilmesi, farklı markaların son ürünlerinin içeriğinin kompozisyonlarının kontrole tabi tutulmaması ve her bir sistemin tek seferde çalışma maliyetinin klinik kullanımı sınırlayıcı sayılabilecek seviyelerde olmasıdır (460-1950 Amerikan Doları). (229) Diğer taraftan son yıllarda enzimatik sistemlere alternatif olarak karıştırma, santrifüj, enjektörden enjektöre aktarma ile ayrıştırma, ultrasonik parçalama gibi farklı mekanik kuvvetleri kullanan yöntemler de geliştirilmiştir. (228, 230) Bu yöntemlerle elde edilen SVF'nin kök hücre özelliklerini ve immün modulator özelliklerini enzimatik yöntemle elde edilen içeriklere benzer şekilde koruduğu gösterilmiştir. (228) Ayrıca yapılan bir çalışmada ultrasonik olarak

elde edilen SVF içeriğinin diferansiyasyon özelliklerinin enzimatik yöntemlere göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. (230) Mekanik yöntemlerle elde edilen SVF içeriğindeki toplam hücre sayısı enzimatik yöntemlere göre daha düşük olmasına rağmen hücresel viyabilitesinin benzer oranlarda olduğu gösterilmiştir. (171)

Çalışmamızda SVF elde etmek amacıyla kullanılabilecek iki ana yöntemden biri olan mekanik yöntemi seçtik. Bu seçim yapılırken mekanik yöntemlerin enzimatik yöntemlere göre daha kısa süre gerektirmesini önemli bir pozitif ayırıcı faktör olarak gördük. Enzimatik yöntemlerden uzaklaşılmasındaki önemli bir neden de kollajenaz enziminin SVF hücrelerini serbestlemek yanında bu hücrelerdeki yüzey moleküllerini de etkileyebileceği ve hücre-hücre ya da hücre-ekstraselüler matriks etkileşimini değiştirerek doku düzeyinde hücre davranışlarını değiştirebileceği fikrinin tartışmalı olmasıdır. (195) Bunun yanında SVF içeriğinden tam olarak ayrıştırılması mümkün olmayan ve birçok üründe saptanabilen rezidü enzimin etkileri de tartışılmaktadır. (228) Tartışmaya açık olan bu noktalar enzimatik tekniklerin güvenilirliğinin sorgulanmasını da yanında getirmektedir. Bu nedenle güvenlik konusunda mekanik tekniklerin bir adım daha öne çıktığının söylenmesi yanlış olmayacaktır. Ayrıca enzimatik yöntemlerle her bir gram lipoaspiratın SVF elde edilmesi için işlenmesi mekanik yöntemlere göre belirgin oranda daha pahalı bulunmuştur. (196, 229) Bu nedenle mekanik olarak elde edilen SVF'nin fayda/maliyet oranının daha yüksek olduğu söylenebilir.

Kollajenaz bazlı tekniklerle elde edilen SVF'nin hücre sayısı farklı yayınlarda 1×10^5 ile 1.3×10^6 arasında bildirilmiştir. Mekanik yöntemlerle elde edilen SVF'nin hücre sayısı ise 1×10^4 ile 2.4×10^5 arasında değişmektedir. Bu karışımlarda bildirilen kök hücre oranları da %1'den az olabilmekte ya da çok az sayıda bildirilen yüksek oranlar dışında genel olarak %16'ya kadar çıkabilmektedir. (171) Çalışmada uyguladığımız mekanik teknik ile elde edilen SVF'nin akımsitometrik incelemelerinde hematojenik yüzey molekülü olan CD45 pozitif hücrelerin (kemik iliği kaynaklı hücreler) oranının %16 olduğu görüldü. Hematojenik olmayan hücre oranı ise %84 olarak saptandı. Elde edilen süspansiyondaki hücrelerden %10,7'sinin mezenkimal kaynaklı kök hücre marker'ları ile (CD45 negatif, CD34 ve CD90 pozitif hücreler) pozitif boyandığı belirlendi. Endotelyal progenitör hücre marker pozitifliği (CD45 negatif, CD34 ve CD31 pozitif) %1,9 olarak saptandı. Elde edilen bu oranların mekanik yöntemle elde edilen ve literatürde bildirilen kök hücre oranlarının ile uyumlu olduğu görüldü. Bunun yanında birçok çalışmada elde edilen kök hücre oranından daha yüksek olduğu görüldü. (171) Bu nedenle SVF kullanılarak yapılan daha önceki çalışmalarda progenitör hücrelerin varlığına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülen etkilerin bu çalışmada kullanılan SVF ile de ortaya çıkması beklendi.

Bu çalışmada, yukarıda belirtilen nedenlerle rejeneratif tıp yaklaşımının önemli silahlarından olduğunu düşündüğümüz SVF ve PRF'nin ayrı ayrı ve kombine kullanımının deri komponentlerine yapılara etkisini araştırdık.

Çalışmayı in-vivo, deneysel çalışma olarak kurguladık. İn-vitro ortamda planlanacak bir çalışma, doku düzeyindeki multifaktöryel değişkenlerden arındırılmış ve sadece istenilen bileşenlerin olduğu sınırlı bir mikroçevrede yapılabilir. Oysa bu çalışma ile in-vitro ortamda ulaşılması beklenmeyen; ancak in-vivo ortamda mümkün olması beklenen kümülatif etkinin (alıcı alanın selüler ve ekstraselüler komponenti ile uygulanan SVF-PRF bileşenlerinin oluşturduğu toplam etkinin) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Deney hayvanı olarak erişkin Yeni Zelanda Tavşanı tercih ettik. SVF elde edilmesi aşamasında yeterli yağ dokuyu sağlayacak olması bu seçimin yapılmasında önemli bir nedendi. Anestezik maddelere karşı duyarlılıklarının fare ve sıçanlara göre daha fazla olması tavşanların deneysel çalışmalarda seçilmesinin önünde önemli bir negatif faktör olmasına rağmen bu çalışmada derin cerrahi işlem yapılmaması, cerrahi işlemin kısa sürmesi (Ortalama 20 dakika) ve tek aşamalı cerrahi prosedür uygulanması nedeniyle tavşanların seçilmesinde sorun görülmemiştir. Ayrıca filogenetik olarak daha alt seviyede olan canlıların rejeneratif kapasitelerinin daha fazla olması da fare veya sıçan yerine tavşan seçilmesinde önemli bir neden olarak görüldü. Tavşanların rejeneratif kapasitesinin filogenetik olarak rat ve sıçanlara oranla insanlara daha yakın olması nedeniyle elde edilen sonuçların insanlara uyarlanması daha doğru olacağını düşündük. Bu nedenle rat ve sıçanların kullanılmasından uzaklaştık.

Deneyin başlangıcında 24 adet tavşana ait 48 kulağa enjeksiyon yapıldı. SF, SVF+PRF, SVF, PRF gruplarına ait 12'şer kulağa yapılan enjeksiyonlar ardından birinci hafta, birinci ay, ikinci ay ve üçüncü ayların sonunda denekler sakrifiye edilerek enjeksiyon bölgelerinden alınan tam kalınlıkta dokular histolojik olarak incelendi.

Histolojik incelemede yaşlanma sürecinden belirgin olarak etkilenen dermal mikrovasküler yoğunluk, dermal kalınlık, kollajen yoğunluğu ve organizasyonu değerlendirildi. Dört ayrı gruba ait veriler grup içinde zamana bağlı değişiklikler ve gruplar arasındaki farklar açısından değerlendirildi.

Deneysel sürecin sonunda SF grubunun grup içi karşılaştırmalarında, birinci hafta ile üçüncü ay mikrovasküler yoğunluklarında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,077$). Benzer şekilde SVF+PRF, SVF ve PRF gruplarında grup içi ya da gruplar arasında mikrovasküler yoğunluk açısından fark gözlenmedi.

Mikrovasküler yoğunluk değerlendirmesinde dikkate değer farklılık SF grubunun diğer gruplar ile (SVF+PRF, PRF ve SVF) karşılaştırılmasında görüldü.

SVF+PRF ve SVF gruplarına ait üçüncü ay mikrovasküler yoğunluk değerleri SF grubunun birinci hafta ve üçüncü ay değerlerinden daha yüksek saptandı. Bu değerler arasındaki fark $p=0,05$ değerinde saptandı. Tam olarak istatistiksel anlamlılık sınırında olan bu değer SVF+PRF ve SVF içeriklerinin vasküler proliferatif etkisinin SF grubuna göre farkını anlamlı olarak gösterememiştir. Aradaki farkın $p=0,05$ değerinde kalması etik nedenlerle denek sayısının sınırlı tutulmasının (her bir grup için her zaman diliminde $n=3$) istatistiksel anlamlı değerlere ulaşılmasını önlediğini düşündürmektedir.

Benzer bir durum PRF grubunun birinci ve üçüncü aylarındaki mikrovasküler yoğunluk değerlerinin SF grubunun birinci hafta değerleri ile yapılan karşılaştırmasında da mevcuttur. PRF grubundan elde edilen değerler SF grubuna göre daha yüksek saptanmıştır ($p=0,05$). Bununla birlikte mikrovasküler yoğunluk değerlendirmesinde SF grubunun üçüncü ay değeri ile PRF grubunun birinci hafta değeri arasında istatistiksel anlamlılık sınırında fark ($p=0,05$) saptanırken PRF grubunun üçüncü ayı ile arasında istatistiksel anlamlı fark ($p=0,275$) saptanmamıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırındaki bu farktan yola çıkılarak PRF'nin SVF içeriğine göre daha erken ve kısa süreli bir etki yarattığı öngörülebilir.

Çalışmanın analizinde, birçok ikili karşılaştırmadaki farkın istatistiksel anlamlılık sınırında çıkmasının en önemli nedeni etik nedenlerle sınırlı tutulan denek sayısının yeterli olmaması (her grup için belirli zaman diliminde $n=3$) olarak görülebilir. Bu nedenle bu çalışmanın modifiye edilerek tekrarlanması durumunda ya da benzer çalışmaların kurgulanması durumunda denek sayısının yeterli tutulmasının gerektiği akılda tutulmalıdır. SVF+PRF, SVF ve PRF enjeksiyonlarından sonra farklı derecelerde lokal yoğun selüler ve ekstraselüler proliferatif odaklar gözlenirken amaçlanan yaygın proliferatif etki gözlemlenmedi. Bu histolojik bulgu ile birlikte kritik fark değerindeki istatistiksel değerlendirme verileri de dikkate alındığında SVF ve PRF'nin doku düzeyindeki neovaskülojenik, selüler ve ekstraselüler proliferatif etkilerinin tek doz uygulama şeklinde yapıldığında ancak ılımlı sonuçlara neden olduğu düşünülebilir. Bu nedenle SVF ve PRF'nin aynı alanda tekrarlayan uygulamaları ile daha potent etki sağlanabilir.

Çalışmayı kurgularken PRF ve SVF prosedürün başlangıcında bir kez uygulanacak şekilde planlama yapıldı. Bu nedenle çalışma tekrarlayan uygulamalarla elde edilebilecek sonuçları yansıtmamaktadır. Hem PRF'nin hem de SVF'nin tek doz uygulanması ile yeterli ve belirgin bir proliferatif etki gözlemlenmedi; fakat hem SVF'nin PRF ile kombine edildiğinde hem de sadece SVF uygulandığında lokal yoğun selüler proliferatif odaklar olduğu gözlemlendi.

Tek doz uygulamada elde edilen mikrovasküler yoğunluk artışı ve sıklıkla görülen lokal yoğun proliferatif odaklarını göz önünde bulundurarak PRF ve SVF'nin tekrarlayan uygulamalarının yüksek rejeneratif potansiyele sahip biyouyarıcılar olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızda görülen fokal etkiye göre daha yoğun, diffüz bir proliferatif ve rejeneratif etki sağlanabileceğini gösteren çalışmalara ihtiyaç vardır. İlerde yapılacak olan çalışmalarda, belirli aralıklarla tekrarlanan uygulamaların beklenen etkinin ortaya çıkmasında temel belirleyici faktör olacağı bu çalışma ışığında öngörülebilir.

Bu çalışmada SVF ve PRF'nin elde edilmesi ve uygulanması aşamasında tanımlanan prosedürlerin tamamının lokal anestezi altında yapılabilir olması, hızlı olması, tamamen otolog dokular ile yapılıyor olması, sınırlı sayıda ve ulaşılabilir ekipman ile yapılabilir olmasının klinik kullanımda uygulanabilirliğinin yüksek olmasını sağladığını düşünmekteyiz. SVF ve PRF'nin bu özellikleri aynı zamanda tekrarlanan uygulamaların yapılmasını da mümkün kılmaktadır. Tekrarlayan uygulamalar ile ortaya çıkması beklenen rejeneratif etki yeni çalışmalar ile gösterildiğinde PRF ve SVF'nin klinik kullanımının yaygınlaşabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sağlıklı deri görüntüsüne sahip olmak gerçek yaştan uzak, saf ve sağlıklı bir görünüme ulaşmanın önemli bir yolu olarak görülmektedir. 1980’li yıllarda toplumun sadece ünlü ve ayrıcalıklı kesimleri tarafından kullanılan kozmetik yaklaşımlar günümüzde neredeyse tüm toplum tarafından amaçlanmaktadır. Bu amaç ile büyük araştırmalar ve harcamalar yapılmaktadır. Buna rağmen birçok kişi bu hedefe ulaşamamaktadır. Daha önceki dönemlerde sıklıkla kullanılan yöntemler estetik cerrahi işlemleri ve derin kimyasal soyma işlemleriydi. Bulunduğumuz dönemde ise eskisinden farklı olarak insanların minimal invazif, hemen etki gösteren, sosyal hayatı kısıtlamayan, hızlı iyileşme süreci sağlayan, ucuz teknikleri aradığı bir dönemdir. Toplum invazif estetik cerrahi işlemlerin getirdiği problemlerden uzaklaşmaktadır; ağrısız, kolay yöntemlerle genç ve güzel görünebilmenin yollarını aramaktadır. (3, 201)

Yaşlanma ile birlikte oluşan histolojik ve klinik değişikliklerin geri döndürülebilmesi ya da hafifletilebilmesi amacıyla günümüzde uygulanan birçok invazif ve non-invazif tedavi yöntemi mevcuttur. (3)

Minimal invazif tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalar günümüzde hızla devam etmektedir ve ilerleyen zamanlarda da devam edeceği öngörülebilir.

Fiziksel ve kimyasal uyaranlar, sistemik ya da topikal farmakolojik ajanlar, bakteriyel toksinler, pahalı ticari büyüme faktörleri ya da bu faktörleri taşıyan ticari skafold yapılar ve viral vektörler yaşlanmanın etkilerini ortadan kaldırmak için klinik uygulamalar ve bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. (147, 202, 209) PRF ve SVF bu otolog ürünler içerisinde son yıllarda popülerliği hızla artan iki karışımdır. Birçok rekonstrüktif süreçte kullanım alanı bulan SVF ve PRF doku düzeyinde gösterilen rejeneratif etkileri nedeniyle, özellikle yağ grefti ile birlikte birçok estetik amaçlı tedavide kullanılmıştır. (15, 155, 164) Bu karışımların sahip olduğu immün modülatör, neovaskülojenik, hücrel proliferatif ve ekstraselüler matriks sentezini artırıcı etkiler yaşlanma bulguları ile mücadelede yapılan uygulamalarda ortaya çıkması istenen temel rejeneratif etkilerdir.

Bu çalışmada tek doz PRF ya da SVF uygulaması ile beklenen ve bu iki karışımın potansiyel etkileri olan neovaskülojenik, selüler ve ekstraselüler proliferatif ve rejeneratif etkiler histolojik olarak anlamlı fark oluşturacak şekilde ortaya konamamıştır. Bunun yanında doku düzeyinde fokal yoğun selüler ve ekstraselüler proliferatif etkiler izlenmiştir. (Şekil 35-36-38) Farklı in-vitro ve in-vivo çalışmalarda bu ajanların selüler ve ekstraselüler boyutta proliferatif etkileri ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu çalışmaları dikkate alarak her iki ajanın doku

düzeyinde potansiyel kümülatif etkilerini ortaya koyacak, tekrarlayan uygulamaları içeren, daha fazla sayıda örnek ile yapılan bir çalışma planlanması gerektiğini düşünmekteyiz. Tamamen otolog dokulardan elde edilen, rejeneratif tıp kavramının temel gereklerini yerine getiren bu iki karışımın proliferatif etkilerini ortaya koyabilecek farklı değerlendirme yöntemlerinin kullanıldığı ve bu etkileri artırabilecek farklı biyoyararıcılar ile planlanacak yeni çalışmalar sayesinde daha güçlü rejeneratif etkiler elde edilebileceğini düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Mackiewicz ZR, A. Skin aging. Theory and practice Gerontologija 2008; 9(2):103–8.
2. Cevenini E, Invidia L, Lescai F, Salvioli S, Tieri P, Castellani G, et al. Human models of aging and longevity. Expert opinion on biological therapy. 2008;8(9):1393-405.
3. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. Dermato-endocrinology. 2012;4(3):308-19.
4. Porcheron A, Mauger E, Russell R. Aspects of facial contrast decrease with age and are cues for age perception. PLoS One. 2013;8(3):e57985.
5. Meaie JD, Agrawal N, Chang D, Lee EI, Nigro MG. Noninvasive Facial Rejuvenation. Part 3: Physician-Directed-Lasers, Chemical Peels, and Other Noninvasive Modalities. Seminars in plastic surgery. 2016;30(3):143-50.
6. Baumann L. Nonsurgical skin care and rejuvenation In: Neligan P, Warren RJ, Van Beek A, editors. Plastic Surgery. 2: Elsevier Saunders; 2013. p. 13-28.
7. Hoben G, Schmidt VJ, Bannasch H, Horch RE. Tissue augmentation with fibrin sealant and cultured fibroblasts: a preliminary study. Aesthetic plastic surgery. 2011;35(6):1009-15.
8. 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 plastic surgery. 2012;36(3):714-22.
9. Simonacci F, Bertozzi N, Grieco MP, Grignaffini E, Raposio E. Procedure, applications, and outcomes of autologous fat grafting. Annals of medicine and surgery. 2017;20:49-60.
10. Sood J, Jayaraman L, Sethi N. Liposuction: Anaesthesia challenges. Indian journal of anaesthesia. 2011;55(3):220-7.
11. Livaoglu M, Yavuz E. Soft tissue augmentation with autologous fat graft: the dissected pouch technique. Journal of cutaneous and aesthetic surgery. 2009;2(1):21-5.
12. Cervelli V, Palla L, Pascali M, De Angelis B, Curcio BC, Gentile P. Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. Aesthetic plastic surgery. 2009;33(5):716-21.
13. Modarressi A. Platelet Rich Plasma (PRP) Improves Fat Grafting Outcomes. World journal of plastic surgery. 2013;2(1):6-13.
14. Tsekouras A, Mantas D, Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Kontos M, Zografos GC. Adipose-derived stem cells for breast reconstruction after breast surgery - preliminary results. Case reports in plastic surgery & hand surgery. 2017;4(1):35-41.
15. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]. 2008;34(9):1178-85.
16. Liu B, Tan XY, Liu YP, Xu XF, Li L, Xu HY, et al. The adjuvant use of stromal vascular fraction and platelet-rich fibrin for autologous adipose tissue transplantation. Tissue engineering Part C, Methods. 2013;19(1):1-14.
17. Amirkhani MA, Shoaee-Hassani A, Soleimani M, Hejazi S, Ghalichi L, Nilforoushzadeh MA. Rejuvenation of facial skin and improvement in the dermal architecture by transplantation of autologous stromal vascular fraction: a clinical study. BioImpacts : BI. 2016;6(3):149-54.

18. Wei H, Gu SX, Liang YD, Liang ZJ, Chen H, Zhu MG, et al. Nanofat-derived stem cells with platelet-rich fibrin improve facial contour remodeling and skin rejuvenation after autologous structural fat transplantation. *Oncotarget*. 2017;8(40):68542-56.
19. Sclafani AP, McCormick SA. Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix. *Archives of facial plastic surgery*. 2012;14(2):132-6.
20. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
21. Iordanka A Ivanova SJADS, Lina Dagnino. Signalling In The Epidermis: The E2f Cell Cycle Regulatory Pathway In Epidermal Morphogenesis, Regeneration And Transformation. *International Journal of Biological Sciences*. 2005(1):87-95.
22. Hunter RPJBWJAAHJASMVDJAA. The function and structure of the skin. *Clinical Dermatology*. 4 ed2008.
23. Maria De Falco MMP, Antonio De Luca Embryology and Anatomy of the Skin. In: Alfonso Baldi EPS, Paola Pasquali, editor. *Skin Cancer, A practical Approach*. New york: Springer Science+Business Media; 2014. p. 1-15.
24. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 2007;445(7130):834-42.
25. McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and Organization of Human Skin. *Rook's Textbook of Dermatology*: Blackwell Publishing, Inc.; 2008. p. 45-128.
26. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*. 2005;437(7056):275-80.
27. Koster MI, Roop DR. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;23:93-113.
28. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2013;30(1):30-41.
29. Holbrook KA, Underwood RA, Vogel AM, Gown AM, Kimball H. The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45. *Anatomy and embryology*. 1989;180(5):443-55.
30. Ayşegül Uysal FO, Duygu Çalık Kocatürk, Berrin Özdil. Deri ve Deri Eklerinin Embriyolojik Gelişimi. *Güncel Dermatoloji Dergisi*. 2016;1(1):1-10.
31. Arey LB. The integumentary system. *Developmental anatomy A textbook and laboratory manual of embryology*. 7. Philadelphia/London: WB Saunders Company; 1974. p. 439-41.
32. Keith L. Moore TVNP, Mark G. Torchia. Integumentary system. In: Keith L. Moore TVNP, Mark G. Torchia, editor. *The developing human: clinically oriented embryology*. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 437-55.
33. Thomas W. Sadler. *Langman's medical embryology*. Langman's medical embryology. 11. United States: Philadelphia : Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 362-7.
34. P.M Som JTL, K. Mak. Embryology and Anatomy of the Skin, Its Appendages, and Physiologic Changes in the Head and Neck. *Neurographics*. 2017;7(5):390-415.
35. Pushpendra Kumar Jain DD. The Wonder of herbs to treat-Alopecia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016;4(5).
36. Keith l. moore TVNp, , Mark g. Torchia In: Keith l. moore TVNp, , Mark g. Torchia editor. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri*; 2009. p. 441-3.

37. Mistry DS, Chen Y, Sen GL. Progenitor function in self-renewing human epidermis is maintained by the exosome. *Cell stem cell*. 2012;11(1):127-35.
38. Obagi S, Gandhi RK. 85 - Skin Rejuvenation and Resurfacing A2 - Brennan, Peter A. In: Schliephake H, Ghali GE, Cascarini L, editors. *Maxillofacial Surgery (Third Edition)*; Churchill Livingstone; 2017. p. 1286-301.
39. Chu DH. Overview of biology, development, and structure of skin. In: Thomas B. Fitzpatrick KW, editor. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7. United States: New York : McGraw-Hill, c2008; 2008. p. 57-73.
40. Paul A. J. Kolarsick MAK, Carolyn Goodwin,. *Anatomy and Physiology of the Skin Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011;3(4):203-13.
41. Girolomoni G, Caux C, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Ricciardi-Castagnoli P. Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends in immunology*. 2002;23(1):6-8.
42. Gilbert SF. The epidermis and the origin of cutaneous structures. In: Gilbert SF, editor. *Developmental Biology*. 7: Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA; 2003.
43. Bennet RG. Anatomy and physiology of the skin. In: Ira D. Papel WL, G. Holt , Stephen Park , Jonathan Sykes, editor. *Facial Plastic and reconstructive Surgery*. 2. New York: Thieme Medical Pub; 2002. p. 3-14.
44. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial plastic surgery clinics of North America*. 2011;19(2):229-34.
45. Menon GK. Skin Basics; Structure and Function. In: Pappas A, editor. *Lipids and Skin Health*. Switzerland: Springer International Publishing; 2014. p. 9-23.
46. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in lipid research*. 1991;24:1-26.
47. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*. 2014;32(1):3-13.
48. Wertz PW. Lipids and barrier function of the skin. *Acta dermato-venereologica Supplementum*. 2000;208:7-11.
49. Sato K, Leidal R, Sato F. Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *The American journal of physiology*. 1987;252(1 Pt 2):R166-80.
50. Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of tissue engineering*. 2014;5:2041731414557112.
51. Baumann L. Skin ageing and its treatment. *The Journal of pathology*. 2007;211(2):241-51.
52. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(1):a004978.
53. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*. 2003;55(12):1531-46.
54. Sandhu SV, Gupta S, Bansal H, Singla K. *Collagen in Health and Disease* 2012.
55. Parry DAD, Squire JM. *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*: Springer International Publishing; 2017.
56. Rucklidge GJ, Milne G, McGaw BA, Milne E, Robins SP. Turnover rates of different collagen types measured by isotope ratio mass spectrometry. *Biochimica et biophysica acta*. 1992;1156(1):57-61.
57. Jerome Rossert BdC. Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation. In: John P. Bilezikian LGR, Gideon A. Rodan, editor. *Principles of Bone Biology*. 1. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc; 2002. p. 189-210.

58. Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition : Text and Atlas: Text and Atlas: Mcgraw-hill; 2009.
59. Hulmes DJS. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In: Fratzl P, editor. Collagen: Structure and Mechanics: Springer US; 2008. p. 15-47.
60. Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *International journal of cosmetic science*. 2017;39(3):241-7.
61. He D, Miao M, Sitarz EE, Muiznieks LD, Reichheld S, Stahl RJ, et al. Polymorphisms in the human tropoelastin gene modify in vitro self-assembly and mechanical properties of elastin-like polypeptides. *PLoS One*. 2012;7(9):e46130.
62. Aziz J, Shezali H, Radzi Z, Yahya NA, Abu Kassim NH, Czernuska J, et al. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. *Skin pharmacology and physiology*. 2016;29(4):190-203.
63. Cleary EG, Sandberg LB, Jackson DS. The changes in chemical composition during development of the bovine nuchal ligament. *The Journal of cell biology*. 1967;33(3):469-79.
64. Albanna M, Holmes JH. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*: Elsevier Science; 2016.
65. Prydz K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules*. 2015;5(3):2003-22.
66. Lindahl U, Couchman J, Kimata K, Esko JD. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: rd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY)2015. p. 207-21.
67. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical biology & drug design*. 2008;72(6):455-82.
68. Pamela C. Champe RAH. *Biochemistry (Lippincott's Illustrated Reviews Series)*: Lippincott Williams and Wilkins 1994.
69. LC. JAnqueria JC. *Temel Histoloji*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
70. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in wound care*. 2016;5(3):119-36.
71. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
72. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
73. Geerligs M, Peters GW, Ackermans PA, Oomens CW, Baaijens FP. Linear viscoelastic behavior of subcutaneous adipose tissue. *Biorheology*. 2008;45(6):677-88.
74. Sbarbati A, Accorsi D, Benati D, Marchetti L, Orsini G, Rigotti G, et al. Subcutaneous adipose tissue classification. *European Journal of Histochemistry : EJH*. 2010;54(4):e48.
75. Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;53(4):671-83.
76. Nurnberger F, Muller G. So-called cellulite: an invented disease. *The Journal of dermatologic surgery and oncology*. 1978;4(3):221-9.
77. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity research*. 2003;11(1):5-16.

78. Markman B, Barton FE, Jr. Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plastic and reconstructive surgery*. 1987;80(2):248-54.
79. Gragnani A, Cornick SM, Chominski Vn, Noronha SMRd, Noronha SAACad, Ferreira LM. Review of Major Theories of Skin Aging. *Advances in Aging Research*. 2014;Vol.03No.04:20.
80. Gragnani A, Mac Cornick S, Chominski V, Ribeiro de Noronha S, Aparecida Alves Corrêa de Noronha S, Ferreira L. Review of Major Theories of Skin Aging 2014. 265-84 p.
81. Kim M, Jeong Park H. *Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation* 2016.
82. Ma YS, Wu SB, Lee WY, Cheng JS, Wei YH. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1790(10):1021-9.
83. Barja G. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(12):1420-45.
84. Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. *Endocrine*. 2006;29(1):27-32.
85. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2007;12(5):913-22.
86. Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment 2014. 860479 p.
87. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(24):11003-6.
88. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
89. Sugimoto M, Yamashita R, Ueda M. Telomere length of the skin in association with chronological aging and photoaging. *Journal of dermatological science*. 2006;43(1):43-7.
90. Orren DK. Werner syndrome: molecular insights into the relationships between defective DNA metabolism, genomic instability, cancer and aging. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:2657-71.
91. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiological reviews*. 2008;88(2):557-79.
92. Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(7):2205-10.
93. Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*. 2002;21(4):553-63.
94. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nature chemical biology*. 2007;3(10):640-9.
95. Yin B, Jiang X. Telomere shortening in cultured human dermal fibroblasts is associated with acute photodamage induced by UVA irradiation. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*. 2013;30(1):13-8.
96. Buckingham E, Klingelhutz A. The role of telomeres in the ageing of human skin 2011. 297-302 p.

97. Cong Y-S, Wright WE, Shay JW. Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66(3):407-25.
98. Warner HR. Is cell death and replacement a factor in aging? *Mechanisms of Ageing and Development*. 2007;128(1):13-6.
99. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007;47(1):143-83.
100. Pluijm SM, Visser M, Puts MT, Dik MG, Schalk BW, van Schoor NM, et al. Unhealthy lifestyles during the life course: association with physical decline in late life. *Aging clinical and experimental research*. 2007;19(1):75-83.
101. Fligiel SEG, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen Degradation in Aged/Photodamaged Skin In Vivo and After Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;120(5):842-8.
102. Borg M, Brincat S, Camilleri G, Schembri-Wismayer P, Brincat M, Calleja-Agius J. The role of cytokines in skin aging. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2013;16(5):514-21.
103. Landau M. Exogenous factors in skin aging. *Current problems in dermatology*. 2007;35:1-13.
104. Arnold SF, Price PS. Modeling mixtures resulting from concurrent exposures to multiple sources. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007;223(2):121-4.
105. Valacchi G, Sticozzi C, Pecorelli A, Cervellati F, Cervellati C, Maioli E. Cutaneous responses to environmental stressors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1271(1):75-81.
106. Nikolakis G, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin mirrors human aging. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2013;16(1):13-28.
107. Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1986;15(4 Pt 1):571-85.
108. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental dermatology*. 2002;11(5):398-405.
109. Lock-Andersen J, Therkildsen P, de Fine Olivarius F, Gniadecka M, Dahlstrom K, Poulsen T, et al. Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 1997;13(4):153-8.
110. Kligman LH. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clinics in geriatric medicine*. 1989;5(1):235-51.
111. Makrantonaki E, Zouboulis CC. William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. *Dermatology*. 2007;214(4):352-60.
112. Engelke M, Jensen JM, Ekanayake-Mudiyanselage S, Proksch E. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *The British journal of dermatology*. 1997;137(2):219-25.
113. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy/wound management*. 2006;52(9):24-35; quiz 6-7.
114. Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S, et al. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *The British journal of dermatology*. 2004;150(1):56-63.
115. Yaar M, Gilchrist BA. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clinical and experimental dermatology*. 2001;26(7):583-91.

116. Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Experimental gerontology*. 2001;36(1):29-54.
117. Gibson SJ, Farrell M. A review of age differences in the neurophysiology of nociception and the perceptual experience of pain. *The Clinical journal of pain*. 2004;20(4):227-39.
118. Monheit GD. Chemical peels. *Skin therapy letter*. 2004;9(2):6-11.
119. Glogau RG. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 1996;15(3):134-8.
120. Humbert P, Sainthillier JM, Mac-Mary S, Petitjean A, Creidi P, Aubin F. Capillaroscopy and videocapillaroscopy assessment of skin microcirculation: dermatologic and cosmetic approaches. *Journal of cosmetic dermatology*. 2005;4(3):153-62.
121. Li L, Mac-Mary S, Marsaut D, Sainthillier JM, Nouveau S, Gharbi T, et al. Age-related changes in skin topography and microcirculation. *Archives of dermatological research*. 2006;297(9):412-6.
122. Millis AJ, Hoyle M, McCue HM, Martini H. Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Experimental cell research*. 1992;201(2):373-9.
123. Gunin G, Kornilova NK, Petrov VV, Vasilyeva OV. Age changes in the number and proliferation of fibroblasts in the human skin. *Advances in Gerontology*. 2011;1(4):299-303.
124. Ghersetich I, Lotti T, Campanile G, Grappone C, Dini G. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *International journal of dermatology*. 1994;33(2):119-22.
125. Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M. Elastic fiber during development and aging. *Microscopy Research and Technique*. 1997;38(4):428-35.
126. Oikarinen A. The aging of skin: chronoaging versus photoaging. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 1990;7(1):3-4.
127. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical interventions in aging*. 2006;1(4):327-48.
128. Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(6):1432-40.
129. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental gerontology*. 2000;35(3):307-16.
130. Krutmann J. Skin Aging. In: Jean Krutmann PH, editor. *Nutrition for Healthy Skin*. 1: Springer-Verlag berlin Heidelberg; 2011. p. 15-24.
131. Zouboulis CC, Boschnakow A. Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. *Clinical and experimental dermatology*. 2001;26(7):600-7.
132. Gunin AG, Petrov VV, Vasilieva OV, Golubtsova NN. Age-related changes of blood vessels in the human dermis. *Advances in Gerontology*. 2015;5(2):65-71.
133. Chung JH, Eun HC. Angiogenesis in skin aging and photoaging. *The Journal of dermatology*. 2007;34(9):593-600.
134. Kajiya K, Kim YK, Kinemura Y, Kishimoto J, Chung JH. Structural alterations of the cutaneous vasculature in aged and in photoaged human skin in vivo. *Journal of dermatological science*. 2011;61(3):206-8.

135. Sawane M, Kajiya K. Ultraviolet light-induced changes of lymphatic and blood vasculature in skin and their molecular mechanisms. *Experimental dermatology*. 2012;21 Suppl 1:22-5.
136. Kruglikov IL, Scherer PE. Skin aging: are adipocytes the next target? *Aging (Albany NY)*. 2016;8(7):1457-69.
137. Holck DE, Ng JD. Facial skin rejuvenation. *Current opinion in ophthalmology*. 2003;14(5):246-52.
138. R. Cohen, Ryan C. Frank, Ross EV. Facial skin resurfacing. In: Neligan P, Warren RJ, editors. *Plastic Surgery Third Edition*. 2: Saunders; 2012. p. 60-77.
139. D. MG. Skin Rejuvenation Procedures. In: Miloro M, editor. *Peterson's Principles of Oral and maxillofacial Surgery*. 2. London: BC Decker Inc.; 2004. p. 1419-33.
140. Rzany B, Zielke H. Overview of Botulinum Toxin. In: de Maio M, Rzany B, editors. *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 1-9.
141. Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000;43(2 Pt 1):249-59.
142. Smith TJ, Hill KK, Raphael BH. Historical and current perspectives on *Clostridium botulinum* diversity. *Research in microbiology*. 2015;166(4):290-302.
143. Baumann L, Slezinger A, Vujevich J, Halem M, Bryde J, Black L, et al. A double-blinded, randomized, placebo-controlled pilot study of the safety and efficacy of Myobloc (botulinum toxin type B)-purified neurotoxin complex for the treatment of crow's feet: a double-blinded, placebo-controlled trial. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2003;29(5):508-15.
144. Small R. Botulinum toxin injection for facial wrinkles. *American family physician*. 2014;90(3):168-75.
145. Funt D, Pavicic T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2013;6:295-316.
146. Won Ki Lee DYY. Classification of Soft Tissue Filler. In: Won Ki Lee DYY, editor. *Penile Augmentation*. 1 ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2016. p. 71-82.
147. Tabata Y. Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(1):70-80.
148. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;118(6):147e-59e.
149. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American journal of sports medicine*. 2009;37(11):2259-72.
150. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2004;62(4):489-96.
151. Gündeslioğlu A.Ö AZ, İnce B, Dadacı M, Aktan M, Duman S. . Adipose Tissue Derived Stem Cells and Their Uses in Plastic Surgery. *Turkish Journal of Plastic Surgery*. 2013;3.
152. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research*. 2008;19(1):42-6.
153. Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dental implantology update*. 2000;11(3):17-21.

154. Kim ES, Kim JJ, Park EJ. Angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma enhances in vivo bone formation around alloplastic graft material. *The journal of advanced prosthodontics*. 2010;2(1):7-13.
155. Liao HT, Marra KG, Rubin JP. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2014;20(4):267-76.
156. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;85(6):638-46.
157. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, L Dohan S, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing 2006. e56-60 p.
158. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;101(3):e37-44.
159. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(2).
160. Anitua E, Sanchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(7-8):741-52.
161. Romanos GE, Strub JR. Effect of Tissucol on connective tissue matrix during wound healing: an immunohistochemical study in rat skin. *Journal of biomedical materials research*. 1998;39(3):462-8.
162. Ehrbar M, Metters A, Zammaretti P, Hubbell JA, Zisch AH. Endothelial cell proliferation and progenitor maturation by fibrin-bound VEGF variants with differential susceptibilities to local cellular activity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2005;101(1-3):93-109.
163. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;108(5):707-13.
164. Rigotti G, Charles-de-Sa L, Gontijo-de-Amorim NF, Takiya CM, Amable PR, Borojevic R, et al. Expanded Stem Cells, Stromal-Vascular Fraction, and Platelet-Rich Plasma Enriched Fat: Comparing Results of Different Facial Rejuvenation Approaches in a Clinical Trial. *Aesthetic surgery journal*. 2016;36(3):261-70.
165. Kontis TC, Rivkin A. The history of injectable facial fillers. *Facial plastic surgery : FPS*. 2009;25(2):67-72.
166. Donofrio LM. Techniques in facial fat grafting. *Aesthetic surgery journal*. 2008;28(6):681-7.
167. Kaufman MR, Miller TA, Huang C, Roostaeian J, Wasson KL, Ashley RK, et al. Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art? *Plastic and reconstructive surgery*. 2007;119(7):2287-96.
168. Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, et al. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *The breast journal*. 2010;16(2):169-75.
169. Kotaro yoshimura HE, Harinosuke kato, Kentaro doi, Hirotaka Suga. Adipose stem cells: from liposuction to adipose tissue engineering. In: Yves-Gerard Illouz AS,

editor. *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*. 1: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p. 67-81.

170. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plastic and reconstructive surgery*. 2009;124(4):1087-97.

171. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus*. 2015;4:713.

172. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*. 2010;5(2):103-10.

173. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discovery medicine*. 2011;11(57):160-70.

174. Frazier TP, Gimble JM, Kheterpal I, Rowan BG. Impact of low oxygen on the secretome of human adipose-derived stromal/stem cell primary cultures. *Biochimie*. 2013;95(12):2286-96.

175. Moon KM, Park YH, Lee JS, Chae YB, Kim MM, Kim DS, et al. The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(1):1239-57.

176. 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 engineering*. 2001;7(2):211-28.

177. Ude CC, Sulaiman SB, Min-Hwei N, Hui-Cheng C, Ahmad J, Yahaya NM, et al. Cartilage regeneration by chondrogenic induced adult stem cells in osteoarthritic sheep model. *PLoS One*. 2014;9(6):e98770.

178. Naderi N, Wilde C, Haque T, Francis W, Seifalian AM, Thornton CA, et al. Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells in 3-dimensional spheroid cultures (microtissue): implications for the reconstructive surgeon. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2014;67(12):1726-34.

179. Kato H, Mineda K, Eto H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, et al. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3 months. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014;133(3):303e-13e.

180. 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. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(5):1081-92.

181. Alabdulkarim Y, Ghalimah B, Al-Otaibi M, Al-Jallad H, Mekhael M, Willie B, et al. Recent advances in bone regeneration: The role of adipose tissue-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells. *Journal of Limb Lengthening & Reconstruction*. 2017;3(1):4-18.

182. Evans CH, Palmer GD, Pascher A, Porter R, Kwong FN, Gouze E, et al. Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical, and economical. *Tissue engineering*. 2007;13(8):1987-93.

183. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic plastic surgery*. 2008;32(1):48-55; discussion 6-7.

184. Lin SD, Huang SH, Lin YN, Wu SH, Chang HW, Lin TM, et al. Engineering adipose tissue from uncultured human adipose stromal vascular fraction on collagen matrix and gelatin sponge scaffolds. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(11-12):1489-98.

185. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
186. Savi M, Bocchi L, Fiumana E, Karam JP, Frati C, Bonafe F, et al. Enhanced engraftment and repairing ability of human adipose-derived stem cells, conveyed by pharmacologically active microcarriers continuously releasing HGF and IGF-1, in healing myocardial infarction in rats. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2015;103(9):3012-25.
187. 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 engineering*. 2006;12(12):3375-82.
188. Di Rocco G, Gentile A, Antonini A, Ceradini F, Wu JC, Capogrossi MC, et al. Enhanced healing of diabetic wounds by topical administration of adipose tissue-derived stromal cells overexpressing stromal-derived factor-1: biodistribution and engraftment analysis by bioluminescent imaging. *Stem cells international*. 2010;2011:304562.
189. Flores AI, Gomez-Gomez GJ, Masedo-Gonzalez A, Martinez-Montiel MP. Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: A promising therapeutic strategy? *World journal of stem cells*. 2015;7(2):343-51.
190. Szoke K, Brinckmann JE. Concise review: therapeutic potential of adipose tissue-derived angiogenic cells. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(9):658-67.
191. Cardoso AL, Bachion MM, Morais JM, Fantinati MS, Almeida VL, Lino RSJ. Adipose tissue stromal vascular fraction in the treatment of full thickness burns in rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2016;31(9):578-85.
192. Shin SH, Yun TK, Han SK, Jeong SH, Dhong ES, Kim WK. Comparison of the Matrix Synthesizing Abilities of Human Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Fibroblasts. *The Journal of craniofacial surgery*. 2015;26(4):1246-50.
193. 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.
194. Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell regeneration*. 2015;4:7.
195. Lockhart RA HC, Aronowitz JA Tissue Dissociation Enzymes for Adipose Stromal Vascular Fraction Cell Isolation: A Review. *Journal of Stem Cell research and Therapy*. 2015;5(12).
196. Aronowitz JA, Ellenhorn JD. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;132(6):932e-9e.
197. Raposio E, Caruana G, Bonomini S, Libondi G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014;133(6):1406-9.
198. Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, Chem EM, Milani AR, Ely PB, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnology letters*. 2014;36(4):693-702.

199. Baptista LS, do Amaral RJ, Carias RB, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*. 2009;11(6):706-15.
200. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World journal of stem cells*. 2014;6(3):256-65.
201. Bowler PJ. Impact on facial rejuvenation with dermatological preparations. *Clinical interventions in aging*. 2009;4:81-9.
202. Moravvej H, Barikbin B, Alireza Ghavam S, Karimi S. Nonablative Fractional Laser Resurfacing 2009.
203. Oh SH, Lee Y, Seo YJ, Lee JH, Yang JD, Chung HY, et al. The potential effect of botulinum toxin type A on human dermal fibroblasts: an in vitro study. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2012;38(10):1689-94.
204. Klein AW. Techniques for soft tissue augmentation: an 'a to z'. *American journal of clinical dermatology*. 2006;7(2):107-20.
205. Woo Young Cho HWC, Dong Won Lee. Complications of Injectable Soft Tissue Filler. *Archives of Aesthetic Plastic Surgery*. 2015;21(1):1-6.
206. Jun Jeon H, Kyu Kim D, Woo Lee J, Young Choi K, Yun Chung H, Chae Cho B, et al. The Feasibility of Platelet-Rich Fibrin Matrix Filler in a Nude Mouse Model 2017. 135 p.
207. Hui Q, Chang P, Guo B, Zhang Y, Tao K. The Clinical Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma Combined with Ultra-Pulsed Fractional CO(2) Laser Therapy for Facial Rejuvenation. *Rejuvenation Research*. 2017;20(1):25-31.
208. Ardakani MR, Moein HP, Beiraghdar M. Tangibility of platelet-rich fibrin matrix for nasolabial folds. *Advanced Biomedical Research*. 2016;5:197.
209. Loesch MM, Somani A-K, Kingsley MM, Travers JB, Spandau DF. Skin resurfacing procedures: new and emerging options. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2014;7:231-41.
210. O'Connor AA, Lowe PM, Shumack S, Lim AC. Chemical peels: A review of current practice. *The Australasian journal of dermatology*. 2017.
211. Perkins SW. Complications of chemical face peeling: prevention and management. *Facial plastic surgery : FPS*. 1995;11(1):39-46.
212. Textor J. Platelet-Rich Plasma (PRP) as a Therapeutic Agent: Platelet Biology, Growth Factors and a Review of the Literature. In: Lana JFSD, Santana MHA, Belangero WD, Luzo ACM, editors. *Platelet-Rich Plasma*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014. p. 61-94.
213. Li Q, Pan S, Dangaria SJ, Gopinathan G, Kolokythas A, Chu S, et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:638043.
214. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clinical oral investigations*. 2017;21(8):2619-27.
215. Kang YJ, Zheng L. Rejuvenation: an integrated approach to regenerative medicine. *Regenerative Medicine Research*. 2013;1(1):7.
216. Rotunda AM, Kolodney MS. Mesotherapy and phosphatidylcholine injections: historical clarification and review. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2006;32(4):465-80.
217. Sivagnanam G. Mesotherapy – The french connection. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2010;1(1):4-8.

218. Mourao CF, Valiense H, Melo ER, Mourao NB, Maia MD. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*. 2015;42(6):421-3.
219. Alperovich M, Lee ZH, Friedlander PL, Rowan BG, Gimble JM, Chiu ES. Adipose stem cell therapy in cancer reconstruction: a critical review. *Annals of plastic surgery*. 2014;73 Suppl 1:S104-7.
220. Ali Emre Aksu MÇ. Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücreler ve Stromal Vasküler Fraksiyon Konsepti. *Türkiye Klinikleri*. 2015;4(3):19-26.
221. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2014;69(Suppl_1):S4-S9.
222. Zhuang Y, Lyga J. Inflammaging in Skin and Other Tissues - The Roles of Complement System and Macrophage. *Inflammation & Allergy Drug Targets*. 2014;13(3):153-61.
223. L Of A, Alexander R. Understanding Adipose-derived Stromal Vascular Fraction (AD-SVF) Cell Biology and Use on the Basis of Cellular, Chemical, Structural and Paracrine Components: A Concise Review 2012.
224. Bowles AC, Wise RM, Gerstein BY, Thomas RC, Ogelman R, Febbo I, et al. Immunomodulatory Effects of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells Promote Alternative Activation Macrophages to Repair Tissue Damage. *Stem cells*. 2017;35(10):2198-207.
225. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clinics in plastic surgery*. 2001;28(1):111-9.
226. 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. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2005;31(11 Pt 2):1506-10.
227. 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. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018;141(2):232e-43e.
228. Chaput B, Bertheuil N, Escubes M, Grolleau JL, Garrido I, Laloze J, et al. Mechanically Isolated Stromal Vascular Fraction Provides a Valid and Useful Collagenase-Free Alternative Technique: A Comparative Study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2016;138(4):807-19.
229. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS, Hicok KC. Clinical Safety of Stromal Vascular Fraction Separation at the Point of Care. *Annals of plastic surgery*. 2015;75(6):666-71.
230. Amirkhani MA, Mohseni R, Soleimani M, Shoaee-Hassani A, Nilforoushzadeh MA. A rapid sonication based method for preparation of stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells from fat tissue. *BioImpacts : BI*. 2016;6(2):99-104.