

TC
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

YAĞ DOKUSU KAYNAKLI KÖK HÜCRELER VE TROMBOSİT
ZENGİN PLAZMANIN KOMBİNE KULLANIMININ YAĞ GREFTİ
YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr.NEVRA SEYHAN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. NEDİM SAVACI

KONYA

2011

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	ii
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	4
Yağ Doku:	4
Trombositlerin Genel Özellikleri:	9
Trombosit Zengin Plazma:	11
Kök Hücre	13
Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları:	21
GEREÇ VE YÖNTEM	23
Kök Hücrelerin Elde Edilmesi:.....	23
Kök Hücrelerin Pasajı:.....	27
Boyama:.....	28
Trombosit Zengin Plazma Hazırlanması:	29
CERRAHİ TEKNİK:.....	30
DEĞERLENDİRME:	36
1. Ağırlık ve Volüm Değerlendirmesi:	37
2. Histolojik Değerlendirme:	37
3. ELİSA ile Büyüme Faktörü Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi	39
4. Flörosan Mikroskop İle Değerlendirme.	40
5. İstatistiksel Değerlendirme.	40
BULGULAR	42
Ağırlık ve Volüm Değerlendirme Bulguları:.....	42
Histoloji Değerlendirme Bulguları:	46
ELİSA Testi Değerlendirme Bulguları:.....	52
Flörosan Mikroskopi Görüntüleme Bulguları:	54
TARTIŞMA	55
SONUÇ	61
ÖZET.....	62
ABSTRACT	63
KAYNAKLAR.....	64
TEŞEKKÜR.....	73

KISALTMALAR

WAT :Beyaz yağ doku

BAT :Esmer yağ doku

SVF : Stromal vasküler fraksiyon

EKH : Embryonik kök hücre

YKH : Yetişkin kök hücre

HKH : Hematopoetik kök hücre

MKH : Mezenkimal kök hücre

PBS :Fosfat tamponlu salin

YDKH: Yağ dokusu kaynaklı kök hücre

TZP : Trombosit zengin plazma

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

PDGF :Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

TGF β : Transforming büyüme faktörü

HE : Hematoksilen Eozin

FBS : Fetal sığır serumu

GİRİŞ

Otolog yağ 100 yılı aşkın süredir yumuşak doku defektlerinin düzeltilmesinde dolgu materyali olarak kullanılmaktadır. Yağ grefti uygulamaları; paralize vokal kordların augmentasyonu (1,2), spinal dura onarımı (3), HIV hastalarında fasyal yapılandırma (4) gibi rekonstrüktif tedavilerden meme augmentasyonu (5) ile el ve yüz gençleştirme (6,7) gibi kozmetik girişimlere kadar çeşitlilik göstermektedir.

Otolog yağ enjeksiyonu tekniği fasyal lipodistrofi tedavisinde, nazolabial çöküntülerin, deprese skarların, posttravmatik defektlerin augmentasyonunda, dudakların büyütülmesinde (8) ve baş boyun bölgesinde destrüktif cerrahi sonrası oluşan defektlerin rekonstrüksiyonunda geniş kullanım alanı bulmuştur. Yağ greftleri deprese ve irregüler alanların düzeltilmesi için subkutan enjekte edilir. Kolay uygulanabilir bir teknik ve donör alan morbiditesinin minimal olması nedeniyle plastik cerrahlar tarafından kabul görmüş bir uygulamadır. Günümüzde yağ enjeksiyonu orta yüz germe, augmentasyon malarplastisi ve protezle çene augmentasyonuna alternatiftir (9).

Yumuşak doku rekonstrüksiyonunda standart yaklaşımlar; otolog doku flepleri, otolog yağ transplantasyonu ve alloplastik implantlardır. İmplant uygulamalarına enfeksiyon, kapsül kontraktürü, materyal ekspozisyonu, implant migrasyonu ve yabancı cisim reaksiyonu gibi komplikasyonlar eşlik etmektedir. Otolog yağ doku en uygun ve doğal kalıcı yumuşak doku dolgu materyali olması sebebiyle plastik cerrahların ilgisini çekmektedir.

Otolog yağ kollajen, hyaluronik asit, silikon ve diğer dolgu maddeleri ile karşılaştırıldığında maliyetinin düşük olması, kolay elde edilebilir olması, immunolojik ya da alerjik reaksiyona yol açmaması gibi avantajlara sahiptir (10).

Ancak transplante edilen yağın yaşayabilirlik oranı düşüktür. Yağ doku çok çabuk rezorbe olarak yerini fibröz doku ve yağ kistleri alır. Transplantasyondan sonra greft volümünün %20-50'si kayba uğramaktadır (11). Greft kaybına neden olan mekanizma transplante olan yağda yeterli revaskularizasyon olmamasıdır. Eğer transplantasyon sonrası zamanında revaskularizasyon olmazsa iskemi nedeniyle hücreler ölür ve erken dönemde doku nekrozu ve greft kaybına yol açar. Transplantasyon sonrası erken dönemde neovaskularizasyonun artırılması ile otolog yağ transplantasyonunun etkinliğinin yağ nekrozuna bağlı absorpsiyon ve fibrosis nedeniyle azalmasının önüne geçilecektir (12).

Kök hücre araştırmalarındaki son gelişmeler mezenkimal kök hücre (13), yağ doku kaynaklı kök hücre ve endotelyal progenitor hücrelerin iskemik dokularda revaskularizasyonu arttırdığını kanıtlamıştır (14).Transplante yağda revaskularizasyon gerçekleşikten sonra bile apoptoz yoluyla greftin volum kaybı devam etmektedir (15). Yağ greftinin yaşayabilirliği rezorpsiyon nedeniyle sınırlı olduğu için alıcı bölgede uygun volüm ve konturu sağlamak üzere başlangıçta overkoreksiyon yapmak ve sonrasında multiple operasyonlar gerekmektedir (16,17). Erken postoperatif dönemde yüz güldürücü sonuçlar alınsa da uzun dönem sonuçlar hem cerrahlar hem de hastalar için hayal kırıklığıdır.

Greft yaşayabilirlik oranlarının artırılmasına yönelik birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır. Bunlar; yağ eldesinde atravmatik liposuction tekniklerini (18,19), ve grefte bazı maddeler eklenmesini içermektedir(20,21).

Büyüme faktörleri otolog yağ greftlerinin volümünü arttırmak ve yaşayabilirliğini uzatmak için önerilen biyolojik ajanlardır. Bu bağlamda alfa granüllerinde trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF),insulin benzeri büyüme faktörü(IGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF),transforming büyüme faktörü(TGF β) depolayan trombositler büyüme

faktörlerinin doğal kaynağı olarak kullanılabilir. Trombosit zengin plazma(TZP);doku onarımı ve rejenerasyonunu arttıran yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü ve bioaktif proteinler içermektedir.

Trombosit zengin plazma içindeki büyüme faktörleri greftteki prekürsör adipositlerin matür formlarına farklılaşmasında rol oynar. Yağ greftine büyüme faktörlerinin eklenmesi adipoz prekürsör hücrelerin farklılaşma ve çoğalmasını stimüle ederek greft volümünü korumaktadır (22).

Mezenkimal kök hücrelerle birlikte Trombosit zengin plazmanın doku rejenerasyonunu arttırdığı kanıtlanmıştır (23). In vivo olarak Yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerden yağ doku rejenerasyonu için uygun taşıyıcı ve adipojenik indüksiyon yapan ajanların kombine kullanılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı; yağ doku kaynaklı kök hücre ve trombosit zengin plazmanın kombine kullanımının yağ grefti yaşayabilirliği üzerine etkisinin deneysel olarak araştırılmasıdır.

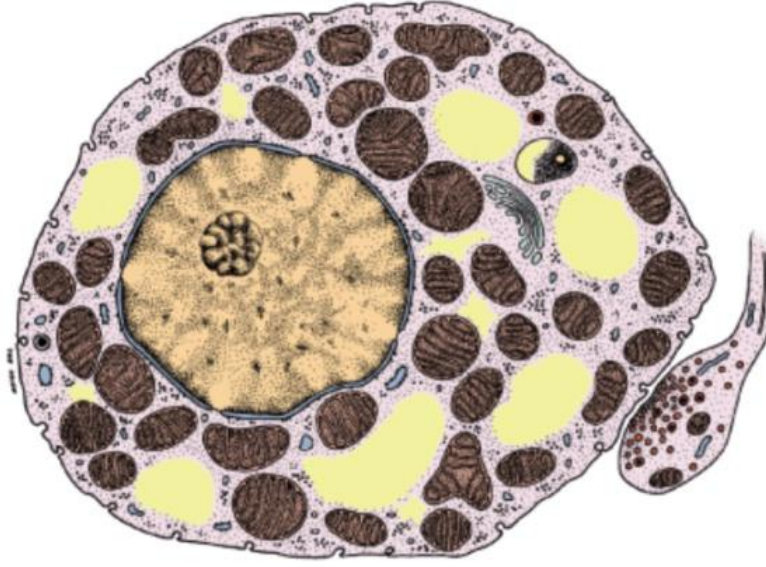
GENEL BİLGİLER

Yağ Doku:

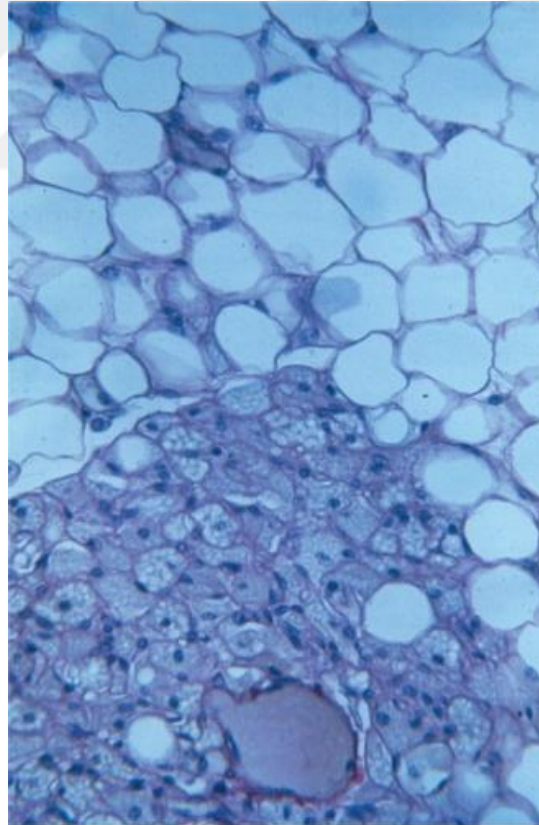
Yağ doku, deri altında (subkutan yağ), iç organların çevresinde (viseral yağ), kemik iliğinde ve meme dokusunda bulunur. İnsanlarda vücut kitlesinin en azından %4'ünü oluşturur. Yağ doku iki farklı formda bulunur. Beyaz yağ doku (WAT) ve esmer yağ doku (BAT). Her iki yağ doku tipinde lokalizasyon, yapısal özellik, renk ve patolojik karakteristikler açısından farklılık göstermektedirler. Yağ dokunun sadece 1/3'ü matür adipositleri içerir. Adiposit dışındaki hücreleri stromal vasküler fraksiyonda (SVF) bulunmaktadır. SVF 'de bulunan hücreler kan damarları (endotel hücreleri), kök hücreler, preadipositler ve fibroblastlardır ve yağ dokunun geriye kalan 2/3'ünü oluştururlar (24).

Multiloküler yağ doku renginden dolayı esmer yağ doku olarak bilinir. Esmer renk bu dokuda çok sayıda kapiller ve sitokrom içeren çok sayıda mitokondri bulunmasından kaynaklanır. Esmer yağ doku vücutta sınırlı dağılım gösterir. Sıçanlarda ve bazı memelilerde sadece omuz etrafında bulunur. İnsanda postnatal hayatın ilk aylarında önemlidir. Isı üretimi sağlayarak yenidoğanı soğuktan korur. Erişkin dönemde sayısı oldukça azalır.

Morfolojik olarak kahverengi adipositler multiloküler lipid inklüzyonları ve çok sayıda iyi gelişmiş mitokondrileri ile tek, büyük lipid inklüzyonu ve az sayıda mitokondri ile karakterize beyaz adipositlerden ayrılırlar (25). Multiloküler yağ doku hücreleri poligonal ve uniloküler yağ doku hücrelerinden daha küçüktür. Her bir lipid damlacığı sitozolle doğrudan temas halindedir ve bir sitomembran ile çevrili değildir (Şekil 1A-B).

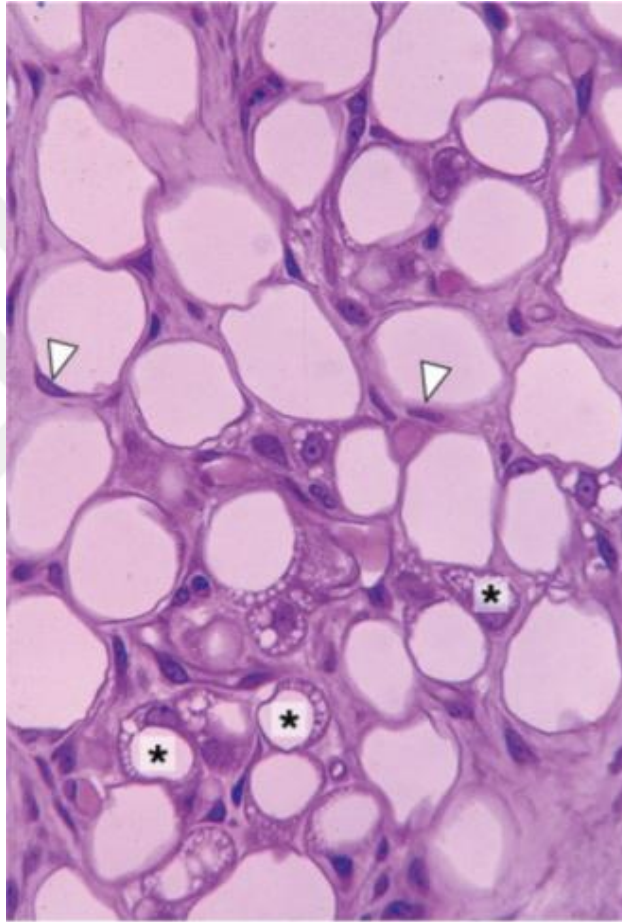


Şekil 1- A:Multiloküler yağ doku. Multipl yağ damlaları ve mitokondriler. Sağ altta sempatik sinir sonlanması gösterilmiştir..(Junqueira L. C. Ve Carneiro J Basic Histology10th ed. McGraw-Hill, New York, Chapter 6) (97)



Şekil 1-B:Santral sferik çekirdek ile karakterize multiloküler yağ doku.(Junqueira LC Carneiro J. Basic Histology10th ed. McGraw-Hill, New York, Chapter 6,2003) (97)

Uniloküler hücreler hücre çekirdeğini plazma membranına doğru iten tek ve büyük bir yağ damlası içererek hücreye yüzük şeklini verir. Uniloküler hücreler beyaz yağ doku için karakteristiktir, çapları 50–150 μm arasında değişir. Rutin histolojik teknikler kullanılarak alkol ve xylol ile yağ damlacıkları uzaklaştırıldığında standart mikroskop preparatlarında yağ hücreleri yüzük şeklinde görülmektedir.(Şekil 1C).



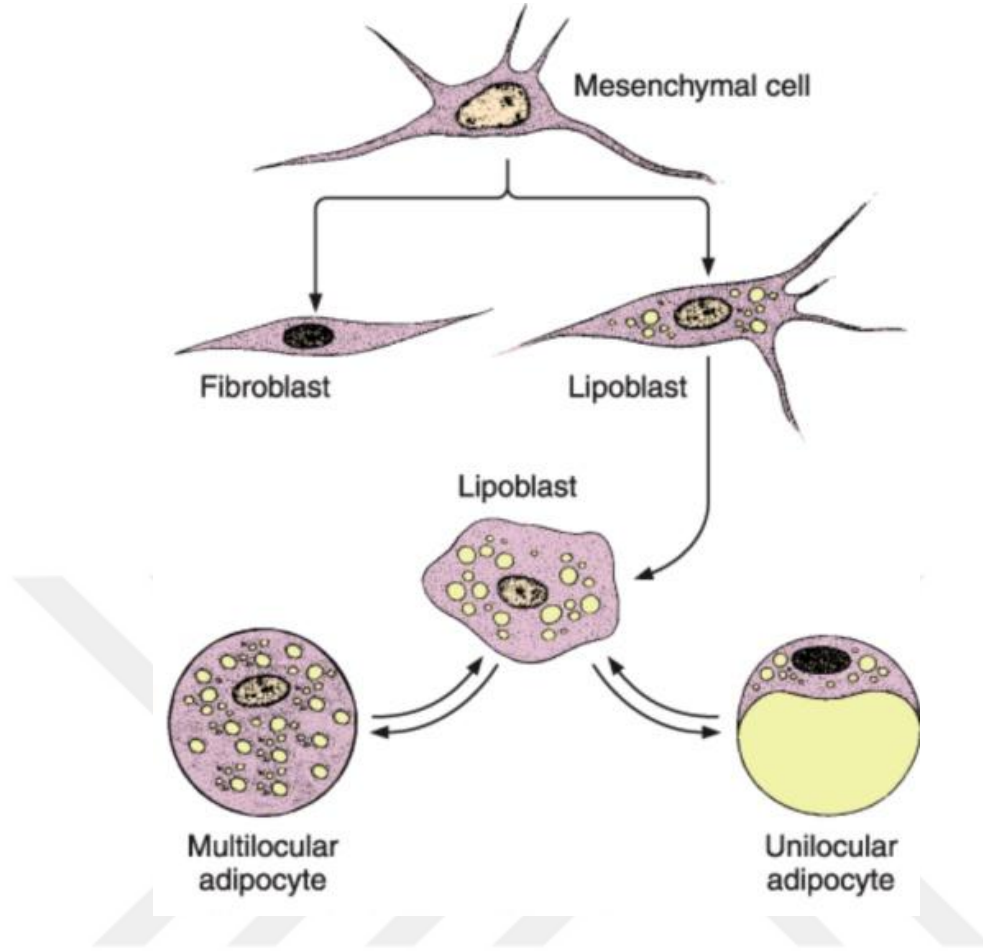
Şekil 1-C: Uniloküler yağ doku. Oklar yağ hücrelerinin çekirdeğini göstermektedir.(Junqueira LC Carneiro J. Basic Histology10th ed. McGraw-Hill, New York, Chapter 6,2003) (97)

Hem beyaz hem de kahverengi yağ dokusu sempatik sinir sisteminin noradrenerjik lifleri ile innerve olur (26).Uniloküler yağ dokuda sinir sonlanmaları sadece kan damarlarının duvarlarında bulunur, adipositler direkt olarak inerve olmaz. Norepinefrin salınımı hormon duyarlı lipazı aktive eder. Bu inervasyon yağ mobilizasyonunda önemli rol oynar. Vucudun ihtiyacı olduğunda lipidler her bölgeden aynı oranda mobilize olmaz. Subkutan, mezenterik ve retroperitoneal dokular ilk planda mobilize olurken; el, ayak ve retroorbital bölgedeki yağ doku uzun süren açlığa bile direnç gösterir. Uzun süren açlıktan sonra uniloküler yağ doku yağ içeriğinin tamamına yakını kaybeder ve çok az sayıda yağ damlacığı içeren polihedral hücrelerden oluşur.

WAT ile karşılaştırıldığında BAT kapillerlerden oluşan daha zengin damarsal yapı içerir (27). Yağ doku visceral ve subkutan olmak üzere ikiye ayrılır. Subkutan yağ dokuda süperfisyel ve derin olarak iki farklı tabakadan oluşur. Avuç içi ve ayak tabanında bulunan subkutan yağ doku şok absorban olarak görev yapar.

Viseral yağ doku ise intraperitoneal ve retroperitoneal kompartmanlara ayrılmıştır. Subkutan ve visceral kompartmanlara ek olarak WAT; kalp, böbrek ve genital gibi organların çevresinde de az miktarda bulunur (28).Sadece gözkapakları, penis, skrotum ve lobül hariç dış kulak aurikulasında bulunmaz. Yağ dokunun vücutta dağılımı yaşa ve cinsiyete bağlıdır. Kahverengi yağ vücutta boyun, omuzlar, perirenal ve paraaortik bölgelerde bulunur. Lipokrom pigmenti ve sitokromca zengin bol mitokondrionlar kahverengimsi rengi verir. Beyaz yağ dokunun sarımsı rengi hücredeki yağ damlaları içinde çözünen karotenoidlerin varlığına bağlıdır.

Yağ dokusu embriyolojik olarak mezenkim kaynaklıdır(**Şekil 1-D**).



Şekil1-D:Yağ hücrelerinin gelişimi. Farklılaşmamış mezenkimal hücreler yağ depolayan lipoblastlara dönüşerek olgun yağ hücrelerini oluşturur.(Junqueira LC Carneiro J. Basic Histology10th ed. McGraw-Hill, New York, Chapter 6,2003) (97)

Yağ dokusu hücreleri lipoblastlardan gelişirler. Bu hücreler fibroblastları andırırlar ama stoplazmalarında yağ depolayabilirler. Yağ hücreleri(adipositler) hacimlerinin yaklaşık %80-95'i kadar trigliserit depo edecek şekilde değişime uğramış fibroblastlardan ibarettir.

Beyaz yağ dokusunun ağırlığının yaklaşık %60-85'i lipid; bununda %90-99'u trigliseriddir. Olgun adipositler tarafından lipidlerin birikimi ve salınımı başlıca 3 hormon ile düzenlenir: İnsülin, katekolaminler ve prostaglandinler.

İnsan yağ deposu ile doğan birkaç memeliden biridir ve gebelik sürecinin 30. haftasında yağ depolamaya başlar. Fetusta primer yağ oluşumu kahverengi yağdır. Doğumdan sonra

genellikle farklılaşmamış mezenkim hücrelerinin bulunduğu küçük damarların etrafında sınırlı bir süre için beslenme ve diğer etkenler yağ hücrelerinin sayıca artışına neden olabilir ancak sonrasında hücre sayısında bir artış görülmez. Bu hücreler sadece gereğinden fazla kalorili beslenilirse lipid miktarını arttıırırlar (24).Erken dönemde adiposit sayısında meydana gelen bu artış, bireyin hayatının ilerleyen yıllarında obesiteye eğilim göstermesine neden olabilir.

Çok miktarda yağ vücutta başlıca iki dokuda, yağ dokusu ve karaciğerde birikir. Beyaz adipositlerin primer fonksiyonu enerji fazlasını lipid şeklinde depolamak daha sonra metabolik ihtiyaca yanıt olarak diğer dokulara mobilize etmektir. Kahverengi yağ dokusu hücrelerinin ana görevi ısı meydana getirmektir. Bu dokunun mitokondrilerinin iç zarlarında termojenin adı verilen bir protein vardır. termojenin, mitokondri zarları arasına önceden taşınmış protonların ATP sentetaz sisteminden geçmeksizin geri akışlarını sağlar. Proton akışından doğan enerji ATP sentezi için kullanılmaz ama ısı olarak harcanır (25).

Ayrıca yağ doku bazı polipeptidler, leptin, resistin gibi hormonlar, TNF α gibi sitokinleri sekrete eden endokrin bir organ gibi de davranır. Adipositlerden salgılanan leptin 16 kDa'lık bir protein olup ob geni tarafından kodlanır. İştah ve enerji ile ilgili hipotalamik hedef bölgeler üzerine etki eder. Yağ doku vücutta erişkin kök hücrelerin en zengin kaynağıdır ve doku onarımı ve rejenerasyonunda ümit vaat etmektedir.

Trombositlerin Genel Özellikleri:

Trombositler kemik iliğinde oluşur. Yuvarlak ya da oval şekillidir. Yaklaşık 2 μ m çapındadır. Trilaminar hücre membranına sahiptir, çekirdek içermez fakat mitokondri, mikrotübül ve granül(alfa, lambda, delta) içerir (29). Her trombositte yaklaşık 50–80 adet α granül bulunur. Çapları yaklaşık 200–500 nm' dir ve 30' un üzerinde bioaktif protein içerir

(30). Submembran bölgesinde morfolojik değişikliklere aracılık eden aktin ve miyozin mikroflamanları bulunur. Vücutta herhangi bir zamanda dalakta lokalize olarak bulunur ve periferik dolaşıma geçtikten sonra ortalama 8–10 gün yaşarlar. Normalde kanda trombosit sayısı 150000–350000 μ /lt arasında değişmektedir (31).

Dolaşımda bulunan trombositlerin alfa-granüllerindevasküler endotelyal büyüme faktörü

(VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü(PDGF), transforming büyüme faktörü (TGF β), Fibroblast büyüme faktörü(bFGF), epidermal büyüme faktörü (EGF),insulin benzeri büyüme faktörü(IGF) gibi pek çok büyüme faktörü depolanmış durumdadır.Büyüme faktörleri alfa granüllerde zimojen halde depolanmıştır.

Büyüme faktörleri lokal ve sistemik etkileri olan biolojik mediatörlerdir. Çeşitli uyarılara karşı trombosit aktivasyonu olduğunda α granüller hücre membranı ile birleşir(degranülasyon).Histon ve karbonhidrat yan zincirlerinin eklenmesiyle sekretuar proteinler bioaktif forma dönüşür. Aktif proteinler daha sonra hedef hücrelerin(mezenkimal kök hücre, osteoblast, fibroblast, endotel hücresi ve epidermal hücre) transmembran reseptörlerine bağlanır. Transmembran reseptörleri hücre içi sinyal proteinini aktive ederek hücresel proliferasyon, matriks oluşumu, osteoid üretimi ve kollajen sentezi gibi olayları yöneten gen ekspresyonuna neden olur (32,33).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü molekülü hücre membranındaki reseptörlere bağlanınca sitoplazmadaki yüksek enerjili fosfat bağı içeren bir sinyal proteini aktive olur ve bu sinyal iyileşmede görevli hücrelerin çoğalmasına, angiogeneze, kollajen, fibronektin, hyaluronik asit üretilmesine aracılık eder. PDGF makrofajlar için kemotaktik etkilidir ve mezenkimal hücreler için mitojendir. TGF β ve IGF kemotaksi, kök hücre ve osteoblastlar

için mitogenez, angiogenez, kemik matriks oluşumu ve kollajen sentezinde görevlidir (34,35). PDGF ve TGF β ayrıca kemik mineralizasyonuna yardım ederler (36).

Adeziv proteinler(fibrinojen, fibronectin, vitronectin, trombospodin-1) ise trombus oluşumuna katkıda bulunur (37). VEGF ve EGF'nin de angiogenez, bazal membran oluşumu ve endotel farklılaşması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Lizozomlarda proteolitik ve asit hidrolaz enzimleri bulunur. Delta granüller ise adenosin di fosfat, tromboxane A2 ve serotonin içerir (38). (Tablo 1)

Tablo1: Trombosit granüllerinin içerikleri

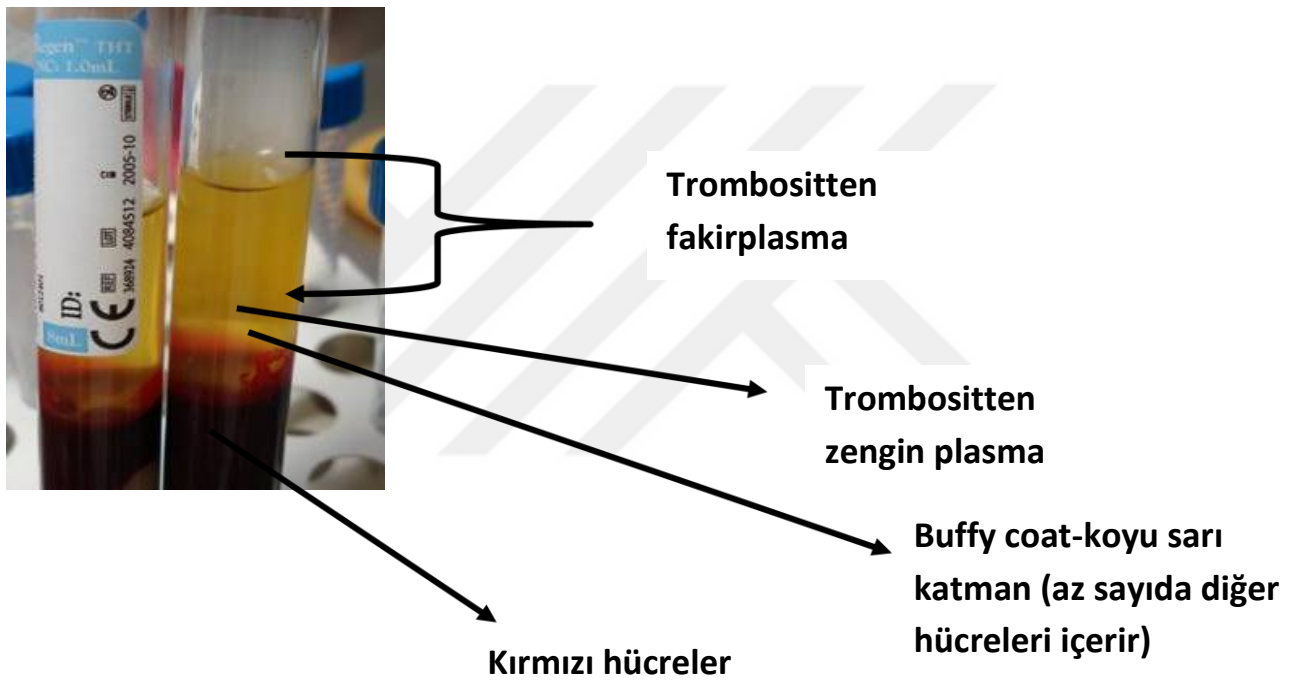
Alfa Granül	Delta Granül (Yoğun Cisim)	Lambda Granül (Lizozomlar)
PDGF, EGF, VEGF TGF β ,IGF, FGF Fibrinojen Fibronectin Trombospodin	ADP Tromboxane A2 Serotonin	Asit proteazlar Glikohidrolazlar

Trombosit Zengin Plazma:

Trombosit Zengin Plazma; bazal seviyenin üstünde trombosit konsantrasyonu içeren otolog kanın plazma kısmı olarak tanımlanabilir (39). Bazı araştırmacılar TZP'nin bazal seviyenin 3–5 katı kadar trombosit konsantrasyonu içermesi gerektiğini önermektedirler (33). Anitua TZP hazırlanırken amacın 300000 trombosit/ μ l olması gerektiğini belirtmektedir (37). Doku hasarına cevap olarak meydana gelen pıhtı oluşumu hemostazı sağlayarak biyolojik aktif

proteinlerin sekresyonuna yol açar. TZP doku rejenerasyonunda etkili hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunu arttırmaktadır.

Antikoagüle kan santrifüj edildiğinde 3 tabaka açığa çıkar: Kırmızı kan hücrelerinden oluşan alt tabaka (yoğunluk=1.09), trombosit ve beyaz kan hücrelerinden oluşan orta tabaka(buffy coat, yoğunluk=1.06), ve en üstte yer alan plazma tabakası(yoğunluk=1.03). (Şekil 2)



Şekil 2:Santrifüj sonrası açığa çıkan tabakalar

Antikoagülan olarak asit sitrat dekstroz kullanılması, santrifüj sırasında düşük gravite kuvvetlerinin uygulanması trombosit membran bütünlüğünü koruyacak, trombosit fragmentasyonunu önleyerek sekretuar proteinlerin bioaktivitesini arttıracaktır (32,40). Trombosit aktivasyonu α granül membranının iç yüzünde bulunan P-selektin ölçülerek kantitatif olarak değerlendirilebilir. Klinik vakalarda periferik ya da santral venden alınan kanla hazırlanan TZP'nin trombosit sayısı arteriel kandan hazırlananlara göre anlamlı olarak

yüksek bulunmuştur. TZP'nin rejeneratif potansiyeli aktivasyonla salınan sekretuar proteinlerin seviyelerine bağlıdır. Sekretuar proteinlerin seviyeleri ELİSA ile kantitatif olarak ölçülebilir.

TZP'nin yararları kemik ve yara iyileşmesini hızlandırması ve postoperatif infeksiyon, ağrı ve kan kaybını azaltmasıdır. TZP doku mühendisliği, kemik greftleri ve angiogenez alanlarında giderek dikkati çekmektedir. TZP'nin kullanıldığı klinik uygulamalar periodontal ve oral cerrahi, maksillofasyal cerrahi, kozmetik plastik cerrahi ve koroner bypass cerrahisini içermektedir. Ayrıca kronik cilt ülserleri ile yumuşak doku ülserlerinin tedavisinde ve dekübit yaraları, fistül, yanık gibi zor iyileşen yaralarda kullanılmaktadır.

Kozmetik fasyal ve meme cerrahisinde TZP kullanımıyla ameliyat sonrası ağrı ve şişlikte azalma olduğu da gözlemlenmiştir. Uygulanan TZP miktarı ve uygulama metodu prosedür özeldir (32,33). ELİSA ile yapılan analizde TZP de tam kanla karşılaştırıldığında TGF β da 7, PDGF de 30, EGF de ise 10 kat artış saptanmıştır (38,41). In vitro trombosit konsantrasyonu ile insan erişkin mezenkimal kök hücre proliferasyonu, fibroblast proliferasyonu ve tip1 kollajen üretimi arasında doz bağımlı bir ilişki bulunmaktadır (33,42).

Kök Hücre

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme (in vivo ve in vitro ortamda) ve kendisini yenileyebilme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücreler (Stem cells) adı verilir. Bu hücreler özel biyolojik sinyallerin etkisiyle prekürsöründen farklı özelleşmiş hücreye dönüşebilirler (plastisite). Kendilerini yenileyebilme özelliklerini organizmanın yaşamı boyunca sürdürürler. Bundan dolayı da in vitro koşullarda tedavi amacıyla bol miktarda üretilebilirler (43). Kök hücre basitçe düşünüldüğünde yaşamın kaynağıdır. Patolojinin

öncülerinden Dr. Rudolph Virchow'un dediği gibi 'her hücre bir hücreden meydana gelir (omnis cellula e cellula) (44).

Farklılaşma potansiyeline göre kök hücreler 4 temel kategoride sınıflandırılmıştır.

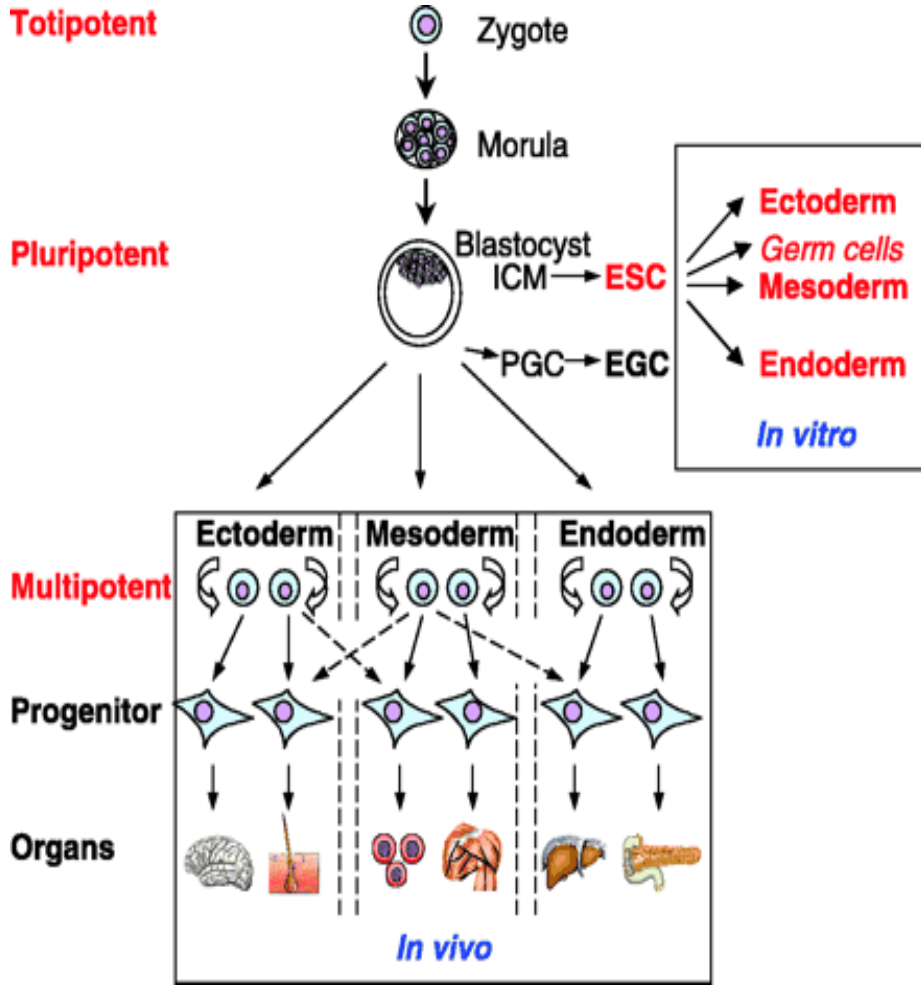
a-Totipotent hücre: Plasenta ve embriyonik membranlar dahil insan vücudundaki tüm dokulara farklılaşabilme yeteneğindedir. Bunun tek örneği zigottur.

b-Pluripotent hücre: Blastokistin iç hücre kitlesinde bulunur ve üç germ tabakasından(ektoderm, mezoderm ve endoderm) birine farklılaşabilme yeteneğindedir. Aynı zamanda embriyonel kök hücreler de denilebilir. Yüksek proliferasyon kapasitesi, spesifik marker (SSEA-3, SSEA-4, OCT-4, SOX-2, NANOG, KLF-4) ekspresyonu ile karakterizedir.

c-Multipotent hücre: Tek germ tabakasından çeşitli hücre tiplerine farklılaşır

d-Unipotent hücre: Tek germ tabakası sadece bir hücre tipine farklılaşır (45).

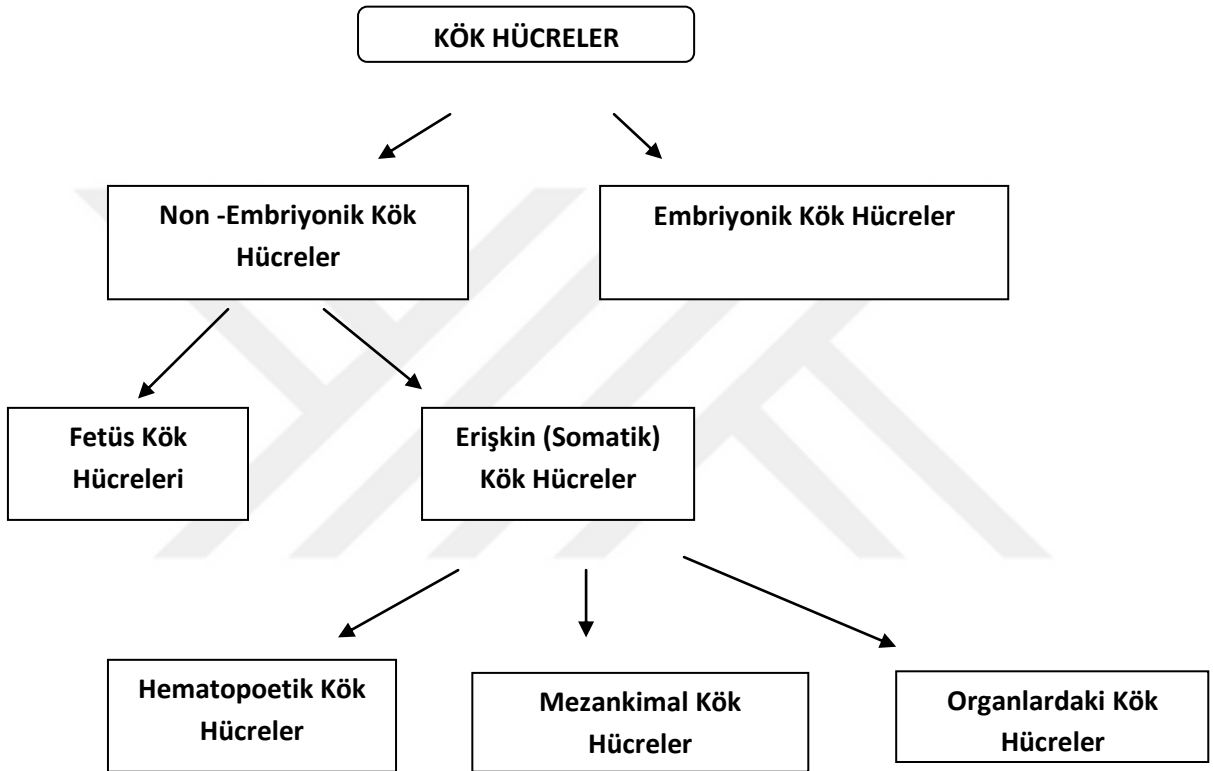
(Şekil3-A)



Şekil 3-A: Kök hücre hiyerarşisi

Vücuttaki her hücre yaşlanır ve spesifik bir yarı ömrü vardır. Zaman içinde vücutta meydana gelen değişiklikler hücrelerin yerini yenilerinin alması nedeniyledir. Bu olaylar, progenitor hücre varlığını gündeme getirmiştir. Multipotent ve pluripotent kök hücreler daha sonra belirli hücre dizilerine diferansiye olacak progenitor hücreleri oluştururlar (sadece bir tip hücrenin kaynağını oluşturan kök hücrelere progenitor veya prekürsör kök hücreler denir) (46). Multipotent yetişkin progenitor hücreler MKH'lere, endotelial, epitelyal ve hatta hematopoetik hücrelere farklılaşabilmektedir (47).

Yetişinde kök hücreler çeşitli organ ve dokularda bulunurlar. Kök hücreler bulundukları yere göre de sınıflandırılabilirler. Embryonik kök hücreler (EKH)erken embryonik dönemde blastokistin iç tabakasında bulunurken, yetişkin/somatik kök hücreler(YKH) yetişkin organizmanın dokularında bulunurlar (Şekil3-B).



Örneğin; olgun kan hücreleri kemik iliğinde yer alan hematopoetik kök hücrelerden köken alırken bağırsak epitelinin her 3–4 günde bir yenilenen hücreleri bağırsak kriptalarının dibinde yer alan kök hücrelerden çoğalarak ve farklılaşarak oluşurlar. Dolayısıyla kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasıyla kontrol eden mekanizmaların ortaya çıkarılması, metabolik, dejeneratif ve immünolojik hastalıkların hücre ve genlerle tedavisinde yeni bir dönemin açılmasına öncülük edecek güçtedir. Embriyonel kök hücre uygulamalarındaki önemli sorunlardan biri “teratom” gelişim riskidir. Bir başka sorun bu hücrelerin allojeneik olması yani reddedilme olasılığının varlığıdır. Embriyonik kök hücreler; hücre ve gen tedavi çalışmalarında, ilaç endüstrisi ve embriyoloji alanlarında kullanılmaktadır. Özellikle yapılan hayvan çalışmalarındaki başarıların yanı sıra kullanımlarında ciddi tıbbi, etik ve dinsel tartışmalar vardır (46).

Kök hücrelerin bir bölümü ise fetüsten elde edilir ve saklanır hale gelmiştir. Bu hücrelere fetüs kök hücreleri denebilir. Çeşitli yönleriyle embriyon ve yetişkin kaynaklı kök hücreler arasında çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahiptir. Amniyon sıvısındaki kök hücreler, plasenta kaynaklı kök hücreler, göbek kordonu stroması kaynaklı kök hücreler bu grupta sayılabilir. Bu hücrelerin diğer bir ortak özelliği de fetüse zarar vermeden gebelik süresince veya doğum esnasında kolaylıkla ve etik problemlere yol açmadan elde edilebilir olmalarıdır. Bu hücrelerin yüzey işaretleyicileri açısından ss hem embriyon, hem de yetişkin kök hücre özellikleri barındırdıkları ortaya çıkmıştır.

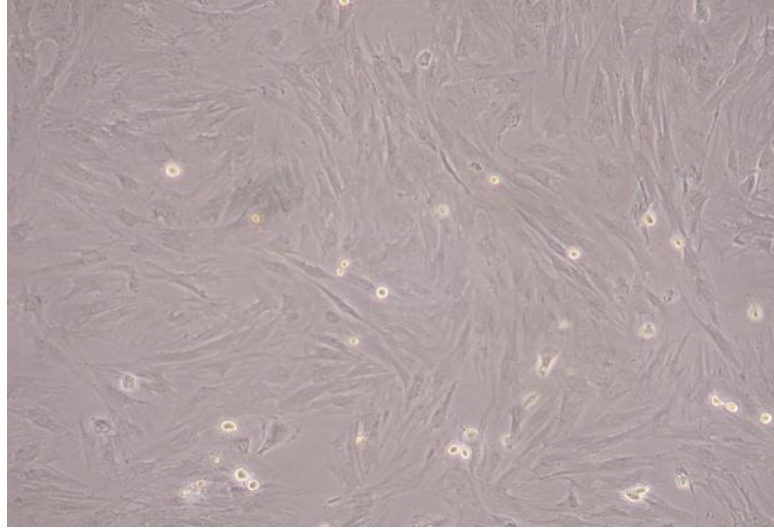
En iyi tanımlanmış erişkin kök hücreler hematopoetik kök hücreler(HKH) ve mezenkimal kökhücrelerdir(MKH). Mezenkimal kök hücreler prelinik ve klinik çalışmalarda önem arz etmektedir.

Erişkin kök hücreler; kemik iliği, umbilikal kord, ensefalon, epitelyum, dental pulpa ve son zamanlarda adipoz doku gibi çeşitli vücut dokularından izole edilebilir. Erişkin kök hücreler maturasyon, yaşlanma ve hasara bağlı kayba uğrayan hücreleri yenileyerek doku homeostazının korunmasından sorumludur. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır (48). Yetişkinde her organ ve dokuda aynı sayı ve potansiyelde kök hücrelere rastlanmaz.

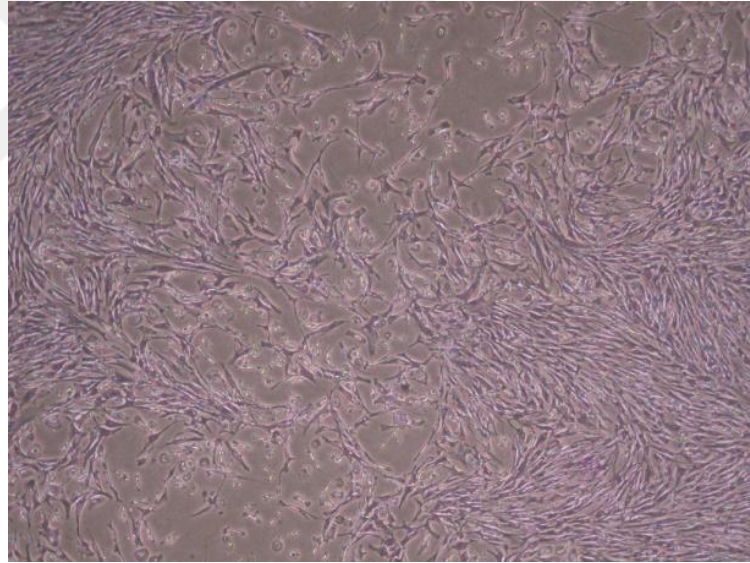
Mezenkimal kök hücreler 1970’lerde Friedenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (49). Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği mikro çevresinde kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen elementlerden biri olup; kemik, kas, kıkırdak, tendon ve yağ hücrelerine farklılaşabilmeleri yanında non-mezenkimal olarak nöron ve astrositlere de farklılaşabilme yeteneğine sahip olan mezodermal orijinli multipotent hücrelerdir. Kemik iliğindeki her 10.000–100.000 çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu saptanmaktadır. Bu oran kordon kanında 100.000.000 hücrede 1’e düşmektedir (50). MKH için Uluslar arası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT) 3 tanımlayıcı özellik önermektedir:

- 1- Standart kültür ortamında plastiğe yapışabilmeleri
- 2- CD105 (SH2), CD73(SH3/SH4), CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmeleri ancak CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19, HLA-DR (HLA-II) gibi belirteçleri bulundurmamaları
- 3- In vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri (51).

Mezenkimal kök hücreler kültür ortamında morfolojik olarak ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde fusiform şekilli, fibroblast benzeri bir görünümündedirler (52) (Şekil 4 A-B)



Şekil 4A



Şekil 4B

Şekil4: Mezenkimal kök hücrelerin ışık mikroskopundaki görünüşleri
A: (40X),**B:**(100X)

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon teknikleri daha çok onların yapışma özelliği kullanılarak geliştirilmiştir. Yapışmayan hücreler her kültür değişiminde alınarak konsantre MKH'ler elde edilir (53).

Rodbell ve ark 1960'da yağ (45) dokudan hücre izole eden ilk metodu tanımlamıştır. Bu metod başlangıçta laboratuvar hayvanlarının (fare, tavşan) yağ doku örneklerinde uygulanmıştır. Sonra modifiye edilerek insan yağ doku örneklerinde kullanılmıştır.

2000 yılına kadar erişkin kök hücre alanındaki yayınlar sadece hematopoetik kök hücre ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelere odaklanmıştı. Yağ dokusu kaynaklı kök hücreler ilk kez 2001 yılında Zuc tarafından elde edilmiştir (54). Yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerin izolasyonu lipoaspiratın iki farklı kısmından yapılmaktadır. Zuc ilk kez yüzeydeki yağ fraksiyonundan kök hücre elde etmiştir. 2006'da Yoshimura daha yoğun olan sıvı fraksiyonundan kök hücre elde etmiştir (58).

Bu hücrelerin sayısının yağ dokusundaki hücrelerin 1/100 ile 1/1500'ü kadar olduğu tahmin edilmektedir ve kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerde bu oranın yüz binde bir olduğu düşünülecek olursa bu oran oldukça yüksektir (56). Yağ doku kaynaklı kök hücreler yağ dokudan hastada ağrıya neden olmadan ve diğer multipotent mezenkimal kök hücrelere göre(kemik iliği, plasenta, umbilikal kord, amniyon sıvısı)bol miktarda elde edilebilir. Bu nedenle yağ doku otolog hücre replasmanında ideal bir donordür(57).

Yağ doku kaynaklı kök hücreler, erişkin kök hücrelerin karakteristik özelliklerine sahiptir. Bu hücreler fenotipik ve genotipik olarak mezenkimal kök hücrelere çok benzemesine, hatta bazı yayınlarda yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmasına rağmen, iki hücre arasında bazı farklar vardır.

Mezenkimal kök hücre ile yağ doku kaynaklı kök hücre arasındaki en belirgin fark mezenkimal kök hücreler CD 106+ liği gösterirken yağ doku kaynaklı kök hücreler CD49d + dir. Diğer bir yapısal farklılıkta mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik diferansiasyonunun daha iyi olmasıdır (56).

Monoklonal ve poliklonal kültür çalışmaları liposuction aspiratlarından elde edilen YDKH'nin mezodermal ve ektodermal menşeli hücre serilerine farklılaşabilme özelliğinde olduğunu göstermiştir. Bunlar adipojenik, kondrojenik, osteojenik, myojenik, kardiomyojenik, nörojenik, angiojenik ve hepatik hücre serileridir (58). YDKH'nin in vitro matur adipositlere farklılaşması insulin, izobutylmetilksantin, deksamethazone ve indomethazin etkisi altında gerçekleşmektedir (7,43,57).

Beyaz yağ dokudaki erişkin kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli daha yüksektir ve esmer yağ dokudan izole edilen hücrelerden daha hızlı büyürler. YDKH angienez ve antiapoptotik olayları destekleyen VEGF, HGF, IL-6, IL-7, TNF α , M-CSF ve TGF β 1 gibi çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü sekresyonu yapabilme özelliğine sahiptir.

Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları:

Kök hücre biyolojisi ve klinikte kullanılabilirlikleri üzerindeki çalışmalar hızla artmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücre kullanılarak yapılan ilk klinik faz 1 çalışmalar Chron hastalarına aittir. Geleneksel tedavilerle iyileşmeyen fistüllerin %75'i yağ doku kaynaklı kök hücre tedavisi ile tamamen iyileşmiştir. Perianal fistülü olan 50 hastada yapılan bir çalışmada trombosit fakir plazma ile kombine edilen yağ doku kaynaklı kök hücre tedavisi ile %71 oranında iyileşme gözlemlenmiştir (59,63). Yedi yaşındaki bir kız çocuğunun kritik büyüklükte kalvarial defekti yağ doku kaynaklı kök hücre ile kombine edilen kanselöz iliak kemik grefti ile başarıyla tedavi edildiğini bildiren yayın mevcuttur (59-60).

Farmakolojik ve klinik çalışmalarda, özellikle dejeneratif hastalıkların tedavisinde uygulanmaları düşünülmektedir. Doku mühendisliğinde YDKH farelerde X'e bağlı musküler distrofi tedavisinde kullanılmıştır (24, 45). Herediter ya da kazanılmış lipoatrofi tedavisinde

de ümit vaat etmektedir (25, 26,45). Yoshimura lipoaspiratı SVF hücreleri ile kombine ederek memede volüm augmentasyonu için kullanmıştır (55).

Meme kanseri hastalarında mastektomi sonrası aksillaya radyoterapi uygulaması cilt ve dermisin ekspoze olduğu progresiv fibrotik lezyonlarla komplike olarak üst extremitede hareket kısıtlılığına neden olabilir. Bu durumun subkutan otolog yağ transplantasyonu ile düzeldiğini gösteren klinik çalışmalar mevcuttur (93). Şiddetli kombine immun yetmezliği olan (SCID) farelere farklı tiplerde insan meme kanseri hücresi ile birlikte YDKH implante edildiğinde tümör oluşumunu uyarmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar ışığında YDKH tedavisinin güvenli olduğu söylenebilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma GATA Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 30.12.2010 tarih ve 10/75 K sayılı izni ile GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 200–350 gr arasında değişen 46 adet inbred Fisher 344 sıçan (Charles River Laboratories) kullanıldı. Sıçanlar ikiyeşerli veya üçerli olarak uygun kafeslerde, 22+/-2 sıcaklıkta ve 12 saat karanlık–12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Araştırmada ilk olarak yağ doku kaynaklı kök hücreler elde edildi. Trombosit zengin plazma hazırlandı. Elde edilen kök hücreler ve trombosit zengin plazma daha sonraki aşamada yağ greftinde kullanıldı.

Kök Hücrelerin Elde Edilmesi:

Sıçanlarda İntraperitoneal ksilazin(Rompun,%2 solution; Bayer, Leverkusen, Germany) ve ketamin (Ketalar 30 mg; Parke-Davis, Morris Plains, NJ) ile anestezi sağlandı. İnguinal bölgeleri tıraş edildi. Povidone iodine ile antisepsi sağlandıktan sonra yaklaşık 1–1,5 cm uzunluğunda oblik insizyonla girilerek inguinal yağ yastıkları eksize edildi (Şekil 5A-B).



Şekil 5A: İnguinal bölgede planlanan oblik insizyon



Şekil 5-B:Sıçandan inguinal yağ yastığının eksizye edilmesi

Kanama denetimi uygulandıktan sonra cilt 5/0 monokril ile suture edildi.(Şekil 5-C).



Şekil 5-C:İnsizyonun sutureasyonu

Cerrahi olarak eksize edilen sıçan yağ dokusunun 15 ml'lik konik tüpte antibiyotikli media içinde laboratuara transferi sağlandı. İzole edilen yağ dokusu 100 mm'lik petriye konarak kan hücrelerinden arındırılmak üzere steril PBS (phosphate-buffered saline) ile birkaç kez yıkandı. Makas ve bistüri yardımı ile homojen bir şekilde küçük parçalara ayrıldı(Şekil 5-D).



Şekil 5 D:Eksize edilen yağ dokunun parçalanması

Parçalanmış dokular 15 ml'lik tüplere alınarak %0.075'lik kollejenazla işleme tabi tutuldu(Sigma, St. Louis, MO).Daha sonra kollajenazlı tüpler 37 derecede 30 dakika dokular iyice parçalanıp, tüplerin içeriği bulanık bir renk alana kadar çalkalamalı su banyosunda tutuldu.

Kollajenazı nötralize etmek için eşit hacimde %10 FBS(fetal bovin serum) içeren DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) eklendi.

Hücre süspansiyonu 1800 rpm de 10 dakika santrifuj edildi. Hücre peletinin tekrar süspansiyonu yapıldı ve kültür kaplarına yerleştirildi. Bu hücreler kontrol mediumunda(%10 FBS ve %1 antibiyotik/antimikotik içeren DMEM)37 derece ve %5 karbondioksitli ortamda inkübe edildi.48–72 saatte bir flask içeriği yenilenerek taze komplet medium (Mesencult MSC Basal Medium) eklendi ve bu işleme flask zemini %80–90 konfluent hale gelene kadar devam edildi(Şekil 6).



Şekil 6: Komplet media içeren 25 ml'lik flask

14.gün inverted mikroskopta incelenen hücrelerin flaskın tüm zeminini kaplayarak flaskın zemin görüntüsünü konfluent hale getirdiği saptandı ve flaskın tüm medium içeriği ortamdaki uzaklaştırıldı

Flasktaki yapışan hücrelerin ayrılmasını sağlamak için tripsinizasyon işlemine geçildi.

Tripsinizasyon:

Flasklardaki yapışan hücre tabakası 'phosphate-buffer-saline'(PBS) ile iki kez yıkandı.

%0,25'lik tripsin 5 ml ilave edildi.37 derecede 10 dakika süreyle inkübe edildi.

Bu aşamada yapışan hücreler ayrıldı, ancak hala kalabilecek hücre kümeleri olasılığı nedeni ile pipetle karıştırılarak kalan hücre kümelerinin de kolaylıkla ayrılması sağlandı.

Hücrelerin tam olarak ayrıldığından emin olmak için flask inverted mikroskopta kontrol edildi. Daha sonra tripsini inaktive etmek için 'FBS' ilave edildi.

Elde edilen hücre suspansiyonu 800 G' de 10 dakika süreyle santrfüj edildi ve 'komplet medium' ile iki kez yıkandı.

Kök Hücrelerin Pasajı:

Elde edilen hücre peleti 25 ml'lik flasklarda 10 ml 'komplet medium' içinde tekrar kültüre edildi(1. Pasaj).Birinci pasajdan sonra her dört günde bir, pasaj işlemleri 2 kez daha tekrarlandı. Üçüncü pasajın dördüncü günü tripsinizasyon işleminde tanımlandığı gibi hücreler tripsinizasyon ile flasktan alınıp yıkandıktan sonra 10µl DMEM içinde 5×10^6 adet konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml'lik insülin iğnelerine konularak kullanıma hazır hale getirildi.

Boyama:

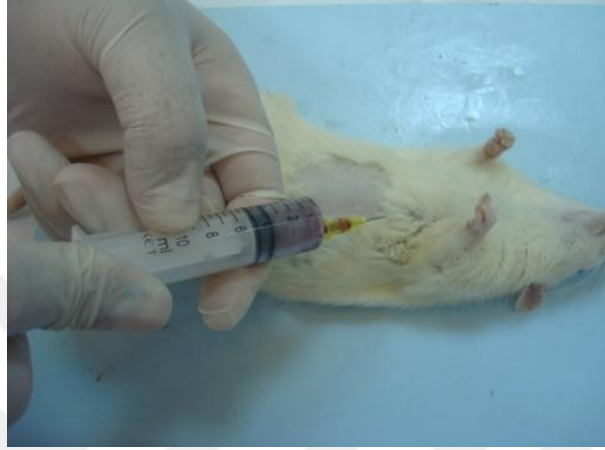
Kök hücrelerin yağ dokusundaki varlığının gösterilmesi için hücrelerin stoplazma membranları CM-DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin)(Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Ore) ile boyandı. Üreticinin uygulama talimatları doğrultusunda(Molecular Probes)1 milyon/ml hücre süspansiyonu içeren normal kültür vasatına ml başına 5 µl olacak şekilde “CM-DiI cell-labeling solution” eklendi. Pipetle nazikçe karışması sağlandıktan sonra, 37 derecede 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. İşaretli süspansiyon tüpleri 1500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, 37 derecede tekrar süspansiyon gerçekleştirildi. Bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı ve işaretli hücreler 10 dakika sonra kullanıma hazır geldi(Şekil7).



Şekil 7:CM-DiI ile işaretlenerek kullanıma hazır hale getirilen kök hücre peleti.

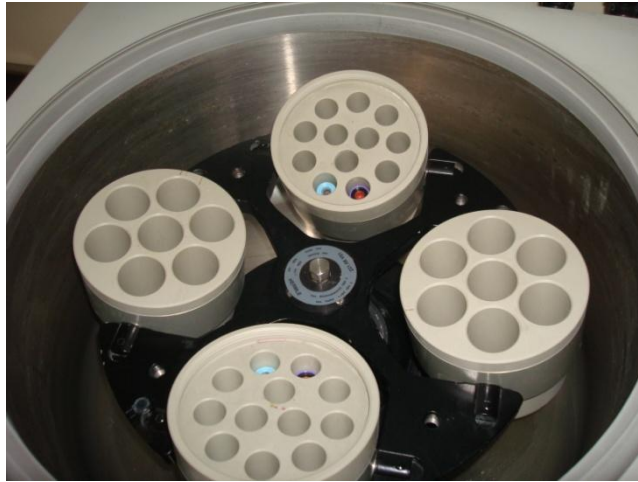
Trombosit Zengin Plazma Hazırlanması:

Trombosit Zengin Plazma hazırlamak için gerekli olan kan diyetiler anestezi verilen 4 adet donör inbred F344 sıçandan intrakardiak kanülizasyon ile tüm vücut kanları alınarak elde edildi(Şekil 8A).



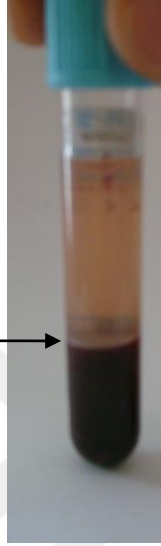
Şekil 8A: TZP eldesi için intrakardiak kanülizasyonla tüm vücut kanının alınması.

Alınan kan antikoagülan olarak 1 ml %10 sodyum sitrat içeren tüplere kondu. Oda sıcaklığında santrifüj cihazında 1000 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi(Şekil 8B)



Şekil 8B: Tüplerin santrifüj cihazına yerleştirilmesi

Santrifüj sonrası eritrositlerin tüpün en alt kısmında toplandığı görüldü. Üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile en alt tabakada olan eritrositlerin arasında trombosit ve beyaz küreler tarafından oluşturulan ince bir ara tabaka (buffy coat) izlendi (Şekil 9).



Plazmanın alt kısmından interfaz zonuna kadar pipet yardımıyla aspire edilerek ayrı bir tüpe yerleştirildi. Bu şekilde 10 ml kandan 1 ml TZP elde edilmiş oldu. TZP deki trombosit sayımı için standart homositometri kullanıldı. Yapılan sayımda TZP'deki trombosit konsantrasyonu $12 \pm 2 \times 10^5/\mu\text{l}$ olarak tespit edildi.

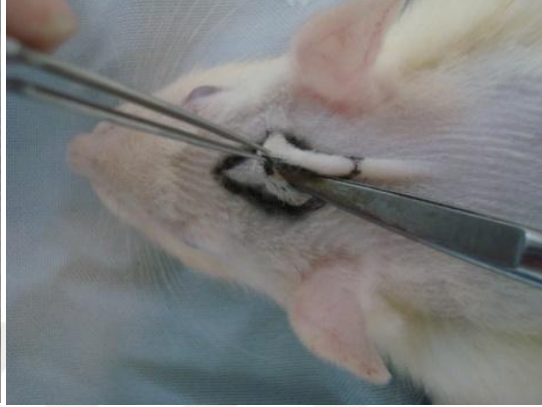
CERRAHİ TEKNİK:

Çalışmanın 2. aşamasında 40 adet Fisher 344 inbred sıçan kullanıldı. Her grupta 10 adet olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Deneklerde ksilazin+ketamin anestezisi ile uyutuldu. İnguinal bölgeleri tıraş edilerek %10'luk 'povidon iodine' solusyonu ile antisepsi sonrası planlanan oblik insizyonla girilerek inguinal yağ yastıkları eksize edildi. Kanama denetimi uygulandıktan sonra cilt 5/0 monokril ile sütüre edildi.

Deneklerin kafa derisi enseden alına kadar tıraş edildi. Antisepsi sağlandıktan sonra orta hatta yaklaşık 1 cm uzunluğunda longitunal bir deri insizyonu yapıldı. Daha sonra makas yardımı ile yağ enjeksiyonu yapılabilmesi için gerekli poş oluşturuldu(Şekil 10 A-B).



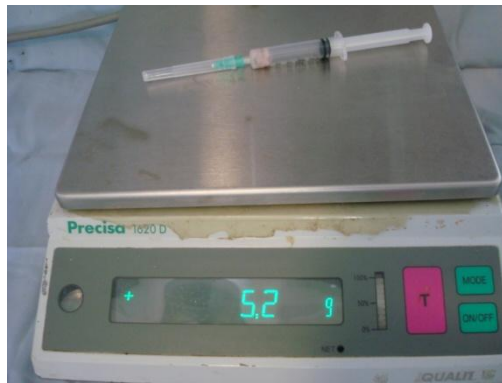
Şekil 10-A



Şekil 10-B

Şekil 10A:Longitunal insizyon **10B:** poş oluşturulması

Eksize edilen yağ petri kabında bistüri ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrılarak enjektöre dolduruldu.2 cc'lik enjektörün hassas terazide önce darası alındı. Daha sonra parçalanmış yağ, enjeksiyon yapılmak üzere enjektöre doldurularak hassas terazide tekrar tartıldı (Şekil11).



Şekil 11:Enjeksiyon öncesi yağ greftinin hassas terazide yapılan ağırlık ölçümü.

15 ml'lik konik tüpler PBS solusyonu ile dolduruldu. Eksize edilen yağ konik tüpün içine atılarak 'sıvı taşıma metodu' na göre volüm ölçümü yapıldı(Şekil 12A-B).



Şekil 12-A

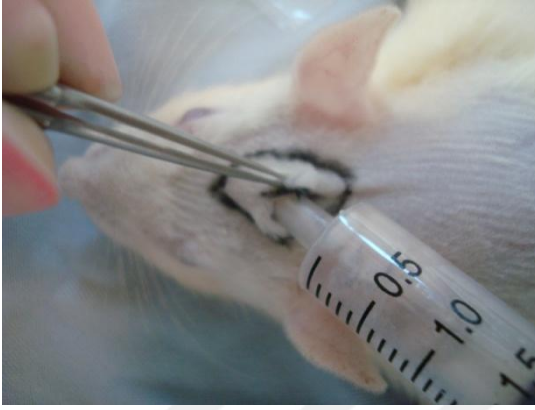


Şekil 12-B

Şekil 12 :Enjeksiyon öncesi yağ greftinin sıvı taşıma prensibine göre yapılan volüm ölçümü.**A:**Tüp içindeki sıvı seviyesi 10 cc'yi göstermektedir.**B:**Yağ greftinin tüpün içine atılmasından sonra sıvı seviyenin 11.5'a yükseldiği görülmektedir.Aradaki fark yağ grefti volümünün 1.5 cc olduğunu göstermektedir.

Grup A(Kontrol grubu–10 Adet):

Oluşturulan poşa 2 cc'lik enjeksiy3r ile yağ enjeksiyonu yapıldı. Yağ grefti uygulaması sonrası 0,5 ml'lik ins3lin iğnesi ile 0,2 ml DMEM enjeksiyonu yapıldı. İşlem sonunda cilt insizyonu 5/0 monokril ile s3t3re edildi.



Şekil 13-A



Şekil 13-B

Şekil 13A: Skalpte oluşturulan poşa yağ enjeksiyonu yapılması **13B:**Enjeksiyon ve s3t3rasyon sonrası g3r3n3m

Grup B(Trombosit Zengin Plazma grubu–10 Adet):

Oluşturulan poşa 2 cc'lik enjeksiy3r ile yağ enjeksiyonu yapıldı. Yağ grefti uygulaması sonrası 0,5 ml'lik ins3lin iğnesi ile 0,2 ml TZP enjeksiyonu yapıldı. İşlem sonunda cilt insizyonu 5/0 monokril ile s3t3re edildi.

Grup C (Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre Grubu–10 Adet):

Oluşturulan poşa 2 cc'lik enjektör ile yağ enjeksiyonu yapıldı. Yağ grefti uygulaması sonrası çalışmanın ilk aşamasında elde edilen yağ dokusu kaynaklı kök hücreler 0,2 ml DMEM içinde 5×10^6 konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml'lik insülin iğnesi yardımı ile yağ grefti içine enjekte edildi.

Grup D (Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre+Trombosit Zengin Plazma Grubu–10 Adet):

Oluşturulan poşa 2 cc'lik enjektör ile yağ enjeksiyonu yapıldı. Yağ grefti uygulaması sonrası çalışmanın ilk aşamasında elde edilen yağ dokusu kaynaklı kök hücreler 0,2 ml DMEM içinde 5×10^6 konsantrasyonda olacak şekilde 0,2ml TZP ile kombine edilerek 0,5 ml'lik insülin iğnesi yardımı ile yağ grefti içine enjekte edildi(Şekil 14 A-B).



Şekil 14 A: 0,5 ml'lik insulin iğnesi içinde kullanıma hazır hale getirilmiş kök hücreler ve

TZP



Şekil 14-B: Yağ grefti içine kök hücre uygulaması

Deneyin 3. Ayında her gruptaki sıçanlardan anestezi altında, skalp bölgesi tıraşlandıktan sonra yağ greftlerinin ekstirpasyonu yapıldı (Şekil 15).



Şekil 15: Yağ greftinin ekstirpasyonu

Eksize edilen yağ greftlerinin daha önce belirtildiği gibi hassas terazi ile ağırlık ölçümleri tekrarlandı (Şekil 15 A-B).



Şekil 15-A



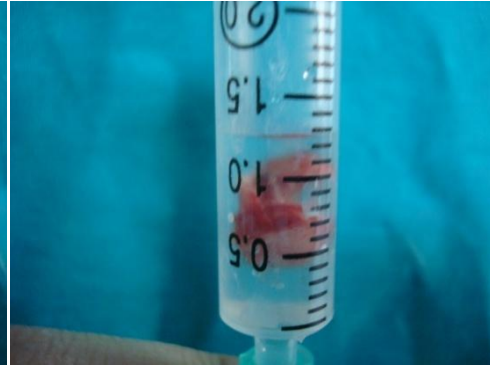
Şekil 15-B

Şekil 15 A: Petri kabının darasının 1.4 gr olduğu görülmekte **B:** Yağ grefti ile birlikte ağırlığın 1.5 gr olduğu görülmüyor. Ekstirpe edilen yağ greftinin ağırlığının 0.1 gr olduğu anlaşılmaktadır.

Sıvı taşıma metoduna göre volüm ölçümleri tekrar yapıldı (Şekil 16 A-B).



Şekil 16-A



Şekil 16-B

Şekil 16 A: Sıvı seviyesi 1 cc'yi göstermekte **B:** Greftin sıvıya atılmasından sonra seviye 1,3'e yükselmiştir.

DEĞERLENDİRME:

1. Ağırlık ve Volüm Değerlendirmesi:

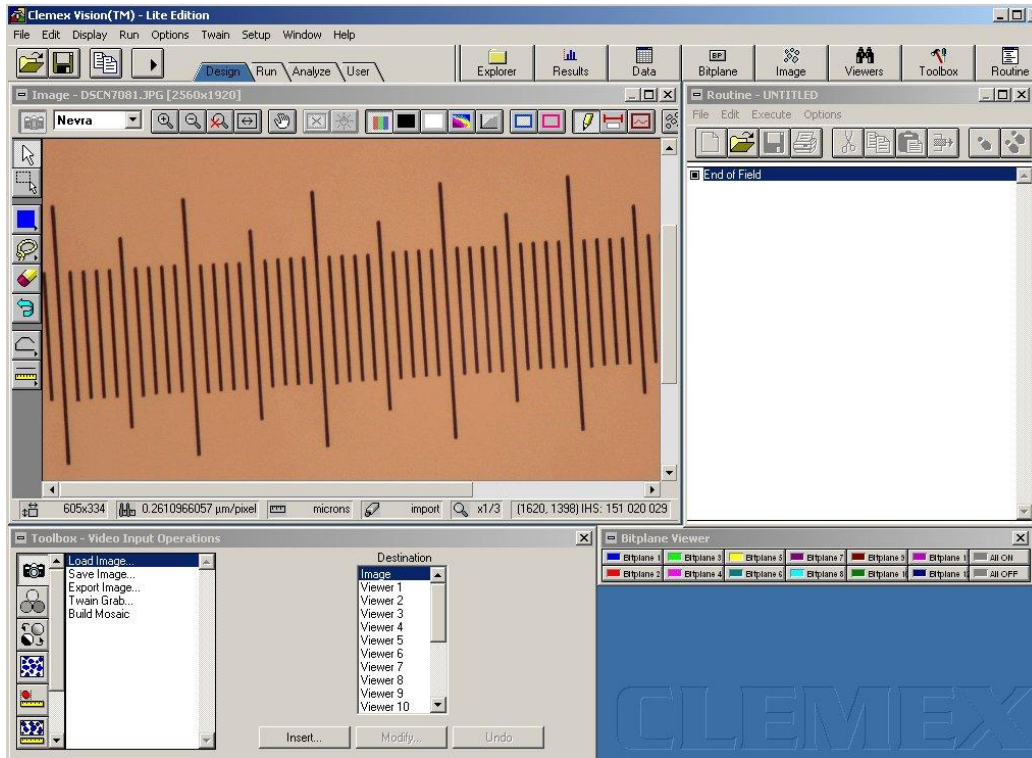
Deney gruplarının her birindeki sıçanlar için inguinal bölgeden eksize edilen yağ dokusu hassas terazide tartıldı ve sıvı taşıma prensibine göre volüm ölçümü yapıldı. Her sıçan için saptanan değerler kaydedildi. Yağ grefti uygulamasının 3. ayında skalp bölgesinden ekstirpasyonu yapılan yağ dokularının ağırlık ve volümleri yukarıda belirtilen şekilde ölçülerek her sıçan için elde edilen yeni değerler kaydedildi.

2. Histolojik Değerlendirme:

Bütün materyaller %10 luk tamponlu formaldehid içerisinde 48 saat tespit edildikten uygun alanlardan alınan doku örnekleri ototeknikon takibine alındı, parafine gömüldü ve mikrotom ile kesitler alınarak Hematoksilen Eozin (HE) ve triple ile histokimyasal ve VEGF ile ise immünohistokimyasal olarak boyandı. Tüm boyalı preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile incelendi.

Değerlendirmede her bir olgu için mümkün olduğunca aynı alanların seçilmesine özen gösterildi. Seçilen alanlar, aynı mikroskop büyütmesinde, mikroskoba monte Nikon Coolpix5000 dijital fotoğraf makinesi ile görüntülendi. Bu esnada kalibrasyon için aynı mikroskop büyütmesinde Nikon Stage Mikrometer (MBM11100, Japonya) görüntüsü de alındı. Tüm görüntüler Clemex Vision Lite 3,5 (Canada) ile analiz yapılmak üzere PC ortamına aktarıldı. İlk olarak Nikon Stage Mikrometer (MBM11100, Japonya) ile uzunluk kalibrasyonu yapıldı. Kalibrasyonun yapılmasından sonra incelemelerin yapılacağı alan $335076,3 \mu\text{m}^2$ olarak belirlendi(Şekil 17).

Görüntüler üzerinde seçilen bu 335076,3 μm^2 lik alandaki kist vakuoller, intakt adipozitler ve lenfositler HE ile boyalı preparatların fotoğraflarında işaretlenerek, fibroblastlar triple ile boyalı preparatların fotoğraflarında işaretlenerek, kapiller yapıları ise VEGF ile immünohistokimyasal olarak boyanan preparatların fotoğraflarında işaretlenerek sözü edilen görüntü analizi programına otomatik olarak saydırıldı. Bu işlemler gruplar ve vakaların özellikleri bilinmeden gerçekleştirildi.



Şekil 17: ClemexVision Lite 3,5 görüntü analizi programı ile kalibrasyon yapılması

ELİSA Testi ile Büyüme Faktörü Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi

TEST HAZIRLIĞI:

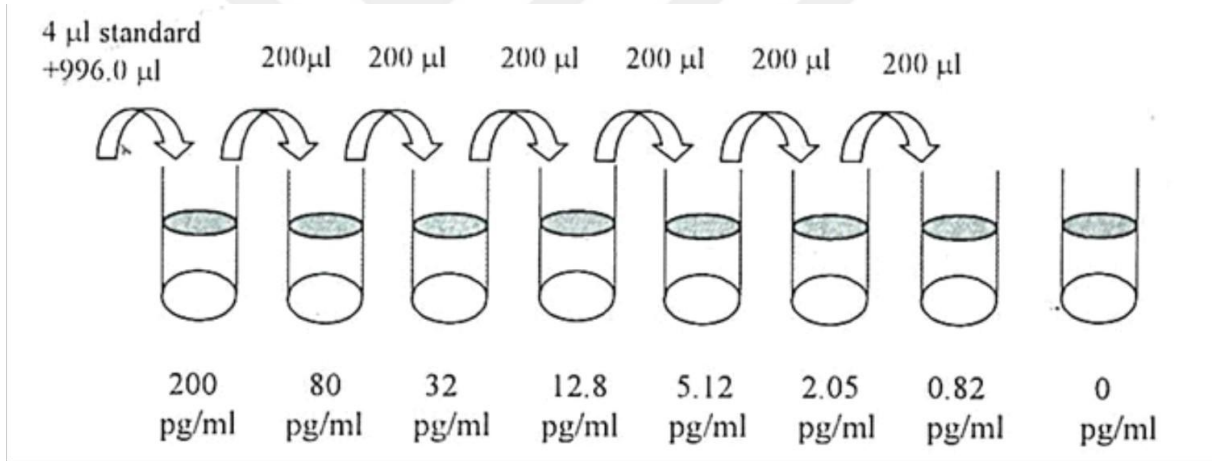
Kullanım öncesi tüm reaktifler oda ısına getirildi.

Test dilüenti distile su ile 5 kat sulandırılarak örnekler test dilüenti ile dilüe edildi.

Standartları hazırlamak için C işaretli standart şişesinden homojen karışım sağlandı.

Hazırlanan test dilüentinden 400 mikrolitre alınarak standart şişesine kondu.

Elde edilen standarttan 4 mikro litre bir tüpe pipetlendi ve üzerine 996 mikrolitre test dilüenti pipetlendi. Elde edilen 200 pg/ml ile standart oluşturuldu (Şekil 18).



Şekil 18:Standart hazırlanması

TEST PROSEDÜRÜ

Her bir standarttan sırasıyla 100 mikrolitre pipetlendi ve ardından örneklerden 100 mikrolitre pipetlenerek 2,5 saat oda ısısında shaker üzerinde inkübe edildi.

Kuyucuklar aspire edildi ve 300 mikrolitre yıkama solusyonu ile 4 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 mikro litre anti rat VEGF solusyonundan (Raybiotech) pipetlendi ve 1 saat oda ısısında shaker üzerinde inkübe edildi. Kuyucuklar aspire edildi ve 300 mikrolitre yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 mikrolitre kit içeriğine ait HRP solüsyonundan pipetlendi ve 45 dakika oda ısısında shaker üzerinde inkübe edildi. Kuyucuklar aspire edildi ve 300 mikrolitre yıkama solusyonu ile 4 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 mikrolitre kit içeriğine ait TMB pipetlendi ve oda ısısında karanlık ortamda shaker üzerinde inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 50 mikrolitre stop solusyonu pipetlendi. 450 nm dalga boyu filtreli mikroeliza okuyucuda okutuldu. Karşılık gelen konsantrasyon değerleri kaydedildi.

Aynı prosedür üretici firmanın talimatları doğrultusunda FGF(USCN life) ve TGF β (Invitrogen) içinde tekrarlanarak elde edilen konsantrasyon değerleri kaydedildi.

3. Flörosan Mikroskop İle Değerlendirme.

CM-DiI(Invitrogen, Molecular Probes, USA) ile işaretlenmiş olan hücreler flörosan mikroskop ile görüntülendi.

4. İstatistiksel Değerlendirme.

Elde edilen veriler SPSS 13,0(Statistical package for the social sciences, Chicago; IL) istatistik paket programına aktarılarak bir istatistikçi tarafından analiz edildi.

Her bir grup için deneyin başlangıcındaki ve 3 ay sonraki ağırlık ve volüm değerleri ortalama $\pm$ SD cinsinden sunuldu.

Histolojik verilerin analizinde her bir grup için kist vakuol, intakt adiposit, fibroblast ve kapiller değerleri ortalama $\pm$ SD cinsinden sunuldu. Belirtilen parametreler için gruplar arasındaki farka Kruskal-Wallis varyans analizi testi ile bakılarak p değerinin 0.05'ten küçük olması($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı şeklinde değerlendirildi. Fark saptanan durumlarda ($p<0.05$ olduğunda) gruplar arasındaki farkı belirlemek için Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılarak ikişerli karşılaştırmalar yapıldı.

$P<0.05/6$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı kabul edildi.

ELİSA testi ile 1–3–5–7 ve 10. Günlerde ölçülen büyüme faktörlerinin(VEGF, FGF, TGF β) konsantrasyonları ortalama $\pm$ SD cinsinden sunuldu. Her iki grup için(Kök hücre, Kök hücre+TZP) her büyüme faktörü 5 zaman dilimi için karşılaştırıldı(Friedman testi, $p<0.05$).

BULGULAR

Ağırlık ve Volüm Değerlendirme Bulguları:

Tüm deneklerde deneyin başlangıcında enjekte edilen yağ greftlerinin ağırlık ve volümleri ile 3 ay sonra eksizedilen yağ greftlerinin ağırlık ve volüm değerleri ölçülerek kaydedildi(Tablo 2,3,4,5) ve sonraki analizlerde bu veriler tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama $\pm$ SD kullanıldı (Tablo 6).

Grup D’de greft retansiyonu daha fazlaydı (Şekil 19)



Şekil 19: Makroskopik olarak greft retansiyonunun Grup D de daha fazla olduğu görülmektedir.

Tablo 2: Grup A deneklerinin yağ greftlerinin enjeksiyon öncesi ve sonrası ağırlık ve volüm değerleri

Grup A (Kontrol)				
	Başlangıç Ağırlık ve Volum		3 ay Sonraki Ağırlık ve Volum	
Denek 1	1.1 gr	1cc	0.3 gr.	0.3 cc
Denek 2	1.0 gr.	1cc	0.5 gr.	0.5 cc
Denek 3	1.0.	1 cc	0.7 gr.	0.7 cc
Denek 4	1.1 gr.	1 cc	0.7 gr.	0.7 cc
Denek 5	1.2 gr.	1 cc	0.5 gr.	0.5 cc
Denek 6	1.8 gr.	1.5 cc	0.6 gr.	0.6 cc
Denek 7	2.2 gr.	2 cc	0.4 gr.	0.4 cc
Denek 8	1.3 gr.	1 cc	0.9 gr.	1 cc
Denek 9	1.1 gr.	1 cc	0.6 gr.	0.6 cc
Denek 10	0.7 gr	1cc	0.5 gr.	0.5 cc

Tablo 3: Grup B deneklerinin yağ greftlerinin enjeksiyon öncesi ve sonrası ağırlık ve volüm değerleri

Grup B Trombosit Zengin Plazma (TZP)				
	Başlangıç Ağırlık ve Volum		3 ay Sonraki Ağırlık ve Volum	
Denek 1	1.1 gr	1cc	0.5 gr.	0.4 cc
Denek 2	1.3 gr.	1cc	0.1 gr.	0.1 cc
Denek 3	1.4 gr.	1,5 cc	0.2 gr.	0.1 cc
Denek 4	1.3 gr.	1 cc	0.3 gr.	0.3 cc
Denek 5	1.7 gr.	1,5 cc	0.3 gr.	0.4 cc
Denek 6	1.6 gr.	1,5 cc	0.2 gr.	0.1 cc
Denek 7	2.1 gr.	2 cc	0.3 gr.	0.2 cc
Denek 8	1.2 gr.	1 cc	0.4 gr.	0.4 cc
Denek 9	1.4 gr.	1 cc	0.5 gr.	0.5 cc
Denek 10	1.1 gr	1cc	0.4 gr.	0.4 cc

Tablo 4: Grup C deneklerinin yağ greftlerinin enjeksiyon öncesi ve sonrası ağırlık ve volüm değerleri

Grup C (Kök Hücre Grubu)			
	Başlangıç Ağırlık ve Volum		3 ay Sonraki Ağırlık ve Volum
Denek 1	1.1 gr	1cc	0.3 gr. 0.3 cc
Denek 2	1.0 gr.	1cc	0.5 gr. 0.5 cc
Denek 3	1.0 gr.	1 cc	0.7 gr. 0.7 cc
Denek 4	1.1 gr.	1 cc	0.7 gr. 0.7 cc
Denek 5	1.2 gr.	1 cc	0.5 gr. 0.5 cc
Denek 6	1.8 gr.	1.5 cc	0.6 gr. 0.6 cc
Denek 7	2.2 gr.	2 cc	0.4 gr. 0.4 cc
Denek 8	1.3 gr.	1 cc	0.9 gr. 1.cc
Denek 9	1.1 gr.	1 cc	0.6 gr. 0.6 cc
Denek10	0.7 gr	1cc	0.5 gr. 0.5 cc

Tablo 5: Grup D deneklerinin yağ greftlerinin enjeksiyon öncesi ve sonrası ağırlık ve volüm değerleri

Grup D (Kök Hücre Grubu+TZP Grubu)			
	Başlangıç Ağırlık ve Volum		3 ay Sonraki Ağırlık ve Volum
Denek 1	1.1 gr	1cc	0.3 gr. 0.3 cc
Denek 2	1.0 gr.	1cc	0.5 gr. 0.5 cc
Denek 3	1.0gr.	1 cc	0.7 gr. 0.7 cc
Denek 4	1.1 gr.	1 cc	0.7 gr. 0.7 cc
Denek 5	1.2 gr.	1 cc	0.5 gr. 0.5 cc
Denek 6	1.8 gr.	1.5 cc	0.6 gr. 0.6 cc
Denek 7	2.2 gr.	2 cc	0.4 gr. 0.4 cc
Denek 8	1.3 gr.	1 cc	0.9 gr. 1cc
Denek 9	1.1 gr.	1 cc	0.6 gr. 0.6 cc
Denek 10	0.7 gr	1cc	0.5 gr. 0.5 cc

Tablo 6: Tüm grupların başlangıç ve 3 ay sonraki ağırlık ve volum değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

GRUP		AĞIRLIK (gr.)	VOLUM (cc)
A	Ortalama	0.14	0.14
	St. Sapma	0.096	0.05
B	Ortalama	0.32	0.29
	St. Sapma	0.131	0.15
C	Ortalama	0.57	0.58
	St. Sapma	0.17	0.193
D	Ortalama	0.78	0.8
	St. Sapma	0.122	0.258

Gruplar arasında başlangıç ve 3 ay sonraki değerler karşılaştırıldığında kontrol grubunda ağırlık ve volüm kaybı diğer 3 gruptan daha yüksekti(Tablo 7).

Tablo 7: Tüm grupların başlangıç ve 3 ay sonraki ağırlık ve volum farklarının ortalama ve standart sapmaları.

GRUP		AĞIRLIK (gr.)	VOLUM (cc)
A	Ortalama	1.37	1.11
	St. Sapma	0.271	0.499
B	Ortalama	1.1	0.96
	St. Sapma	0.371	0.445
C	Ortalama	0.68	0.57
	St. Sapma	0.487	0.434
D	Ortalama	0.63	0.52
	St. Sapma	0.386	0.509

3 ay sonraki ağırlık (A ve B $p=0.05$, C-D $p<0.001$ Mann Whitney U testi) ve volüm değerleri karşılaştırıldığında grup A ile diğer gruplar arasında(A ve B $p=0.03$, A ve C-D $p<0.001$, Mann Whitney U testi) anlamlı fark mevcuttu.

Histoloji Değerlendirme Bulguları:

Histolojik değerlendirme için belirlenen birim alanda HE ile boyalı preparatların fotoğraflarında işaretlenerek sayımı yapılan kist vakuol ve intakt adipositler (Şekil 20,21,22), triple ile boyalı preparatların fotoğraflarında işaretlenerek(Şekil 23) sayımı yapılan fibroblastlar, VEGF ile immunohistokimyasal olarak boyanan preparatların fotoğraflarında işaretlenerek(Şekil 24) sayımı yapılan kapiller yapıları veri olarak “SPSS 13.0 for Windows” programına istatistiksel olarak analiz edilmek üzere aktarıldı(Tablo 8–9–10,11).Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama $\pm$ SD kullanıldı(Tablo 12).

Tablo8: Grup A için saptanan kist vakuol, intaktadiposit, fibroblast ve kapiller sayıları

Grup A	Kist Vakuol	Intakt Adiposit	Fibroblast	Kapiller
Denek 1	11	42	108	6
Denek 2	6	19	80	7
Denek 3	7	20	85	8
Denek 4	10	31	97	6
Denek 5	9	20	98	5
Denek 6	8	21	85	3
Denek 7	11	35	100	3
Denek 8	10	38	95	5
Denek 9	8	25	90	12
Denek 10	9	30	100	7

Tablo 9:Grup B için saptanan kist vakuol, intakt adiposit, fibroblast ve kapillerlerin sayısal değerleri

Grup B	Kist Vakuol	Intakt Adiposit	Fibroblast	Kapiller
Denek1	7	45	88	14
Denek2	6	52	75	12
Denek3	5	38	68	15
Denek4	8	60	72	8
Denek5	7	33	84	7
Denek6	5	42	62	13
Denek7	2	74	56	16
Denek8	10	21	110	6
Denek9	7	63	77	9
Denek10	8	32	94	11

Tablo 10: Grup C için saptanan kist vakuol, intakt adiposit, fibroblast ve kapillerlerin sayısal değerleri

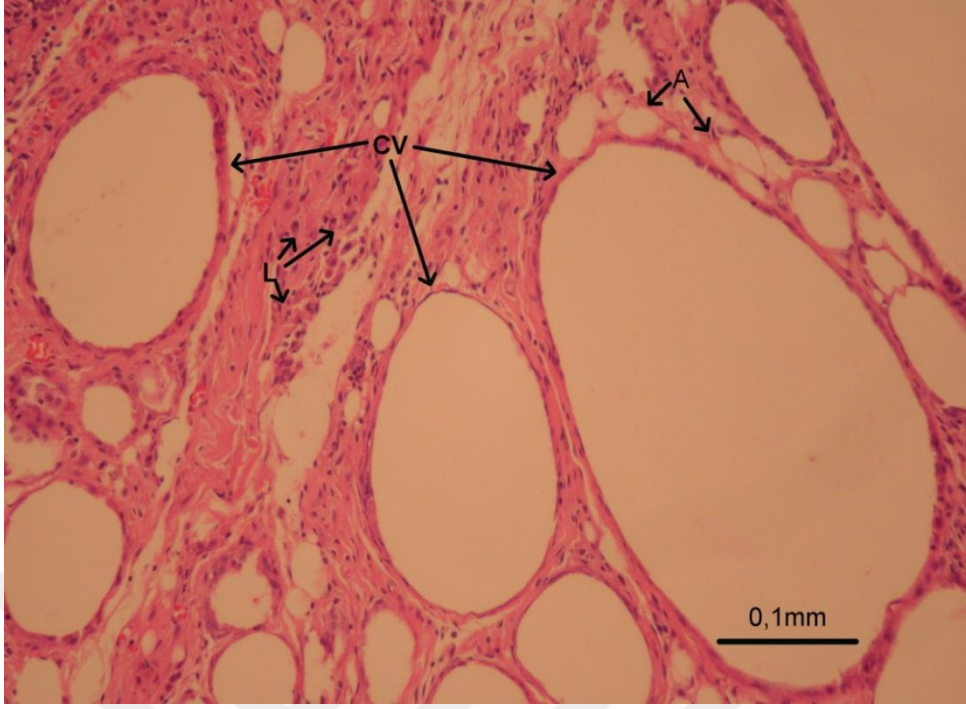
Grup C	Kist Vakuol	Intakt Adiposit	Fibroblast	Kapiller
Denek 1	4	68	41	28
Denek 2	5	64	30	12
Denek 3	4	76	39	11
Denek 4	2	78	27	34
Denek 5	2	84	37	26
Denek 6	3	96	45	22
Denek 7	6	69	46	14
Denek8	7	72	54	16
Denek 9	4	88	32	26
Denek 10	3	94	33	24

Tablo 11: Grup D için saptanan kist vakuol, intakt adiposit, fibroblast ve kapillerlerin sayısal değerleri

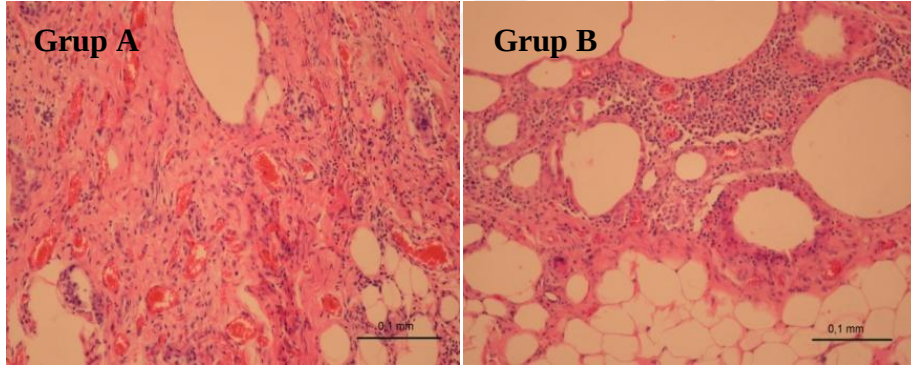
Grup D	Kist Vakuol	Intakt Adiposit	Fibroblast	Kapiller
Denek1	2	102	27	39
Denek2	1	91	19	41
Denek3	2	89	38	23
Denek4	3	110	18	34
Denek5	4	78	33	32
Denek6	1	92	24	34
Denek7	1	96	28	38
Denek8	2	84	30	29
Denek9	1	108	25	42
Denek10	2	99	22	14

Tablo 12: Tüm grupların kist, vakuol, intakt adiposit, fibroblast ve kapiller yapılarının ortalama ve standart sapmaları

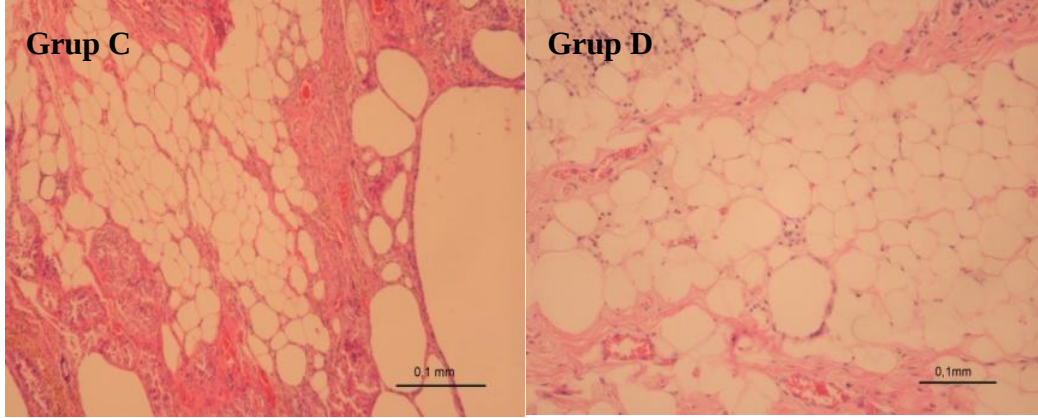
		Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
Kist Vakuol	Ortalama	8,9	6.4	4	
	SD	1.663	2.271	1.633	0.994
intakt Adiposit	Ortalama	28.1	46	78.9	94.9
	SD	8.333	16.248	11.18	10.17
Fibroblast	Ortalama	93.8	78.6	38.4	26.4
	SD	8.613	15.981	8.329	6.204
Kapiller	Ortalama	6.2	11.1	21.3	32.6
	SD	2.6	3.479	7.689	8.72



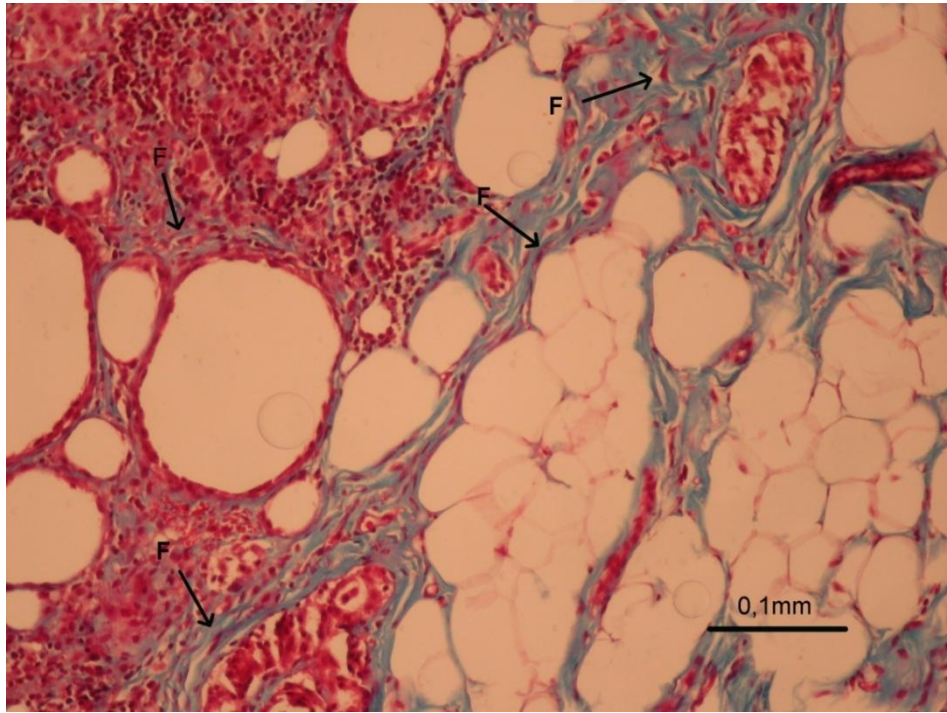
Şekil 20: HE ile boyalı preparatların fotoğraflarında görülen kist vakuol ve intakt adipositler,



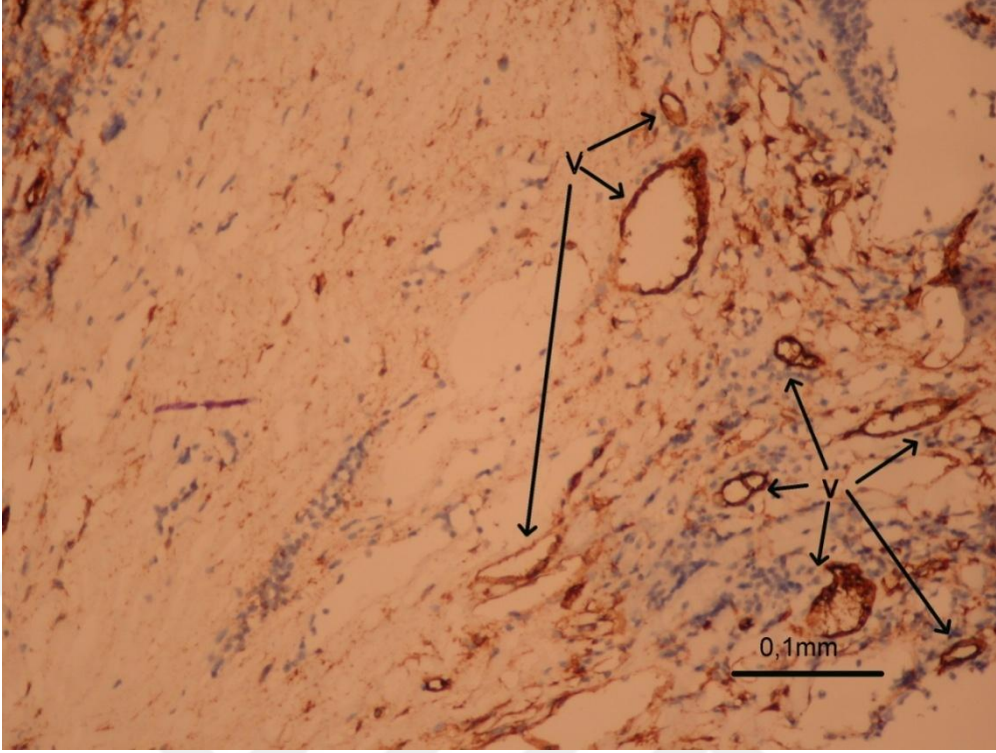
Şekil 21: Histolojik değerlendirmede Grup A’da oldukça geniş fibrotik alanlar izlenmekte Grup B’de kist ve vakuollerin yanı sıra normal adipositlerede rastlanmaktadır



Şekill 22: Histolojik değerdendirmede Grup C ve Grup D’de yağ dokusunun normal yapısının daha iyi korunmuş olduğu görölmektedir.



Şekil 23: Triple ile boyalı preparatların fotoğraflarında görülen fibroblastlar



Şekil 24: VEGF ile immunohistokimyasal olarak boyanan preparatların fotoğraflarında görülen damar yapıları

Grup D de saptanan yeni kapiller oluşumu diğer gruplarla karşılaştırıldığında(A-B ve D $p<0.001$, C ve D $p=0.007$,Mann Whitney U testi) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti.

Grup A da kist vakuol oluşumu diğer gruplarla karşılaştırıldığında(A ve B $p=0.015$, A ve C-D $p<0.001$, Mann Whitney U testi) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti.

Grup D de intakt adiposit sayısı diğer gruplarla karşılaştırıldığında(D ve A-B $p<0.001$,C ve D $p=0.007$, Mann Whitney U testi) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti.

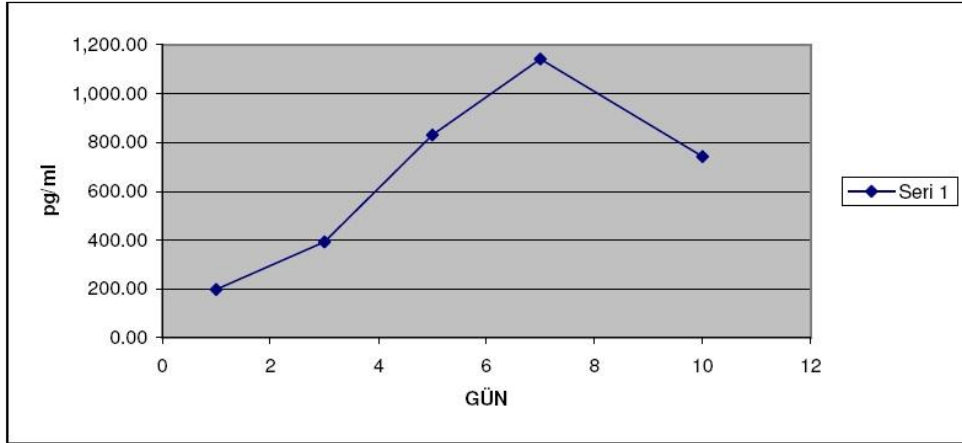
Grup A da fibroblast sayısı diğer gruplarla karşılaştırıldığında (A ve B $p=0.015$, A ve C-D $p<0.001$, Mann Whitney U testi) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti.

ELİSA Testi Değerlendirme Bulguları:

Hücre kültürü mediası 1.3.5.7 ve 10. Günlerde toplanarak her gün için hem kök hücre grubunda hem kök hücre+TZP grubunda büyüme faktörlerinin (VEGF, FGF, TGF β) toplam konsantrasyonları ölçüldü (**Tablo13**).

Tablo 13: Günlere göre ölçülen VEGF toplam konsantrasyon değerleri

GÜN	VEGF pg/ml
1.GÜN	197.93
3.GÜN	391.73
5.GÜN	831.19
7.GÜN	1.142.15
10.GÜN	742.01



Şekil 25: Revaskülarizasyon için kritik dönem olan ilk 7 günlük sürede VEGF konsantrasyonunun giderek arttığı ve 7.gün pik yaptığı görülmektedir.

Her iki grup için tüm büyüme faktörlerinin her güne karşılık gelen konsantrasyon ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi (**Tablo14**).

Tablo 14: Büyüme faktörlerinin 1,3,5,7 ve 10. günlerde ölçülen konsantrasyon değerlerinin ortalama ve standart sapmaları

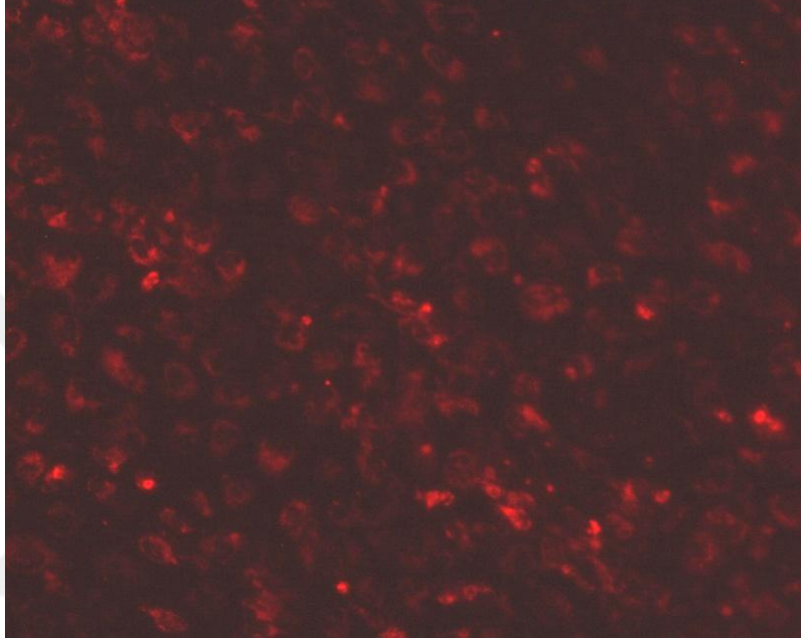
Grup	Faktör - Gün	N	Ortalama	Std Sapma
Kök Hücre	VEGF-1	4	12.7525	0.532439355
	VEGF-3	4	30.16.75	2.43586227
	VEGF-5	4	85.7325	1.657254255
	VEGF-7	4	119.3925	2.577975627
	VEGF-10	4	74.8675	2.183901326
	FGF-1	4	45.3775	5.02248838
	FGF-3	4	89.17	6.12488181
	FGF-5	4	78.6225	92.19336251
	FGF-7	4	168.025	207.0571201
	FGF-10	4	238.4225	212.8781009
Kök Hücre + TZP	VEGF-1	4	36.73	7.411374142
	VEGF-3	4	67.765	9.127155453
	VEGF-5	4	122.065	6.869082908
	VEGF-7	4	166.145	0.702068373
	VEGF-10	4	110.635	6.676268918
	FGF-1	4	746.815	135.0436484
	FGF-3	4	446.24	123.0535664
	FGF-5	4	783.955	161.6243935
	FGF -7	4	752.7075	210.8697869
	FGF -10	4	810.225	122.2694719
Kök Hücre	TGFb -1	8	925.17875	517.463625
	TGFb -3	8	647.83625	317.5677717
	TGFb -5	8	479.24875	248.3751636
	TGFb -7	8	859.1175	356.8065137
	TGFb -10	8	943.78	279.250503
Kök Hücre + TZP	TGFb -1	7	2057.9457	1486.231343
	TGFb -3	8	1154.29125	523.3017055
	TGFb -5	8	640.745	275.6556506
	TGFb -7	8	1101.89	536.4199348
	TGFb -10	8	1564.61125	798.039812

VEGF; her iki grupta da 5 zaman dilimi içinde farklı bulundu (Friedman testi, $p=0.003$).

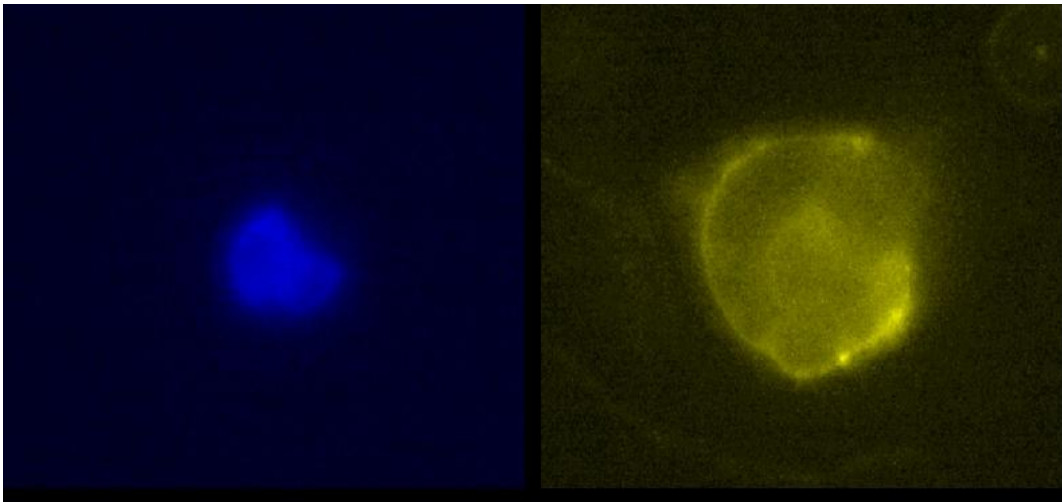
VEGF, FGF, TGF β konsantrasyonları 5 zaman dilimi içinde kök hücre+TZP grubunda daha yüksekti($p<0.05$).

Flörosan Mikroskopi Görüntüleme Bulguları:

Yağ greftine enjeksiyon öncesi hücre kültüründe üretimi yapılarak CM-D1I ile işaretlenen yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerin flörosan mikroskopundaki görüntüleri elde edildi (Şekil 26–27).



Şekil 26: D1I ile işaretli kök hücrelerin floresan mikroskopundaki görüntüleri.



Şekil 27: D1I ve citoks blue ile işaretli kök hücrenin floresan mikroskopundaki görünümü.

TARTIŞMA

Yağ dokunun ototransplantasyonda ilk kullanımı 1889 yılında van der Meulen tarafından bildirilmiştir (60). 1893'te Neuber hemifasyal atrofi tedavisinde normal kontur restorasyonu amacıyla yağ transferini başarıyla gerçekleştirmiştir. Küçük yağ doku parçacıkları ile yumuşak doku depresyonunu doldurmuştur (61). Neuber yağ transplantasyonu ile ilgili bildirisini Alman Cerrahi Derneğinin 22. kongresinde sunmuştur. Bunu Cherny, Lexer ve Rehn'in çalışmaları takip etmiştir (62). Neuber'in ilk denemesinden sonra serbest yağ ototransplantasyonunun sonuçları hayal kırıklığı olmuştur. 1911 de Bruning yumuşak doku augmentasyonu amacıyla subkutan dokuya otolog yağ enjeksiyonunu gerçekleştirmişti (62). 1980' de Illouz yağın dolgu materyali olarak kullanımını tarif etmiştir. 1988'de de 167 vakaya uyguladığı yağ enjeksiyonlarının uzun dönem sonuçlarını sunmuştur(63).

İnsan yağ dokusunda pluripotent kök hücrenin varlığının gösterilmesinden beri bu hücre popülasyonu kemik iliği kaynaklı stromal hücrelerle birlikte hücre tedavisi ve doku mühendisliği için ideal hücre kaynağı oluşturmaktadır. En önemli avantajları; vücuttaki yağ doku miktarının fazla olması, bu dokudaki kök hücre yoğunluğunun yüksek olması ve in vitro oldukça hızlı çoğaltılabilmeleridir. YDKH'ler ile in vitro çalışmalar, Zuk ve ark.'nın, "indüktif" media kullanarak yağ, kemik, kıkırdak ve kasa farklılaşmalarını göstermeleriyle başlamıştır(54). Dokuya spesifik fenotip, histokimyasal boyama ile doğrulanmıştır. Daha sonra yapılan klonal ve moleküler çalışmalar, bu hücre popülasyonunun kök hücre kimliğini ve farklılaşma sürecinin ayrıntılarını göstermiştir(64).

Kök hücreler istenilen hedef dokuya farklılaşabilmek için spesifik büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Son çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin VEGF varlığında in vitro tüp benzeri yapılar oluşturduğu ve endotel hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir(28, 65).Oksijen desteği ile birlikte metabolitlerin hücrelerden elimine edilmesi için yeterli doku perfüzyonu şarttır. Transplantasyon sonrası doku yaşayabilirliği buna bağlıdır.

Yağ dokusu yüksek metabolik aktivesi olan geniş hacimli bir dokudur. Histolojik çalışmalar otolog yağ transplantlarında revaskülarizasyonun 48 saat içinde gerçekleştiğini göstermektedir. Dokuya olan kan desteğinin gecikmesi iskemiye duyarlı olan adipositler için kritik öneme sahiptir. Bu aşamadaki bir gecikme yağ hücrelerinin çekirdek ve hücre membranında harabiyeti içeren dejeneratif değişikliklere neden olur. Adipositlerde nekroz görülür. Bu hücre harabiyetinden sonra yağ doku yavaş yavaş rezorbe olmaya başlar, yerini fibröz doku ve yağ kistleri alır. Revaskularize olmayan bölgelerde yağ kistleri ve vakuoller oluşur. Erken ve yeterli neovaskülarizasyon serbest yağ transplantlarının yaşayabilirliğinde anahtar role sahiptir(66). Nishimura yağ greftindeki volüm kaybının yağ hücresindeki apoptoz nedeniyle olduğunu bildirmiştir(15).

Yağ greftlerinin neovaskularizasyon fazı deri greftlerine benzer ve greftleme sonrası 4. günde başlar. Deri greftlerinde olduğu gibi transplante edilen yağ hücrelerinin de ilk 4 gün plazmatik imbibisyon ile yaşadığına inanılmaktadır. Son çalışmalar greftin tam olarak revaskularize olmasının 7 ile 21. günler arasında olduğunu göstermektedir. Nishmura çalışmasında transplantasyon sonrası 7.günde yeni oluşan mikro damarların bariz olarak arttığını 30 gün içinde ise plato yaptığını saptamıştır (15, 67).

Bu döneme kadar olan zamanda greftin rölatif bir iskemiye maruz kaldığı düşünülebilir. Bu iskemi ve takip eden enflamasyon yağ greftinde ki histolojik olarak görülen nekroz, fibrozis, kist ve vakuol oluşumundan sorumludur. Bazı çalışmalarda lokal kan desteği kazanarak yaşayabilen en büyük yağ partikülünün çapının 1.5+/-0.5 mm arasında değişmekte olduğu vurgulanmaktadır. Daha geniş yağ partikülleri merkeze olan revaskülarizasyonun yetersiz olması sonucu santral nekroz nedeniyle ölmektedir(68, 69, 91). Bu nedenle greftin boyutunun küçültülmesi santral kısmının maruz kalacağı iskemik periyodu azaltarak takip eden enflamatuvar değişiklikleri de azaltacaktır(70).

Neovaskularizasyon iki farklı mekanizma ile oluşmaktadır. Birincisi angiogenez(önceden var olan kapiller ağdan mikrodamarların yayılması). İkinci mekanizma vaskulogenez olarak adlandırılan yeni damar oluşumudur(In situ farklılaşma gösteren endotelyal progenitör hücrelerden kan damarlarının oluşması).Önceleri vaskulogenezin sadece embriyolojik gelişim boyunca oluştuğuna inanılırdı ancak son araştırmalar erişkin vasküler sistemde de oluşabileceğine dair ipuçları vermektedir(71, 89).

Kök hücre çalışmalarının hız kazanmasından önce yağ grefti yaşayabilirliğinin artırılması amacıyla bazı büyüme faktörleri(91), sitokinler, hormon ve ilaçların yağ doku üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 1992’ de Eppley yağ grefti surveyini arttırmak için grefte FGF eklemiştir(21). İnsulinin asetil coA karboksilaz induksiyonu ile yağ sentezini arttırarak yağ dokusuna enjekte edildiğinde yağ dokuda hipertrofi gelişimine katkıda bulunmaktadır. İnsulin ve IGF-1’in in vitro adiposit çoğalma, farklılaşma ve trofik aktiviteleri stimüle ettiği gösterilmiştir(72, 73). Adipojenik aktivitesi olduğu için otolog yağ transplantlarının yaşayabilirliğini arttırmak için insülin de denenmiştir (72, 73).

Selektif beta blokerler adiposit membranında adenilat siklazı bloke ederek lipolizi önlemektedir. Selektif beta1 blokerlerin de yağ grefti yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (74).Lidokain adrenalin, eritropoetin de greft retansiyonunu arttırmak için kullanılan ajanlar arasındadır(75, 86). Yağ greftinin tutmasını arttırmak için IL8 kullanımı sitokinlerin; hücrel proliferasyonu stimüle eden mitojen olarak etki göstermesi ve angiogenezi stimule etmesi özelliklerine dayanır(76). Yağ grefti viabilitesini arttırmada hiperbarik oksijen tedavisinin de etkili olduğu bildirilmiştir(77).

Yağın alınma metodu, enjekte edilen yağın miktarı ve enjeksiyon bölgesi gibi faktörlerde yağ greftinin tutmasını etkilemektedir(78, 84). 2002’de Baran tavşanlarda yaptığı çalışmada vaskularitesi yüksek bölgelere yağ grefti uygulandığında rezorbsiyon oranının daha düşük olduğunu göstermiştir(79).Bu çalışmada iki nedenden ötürü alıcı bölge olarak skalpte subkutan boşluk tercih edilmiştir. Birincisi skalpte endojen yağ olmamasıdır. Alıcı bölge olarak sırt, abdomen, skalp ve bacak kasları karşılaştırıldığında bu bölgenin düşük kan desteğine bağlı olarak yağ retansiyonu en düşük skalpte bulunmuştur. Ayrıca skalp bölgesinde subkutan yağ doku olmamasının çalışma sonunda yağ greftlerinin diseksiyonunu kolaylaştıracağı düşünülerek yağ enjeksiyonu için bu bölge seçildi.

Kök hücre araştırmalarındaki son gelişmeler mezenkimal kök hücre, yağ doku kaynaklı kök hücre ve endotelyal progenitor hücrelerin iskemik dokularda revaskülarizasyonu arttırdığını kanıtlamıştır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler topikal olarak uygulandığında random fleplerin yaşayabilirliğini arttırmaktadır(71).

Otolog yağ transferinde YDKH' ler klinik öneme sahiptir çünkü YDKH akut fazda endotelyal progenitör hücre ya da angiogenik faktör serbestleyici hücre olarak etkiyerek neoangiogeneze katkıda bulunur (90). YDKH proangiogenik, antiapoptotik ve proadipojenik etkileri olan VEGF, HGF ve IGF-1sekrete edebilir (88). Yağ hücresi viabilitesi ve adipogenezi arttırmada gerekli olan faktörler VEGF, FGF, PDGF ve IGF-1'dir. Yağ greftine eklendiğinde YDKH; revaskularizasyonu arttırmak, apoptozu azaltmak ve preadiposit farklılaşmasını arttırmak suretiyle yağ grefti yaşayabilirliğini artırır(87, 92). GFP transgenic farelerin inguinal yağ yastıklarından izole edilen YDKH'nin in vivo adipogenezi induklediği gösterilmiştir(94). Yağ doku kaynaklı kök hücre ilavesi yağ greftinin uzun dönem retansiyonunun yanı sıra kalitesini de arttırmaktadır. Araştırmamız sırasında makroskopik olarak kök hücre uygulanan gruplardan eksize edilen yağ greftlerinin vaskularitesinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Angiogenez terimi ilk kez plasentadaki yeni damar oluşumunu tarif etmek için 1953'te kullanıma girmiş ve daha sonra tüm yeni damar oluşumları için kullanılır olmuştur. Angiogenez çeşitli angiogenik faktörler tarafından başlatılıp yönlendirildiği bilinen kompleks bir mekanizmadır Angiogenez sırasında endotel hücreleri matriks proteinazları gibi proteazlar üreterek hücre göçü ve çoğalma yeteneklerini arttırmaktadır. Bu olay VEGF, FGF, TGFβ ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin aktivitesine bağlıdır.

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri fibroblast, osteoblast ve endotel hücreleri gibi mezenkimal hücrelerin replikasyonunu uyararak yağ greftindeki prekürsor adipositlerin matür formlarına farklılaşmasında rol oynarlar(80). VEGF angiogenez ve endotel hücre çoğalmasını uyararak damar geçirgenliğini artırır. Angiogenik etkisinin yanı sıra VEGF iskemik hasara karşı endotel hücrelerini korur(65, 85).

Önceleri vasküler permeabilite faktörü olarak bilinen VEGF bu güne kadar tanımlanmış en spesifik endotelial angiogenik faktördür(61, 81).

Angiogenезin ilk basamaklarında vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollejenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine angiogenез için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak dokuda angiogenезi başlatır. Doğrudan mitotik etkisinin yanında, VEGF bir taraftan kısmen nitrik oksit sentezini uyarak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder(96). Yağ hücresi apoptoz oranının azalması greft revaskülarizasyonu için son derece önemlidir. Kendi salınımından sonra diğer proteoglikan bağımlı salınımı olan büyüme faktörlerinin(FGF) salınımında uyarır. VEGF topikal ya da intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulandığında cilt flepleri gibi iskemik dokularda revaskülarizasyonu arttırmaktadır(82, 83).

In vitro ELİSA testi ile yaptığımız değerlendirmede TZP ile kombine edilen yağ doku kaynaklı kök hücrelerin hücre kültürü mediasına salgıladığı VEGF seviyeleri sadece kök hücrelerin salgıladığından daha yüksek bulunmuştur. Yağ grefti revaskülarizasyonunda kritik dönem olan ilk 4–7 günlük sürede VEGF konsantrasyonunda anlamlı bir artış görülmüştür. TZP ile kombine edilen kök hücre grubundan eksize edilen yağ greftlerinde daha fazla sayıda kapiller yapıların saptanmış olması artmış VEGF konsantrasyonuna bağlıdır. Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin TZP ile kombine edilerek yara modeline uygulandığında yara iyileşmesinin hızlandığı saptanmıştır(98). Tek bir angiogenik faktör angiogenезi stimüle etmede yetersiz kalabilir. Bu nedenle yağ doku kaynaklı kök hücrelerin TZP ile kombine edilerek uygulanması daha yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü salınımına yol açarak yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmaktadır

SONUÇ

Revaskularizasyon greft yaşayabilirliğinde oldukça önemlidir. Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin trombosit zengin plazma ile kombine edilerek yağ greftine uygulanması sinerjistik etkiyle revaskularizasyonu ve buna bağlı olarakta yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmaktadır.

Hücrel tedavi ile birden fazla büyüme faktörünün uygulanması yağ greftinin volümünün korunması ve surveyinin uzatılmasında etkili bir yoldur. Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin trombosit zengin plazma ile kombine edilmesi tamamen otolog bir tedavi şekli olarak yağ grefti uygulamalarının etkinliğini arttıracaktır.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı yağ doku kaynaklı kök hücre ve trombosit zengin plazmanın kombine edilerek kullanılmasının yağ grefti yaşayabilirliği üzerine etkilerini araştırmaktır.

Deneyimizde izojen transplantasyon için inbred Fisher 344 sıçanlar kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı(n=10)Yağ greftlerine Grup A'da DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium),Grup B'de trombosit zengin plazma, Grup C' de yağ doku kaynaklı kök hücre, Grup D'de YDKH ve TZIP kombinasyonu uygulandı.3 ay sonra sonra yağ greftlerinin ekstirpasyonu yapıldı. Ağırlık ve volüm ölçümleri ile gruplar arasında yağ retansiyonu karşılaştırıldı.

Histolojik incelemede her gruptan alınan örneklerde kist, vakuol, fibroblast, intakt adiposit ve kapiller sayıları karşılaştırıldı. Hücre kültürü süpernatantı ile in-vitro yapılan ELİSA testinde kök hücre ve trombosit zengin plazma ile kombine kök hücre grupları arasında büyüme faktörlerinin(VEGF, TGF β ,FGF) seviyeleri karşılaştırıldı.

Yağ greftlerinin 3 ay sonra yapılan ekstirpasyonlarında greft retansiyonunun diğer gruplarla karşılaştırıldığında en fazla Grup D' de olduğu görüldü. Grup A' da ağırlık ve volüm kaybı diğer gruplardan daha fazlaydı.İntakt adiposit ve kapiller sayılarıda Grup D'de diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksekti.TZIP ile kombine edilen kök hücre grubunda büyüme faktörü konsantrasyonları daha yüksekti.

Sonuç olarak yağ doku kaynaklı kök hücrelerin trombosit zengin plazma ile kombine kullanımı sinerjistik etkiyle revaskülarizasyonu ve buna bağlı olarak yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmıştır.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the effect of combined use of adipose derived stem cell and platelet rich plasma on fat graft survival.

In the experiment, inbred Ficher 344 rats were used for isogenous form of transplantation. Rats were seperated into 4 groups(n=10).Group A was the operative control group, in group B platelet rich plasma, in group C D1I labeled adipose derived stem cell and in group D the combination of platelet rich plasma and D1I labeled adipose derived stem cell were applied to the fat grafts.

In histologic examination the number of capillary structures, cyst vacuoles, fibroblasts and intact adipocytes were compared between groups. In vitro growth factor(VEGF, TGF β ,FGF)levels of supernatant were compared between stem cell and stem cell plus platelet rich plasma group using the enzyme- linked immunosorbent assay method.

In group D there was more grafted fat retained 3 months later. The loss of graft mass was more significant in group A than the other groups. The number of capillary structures and intact adipocytes were significantly higher in group D.The level of growth factors were significantly higer in stem cell plus platelet rich plasma group.

In conclusion, the combined use of adipose derived stem cells and platelet rich plasma synergistically increase revascularization and fat graft survival.

KAYNAKLAR

- 1- Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long term result of vocal kord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104:871–874.
- 2- Micaklian DO, Lowry LD, Sataloff RT. Lipoenjection for unilateral vocal kord paralysis. *Laryngoscope*. 1991; 101: 465–468.
- 3- Mayfield FH. Autologous fat transplants for the protection and repair of the spinal dura. *Clin Neurosurg* 1980;27:349–361.
- 4- Domergue S, Psomas C, Yachouh J, Lesnik A,Reynes J, Goudot P.Fat microinfiltration autografting for facial restructuring in HIV patients. *J Cranio maxillofacSurg* 2006; 34(8):484–488.
- 5- Shakhov AA. Fat transplantation and breast augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 2002;26: 323–325.
- 6- Tzikas TL. Autologous fat grafting for midface rejuvenation. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2006; 14: 229–240.
- 7- Butterwick KJ. Lipoaugmentation for aging hand: a comparison of the longevity and aesthetic results of centrifuged versus non centrifuged fat. *Dermatol Surg*. 2002; 28: 987–991.
- 8- Craft RO, Rophael J,Morrison WA, Vashi AV, Mitchell GM, Penington AJ: Effect of local, long-term delivery of platelet derived growth factor (PDGF) on injected fat graft survival in severe combined immunodeficient(SCID) mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62: 235–243.
- 9- Cervelli V, Palla L, Pascali M, De Angalis B, Curcio BC, Gentile P: Autologous platelet-Rich Plasma Mixed with Purified Fat Graft inAesthetic Plastic Surgery. *Aesthetic Plast Surg* 2009;33:716–721.
- 10- Fraga MFP, Nishio RT, Ishikawa RS, Perin LF, Jr AH, Malherios CA. Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*2010; 63(12):818–822.

- 11- Kassolis JD, Reynolds MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet rich plasma in subantral sinus segmentation. *J Craniofac Surg* 2005, 16: 280–287.
- 12- Lu Feng, Li J, Gao JH, Ogawa R, Ou C, Yang B, Fu B. Improvement of the Survival of Human Autologous Fat Transplantation by Using VEGF-Transfected Adipose-Derived Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;124:1437–1446.
- 13- Miranville A, Haeschen C, Sengenès C. Improvement of postnatal neovascularisation by human adipose tissue derived stem cells. *Circulation* 2004; 110:349.
- 14- Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:572.
- 15- Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope* 2000; 110:1333–1338.
- 16- Chajchir A, Benzaquen I. Fat grafting injection for soft tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg* 1989;84: 921–934.
- 17- Chajchir A, Benzaquen I, Wexler E: Fat injection. *Aesthetic Plast Surg* 1990;14(2)127–136.
- 18- Chajchir A, Benzaquen I, Moretti E. Comparative experimental study of autologous adipose tissue processed by different techniques. *Aesthetic Plast Surg* 1993; 17: 113–115.
- 19- Moscana R, Shoshani O, Lichtig H. Viability of adipose tissue injected and treated by different methods: an experimental study in rats. *Ann Plast Surg* 1994;33:500–506.
- 20- Ellenbogen R: Free autogenous pearl grafts in the face: a preliminary report of a rediscovered technique. *Ann Plast Surg* 1986;16: 179–194.
- 21- Eppley BL, Siders RA, Platis JM: Bioactivation of free fat transfers: a potential new approach to improving fat graft survival. *Plast Reconstr Surg* 1992;90: 1022–1030.
- 22- Nakamura S, Ishiara M, Takikawa M, murakami K, Kishimoto S, Nakamura S, yanaggiboyashi, Satoshi K, Yamamoto N, Kiyosawa T: Platelet-Rich Plasma (PRP) Promotes Survival of Fat-Grafts in Rats. *Ann Plast Surg* 2010; 65: 101–106.

- 23- Cervelli V, de angelis B, Lucarini L, Spallone D, Balzani A, Palla L, Gentile P, Cerulli P: Tissue Regeneration in Loss of substance on the lower limbs through Use of Platelet-Rich Plasma, Stem Cells from adipose tissue, and Hyaluronic Acid. *Adv Wound Care* 2010; 23(6):262–272.
- 24- Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states *Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue*. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(4):671–683.
- 25- Klaus S, Ely M, Encke D, Heldmaier D: Functional assesment of white and Brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture. *journal of Cell Science* 1995;108:3171–3180.
- 26- Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol* 1998; 275: 1399–1411.
- 27- Cinti S. The adipose organ: morphologic perspectives of adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(3): 319-328.
- 28- Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, Delonge L, De la Brettone J. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metab Clin Exp* 200;50: 425–435.
- 29- Conley C. Hemostasis. In V. B Mountcastle, *Medical Physiology*. St Louis: Mosby 2004; 1137–1146.
- 30- Harrison P, Cramer E. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7: 52.
- 31- Rendu F, Brohard B. The platelet release reaction: granules constituents, secretions and functions. *Platelets* 2001;12(5): 261–273.
- 32- Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-Rich Plasma: A review of Biology and Applications in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(6): 147–159.
- 33- Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet Rich Plasma. Biology and New Technology. *Journal of Craniofacial surgery* 2005;16(6): 1043–1051.
- 34- Piere GF, Mustoe TA, Altrock BW, Douel TF, Thomason A. Role of Platelet Derived Growth Factor in wound healing. *J Cell Biochem* 1991;45:319–326.

- 35- Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich Plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:362–369.
- 36- Khan Sn, Bostrom MP, Lane JM. Bone Groth Factors. *Orthop Clin North Am* 2000;31: 375–388.
- 37- Rendu F, brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules, constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12(5):261–273.
- 38- Arora NS, Ramanayakae T, Ren YF, Romanos GE: Platelet-Rich Plasma: A literature Review. *Implant Dent* 2009;18(4):303–308.
- 39- Marx RE. Platelet-Rich Plasma(PRP):What is PRP and What is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10:225.
- 40- Weibrich G, Kleis WK, Kostamanolakis M.correlation of platelet concentration in platelet rich plasma to the extraction method, age, sex and platelet count of the donor. *Int. J. Oral maxillofac. Implants*2001; 16(5):693–699.
- 41- Babush CA, Kevy SV, Jacobson MS. An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 2003;12:24–34.
- 42- Liu Y,Kalen A, Risto O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is ph dependent. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 336.
- 43- Herzog EL, Cahi L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102:3483–93.
- 44- Can A, Karahuseyinoglu S.Concise review: Human umbilical Kord stroma with regard to the source of fetus derived stem cells. *Stem Cells* 2007;25: 2886–2895.
- 45- Yarak S, Okamoto OK. Human adipose- derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol*2010; 85(5): 647–56.
- 46- De Wert G, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod.* 2003, 18(4):672–82.

- 47- Van Damme A, vanden Driessche T, Collen D, Chuah MK: Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene ther* 2002;2(2):195–209.
- 48- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116:769–778.
- 49- Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976; 4: 267–74.
- 50- Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells *Ann NY Acad Sci* 2009;1176: 101–117.
- 51- Keating A. Mesenchymal Stromal Cells. *Current Opinion in Hematology* 2006, 13:419–425.
- 52- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 2006; 8:315–317.
- 53- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991, 9(5): 641–650.
- 54- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for cell-Based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7(2):211–228.
- 55- Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 2008; 32(1):48–55.
- 56- Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal stem Cells: A User's Guide. *Stem cells Dev* 2010 19(10):1449–1470.
- 57- Zymny MW, Walenko K. Stem Cells from Adipose Tissue. *Cell Mol Biol Lett* 2011;16: 236–257.
- 58- Yoshimura K, Shiueura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006; 208(1):64–76.
- 59- Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(4): 1163–1171.

- 60- Rieck B, Schlaak S. Measurement in vivo of the Survival rate in Autologous Adipocyte Transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(7):2315–2323.
- 61- Yi CG, Xia W, Zhang LX, zhen Y, Shu MG, Han Y, Guo SZ. VEGF gene therapy for the survival of transplanted fat tissue in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; 60:272–278.
- 62- Sommer B, Sattler G. Current concepts of Fat Graft Survival: Histology of aspirated adipose tissue and review of the Literature. *Dermatol Surg* 2000; 26. 1159–1166.
- 63- Fraga MF, Helene A Jr, Nakamura F, Lellis RF, Kikuchi W, Esteban D. Comparative study of the integration and viability of autonomised and nonautonomised autologous fat tissue grafts- experimental model in rabbits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61:1044–1048.
- 64- Zuc PA, Zhu M, Ashjian P. Human Adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13,4279–4295.
- 65- Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, Guo S. Mesenchymal Stem Cells Transduced by endothelial growth Factor Gene for Ischemic Random Skin Flaps. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(1):59–69.
- 66- Yi C, Pan Y, Zhen Y, Zhang L, Zhang X, Shu M, Han Y, Guo S. Enhancement of Viability of Fat Grafts in Nude Mice by Endothelial Progenitor Cells. *Dermatol Surg* 2006, 32,1437–1443.
- 67- Aygit C, Sarikaya A, Doğanay L, Top H, Cakır B, Fırat F. The fate of Intramuscularly Injected fat Autografts: An Experimental Study in Rabbits. *Aesthetic Plast Surg* 2004; 28: 334–339.
- 68- Nicchajev I, Sevcuk O. Long-term results of fat transplantation. Clinical and Histologic studies. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94.496.
- 69- Carpenada CA, Riberio MT. Study of the histology alterations and the viability of the adipose graft in humans. *Aesthetic Plast Surg* 1993; 17.43.
- 70- Locke MB, Tristan MB. Current Practice in Autologous Fat Transplantation. *Ann Plast Surg* 2008; 60(1):98–102.
- 71- Lu F, Mizuno H, Uysal C, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved Viability of Random Pattern Skin Flaps through the Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121(1):50–58.

- 72- Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, Wamsley S, Jensen J, Boutros S. Increased Free Fat-Graft Survival with the Long-Term, Local Delivery of Insulin, Insulin Like Growth Factor-I, and Basic Fibroblast Growth Factor by PLGA/PEG Microspheres. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105(5):1712–1720.
- 73- Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, Teller WM. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* 1995; 44: 45-49.
- 74- Ayhan M, Şenen D, Adanalı G, Görgü M, Erdogan B, Albayrak B. Use of Beta Blockers for Increasing Survival of Free fat Grafts. *Aesthetic Plast Surg* 2001; 25: 338–342.
- 75- Shoshani O, Berger J, Fodor L. The effect of lidocaine and adrenaline on the viability of injected adipose tissue—an experimental study in the nude mice. *J Drugs Dermatol* 2005; 4: 311–316.
- 76- Shoshani O, Livne E, Armoni M, Shupak A, Berger J, Ramon Y. The Effect of Interleukin-8 on the Viability of injected adipose Tissue in Nude Mice. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115(3):853–859.
- 77- Shoshani O, Shupak A, Ullmann Y, Ramon Y, Gilhar A, Kehat I, Peled IJ. The Effect of Hyperbaric Oxygenation on the Viability of human Fat injected into Nude Mice. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2000; 106(6):1390–1396.
- 78- Karacaoğlu E, Kızılkaya E, Cermik H, Zienowicz Z. The role of Recipient Sites in Fat-Graft Survival. *Ann Plast Surg* 2005; 55(1):63–68.
- 79- Baran CN, Celebioğlu S, Sensoz O, Ulusoy G, Civelek B, Ortak T. The behaviour of fat grafts in recipient areas with enhanced vascularity. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109(5):1646–1652.
- 80- Por YC, Yeov VK, Louri N, Lim T, Kee I, Song IC. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude Mouse. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009; 62: 1030–1034.
- 81- Gurunluoglu R, Ozer K, Skugor B. Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. *Ann Plast Surg* 2002; 49(2):161–169.
- 82- Li QF, Reis ED, Zhang WX. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg* 2000; 16(1):45-49.

- 83- Zang F, Ficher K, Komorowski TE. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 2001; 46(3):314–319
- 84- Piasecki JH, Gutowski KA, Lahvis GP, Moreno K. An Experimental Model for Improving Fat Graft Viability and Purity. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119(5):1571–1583
- 85- Ming L, Qing S, hao P, Yu-Lan L. Effect of rhVEGF transfection on survival of grafts after autologous free granular fat transplantation in rats. *Chin J Traumatol* 2008; 11(1):49–53.
- 86- Hamed S, Egozi D, Kruchevsky D, Teot L, Gilhar A, Ullmann Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *PLoS One* 2010; 5 (11):e13986.
- 87- Kim M, Kim I, Lee SK, Bang SI, Lim SY. Clinical Trial of autologous Differentiated Adipocytes from Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Dermatol Surg* 2011;37: 750–759.
- 88- Rehman J, Traktuev D, Li J, Clauss S, Grove C, Pell C, Johnstone BH, Considine RV March K. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 52–58.
- 89- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloume A. Improvement of Postnatal Neovascularization by Human Adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110:349–355.
- 90- Bhang SH, Cho SW, Lim JM, Kang JM, Lee TJ, Yang HS, Song YS, Park MH, Kim HS, Yoo KJ, Jang Y, Laner R, Anderson D, Kim BS. Locally Derived Growth Factor Enhances the Angiogenic Efficacy of Adipose-Derived Stromal Cells Transplanted to Ischemic Limbs. *Stem Cells* 2009; 27: 1976–1986.
- 91- Yamaguchi M, Matsumoto F, Bujo H, Shibasaki M, takahashi K, Yoshimoto S. Revascularization Determines Volume Retention and Gene Expression by Fat Grafts in Mice. *Exp Biol Med* 2005; 230: 742–748.
- 92- Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K. Fibroblast growth factor–2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research communications* 2007; 359: 239–244.

- 93- Sarfati I, Ibrahimi T, Kaufman G, Nos C, Clough KB. Adipose-tissue grafting to the post-mastectomy irradiated chest wall: preparing the ground for implant reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2011;64(9):1161–1166.
- 94- Gimble JM, Guilac F, Bunnell BA. Clinical and Preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(2):19.
- 95- Mizuno H, Itoi Y, Kawahara S, Ogawa R, Akaishi S, Hyakusoku H. In vivo adipose tissue regeneration by adipose derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice. *Cell Tissue Organs* 2008; 187(3): 177–185.
- 96- Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M. Vascular endothelial growth factor(VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival on a random flap in rat. *Br J Plast Surg* 2003;56: 653–659.
- 97- Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology* 10th ed. McGraw-Hill, New York, Chapter 6, 2003.
- 98- Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley B. Adipose Stromal Cells and Platelet-Rich Plasma Therapies Synergistically Increase Revascularization during Wound Healing.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın maliyeti Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri koordinatörlüğü tarafından karşılanmış olup, çalışma Gülhane Askeri tıp Akademisi Araştırma Geliştirme Merkezi'nde (AR-GE) yapılmıştır.

Ficher 344 inbred sıçanların yurtdışından ithalatında yardımcı olan MKM şirketi yetkililerine, araştırma süresince deney hayvanlarının bakımı ile ilgilenen Vet Dr. Sema Dalgıç'a, cerrahi aşamısında teknik yardımlarından dolayı Vet Dr. Mehmet Cengiz'e, araştırmacılara sağladığı her türlü kolaylık ve destekten ötürü AR-GE cerrahi birimi sorumlusu Vet Dr. Tayfun Ide'ye, kök hücrelerin elde edilmesinde büyük bir özveri ile çalışan Biolog Pınar Elçi ve biolog Meral Sarper'e, kök hücre elde edilmesinde ve trombosit zengin plazma hazırlanmasında görüşlerinden faydalandığım GATA Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali Uğur Ural ve Doç Dr. Ferit Avcı'ya, çalışmanın planlanması aşamasında fikir ve katkılarından dolayı Başkent Üniversitesi Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr Çağrı Uysal'a, çalışmanın histolojik değerlendirmesini yapan GATA Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Armağan Çağlayan ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr. Mustafa Cihad Avunduk'a, çalışmanın tüm zahmetli aşamalarında bana yardımcı olan sevgili dostum GATA Plastik Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr Doğan Alhan'a,

Bütün cerrahi eğitimim boyunca manevi desteğini daima yanımda hissettiğim kliniğimizin kurucusu, tez danışmanım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nedim Savacı'ya teşekkür ederim.

Dr.Nevra SEYHAN