



T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi

**“Tamoksifen Verilen Ratlarda
Deferoksamin’in İnteraperitoneal ve Lokal
Uygulamasının Otolog Yağ Grefti
Yaşayabilirliği zerine Etkisinin
Araştırılması”**

Dr. Burak Yaşar
Tıpta Uzmanlık Tezi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği
Danışman: Op.Dr.Murat İğde
Ankara-2018

ÖNSÖZ

Konuşmayı, yürümeyi bilmeyen bir insan yavrusuyken beni yetiştiren, okuyan, düşünen, üreten bir insan olmamı sağlayan Sevgili Anneme-Babama ve aileme,

Plastik Cerrah olma yolunda bilgi, beceri ve tecrübelerini esirgemeyen, beni yetiştiren Sayın Hocam Prof. Dr.Ramazan Erkin Ünlü'ye, Tez danışmanım Op.Dr.Murat İğde'ye,

Eğitimimde çok büyük emekleri olan: Op.Dr.Sedat Yıllancı, Op.Dr.Necip Cihan Hasçıçek, Op.Dr. M.Onur Öztürk, Op.Dr. Ali Rıza Yıldırım, Op.Dr.Mehmet Tapan ve Op.Dr.Alper Burak Uslu'ya,

Çalışmaktan her an keyif aldığım, çok şeyler öğrenip birlikte cerrahiyi keşfettiğim çok kıymetli arkadaşlarım Dr. Hasan Murat Ergani, Dr. Ahmet Kaplan, Dr. Ömercan Yağız Öksüz, Dr.Atakan Baş, Dr. Çağdaş Duru, Dr. Okan Acicbe, Dr. Özge Utku'ya,

Ameliyathane hemşirelerimiz, Sıddıka Açıdal, Gülşen Toprak, Funda Halihoş, Gülşen Yetiş'e, Klinik hemişerlerimize ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayat arkadaşım, her an desteğini esirgemeyen yol arkadaşım, hayatımı güzelleştiren sevgili eşim Dr. Merve Alyamaç Yaşar'a,

Kalpten teşekkür ve saygılarımla...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER	3
KISALTMALAR	4
RESİMLER DİZİNİ	5
TABLolar DİZİNİ	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Yağ Dokusu	9
2.2. Yağ Greftinin Tarihçesi ve Özellikleri	10
2.3. Desferioksamin Hakkında Genel Bilgiler	12
2.4. Tamoksifen Hakkında Genel Bilgiler	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	32
7. ÖZET	33
8. İNGİLİZCE ÖZET	34
9. KAYNAKLAR	35

KISALTMALAR

- ABC** : Avidin Biotin Complex
ASCs : Adiposit Derived Stem Cells
DAB : 3,3- diaminobenzidine
DFO: Deferoxamine
EGF : Epidermal Growth Factor
ER: Östrojen Reseptörü
FGF : Fibroblast Growth Factor
H-E : Hematoksilen – Eozin
HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 alpha

IM : Işık Mikroskobu
PBS : Phosphate Buffered Saline
PHDs : Prolyl Hydroxylase Domain Containing Enzymes
PRP : Platelet Riched Plasma
SERM: Selektif östrojen reseptör modülatörü
TAM: Tamoksifen Citrate
TRAM: Transvers Rectus Abdominis Myocutaneous
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 1. Desferrioksamin 12

Resim 2. Tamoxifen citrate 13

Resim 3. Sıçanlara deney tablasında pozisyon verilerek ayaklarının tespit edilmesi 16

Resim 4. İnguinal bölgeye 2-3 cm' lik insizyon yapılması 17

Resim 5. Künt diseksiyon sonrası yağ dokusunun çevre dokulardan serbestleştirilmesi ve eksize edilmesi 18

Resim 6. Hassas tartı 19

Resim 7. Taşıırma yöntemi 19

Resim 8. Yağ greftinin hazırlanan alana yerleştirilmesi 20

Resim 9. Yağ greftinin eksizyonu 21

Resim 10: TAM ve lokal DFO verilen grupta, 2 düzeyinde fibrozis ve inflamasyon 28

Resim 11: TAM ve sistemik DFO verilen grupta, 1 düzeyinde fibrozis ve vakuol oluşumu 28

Resim 12: TAM ve lokal DFO verilen grupta neovaskülerizasyon bulguları 29

Resim 13: TAM grubunda izlenen vakuol oluşumu 29

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Grup 1'deki (Kontrol grubu) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları 23

Tablo 2. Grup 2'deki (Sadece Tamoksifen verilen grup) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları 24

Tablo 3. Grup 3'teki (Lokal desferioksamin grubu) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları 25

Tablo 4. Grup 4'teki (Sistemik desferioksamin grubu) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları 25

Tablo 5. Greftlerin hacim ve ağırlık değişimleri 26

1. GİRİŞ

Otolog yağ grefti uygulamaları hem estetik hem de rekonstrüktif amaçlarla kullanılmakta olup plastik cerrahi pratiğindeki en sık uygulamaların başında gelir. (1, 2) Otolog yağ grefti ilk olarak 1893 yılında Neuber tarafından fasiyal atrofi, Romberg hastalığı, atrofik skar ve meme operasyonlarında mass greft olarak kullanılmıştır. (3) 1911'de Brunning yağ dokuyu alıcı subkutan dokuya yerleştirerek yumuşak doku dolgunluğu sağlayan metodu geliştirmiştir. (4) Yağ greftinin günümüzdeki kullanımını ise 1986'da Illouz'un liposuction ile yağ eldesi yöntemine dayanmaktadır. (5)

Günümüzde yağ greftleri sadece yüz ve vücut şekillendirme ameliyatlarında değil aynı zamanda yanık skarları, velofaringeal yetmezlik, travma, konjenital deformiteler ve tümör cerrahisi sonucu oluşan doku defektlerinin doldurulmasında kullanılmaktadır. (6, 7) Rekonstrüktif cerrahide çok yönlü bir araç olan otolog yağ dokunun, meme rekonstrüksiyonlarında da kullanımı yaygınlaşmaktadır. (8) Meme kanseri sonrası total ve parsiyal meme rekonstrüksiyonunda yağ grefti kullanımının sonuçları iyileştirdiğine dair yayınlar giderek artmaktadır. (9, 10) Yağ dokusu implantlar gibi inert olmaması, aksine metabolik olarak aktif, birçok hormon, sitokin ve growt faktör salgılayan, radyasyona maruz kalmış dokuda dahi rejeneratif fonksiyonları olan bir doku olması yönüyle ön plana çıkmaktadır. (11, 12) Otolog yağ greftinin restoratif ve rekonstrüktif kalitesi içerdiği yağ dokusuyla birlikte transfer edilen (6) Adiposit-derived mesenchymal stem cells (ASCs) bulunmasıyla ilişkilidir. (11) Öte yandan, Radyoterapi, kemoterapi ve hormonal terapi gibi kanser tedavisi alan hastalardaki kötü yara iyileşmesi, ASCs'nin hücrel fonksiyonlarını sınırlamaktadır. (13)

Tamoxifen (TAM), östrojen reseptör (ER) antagonistidir. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri hastalarında yaygın kullanımı olan ve meme kanseri insidansını azaltan hormonal terapilerdendir. (14) Mastektomi sonrası klinik takipte hastalar selektif östrojen reseptör modülatör (SERM)lerini 5 yıla kadar kullanırlar. TAM'in endotel hücre proliferasyonunu engellediği, vascular endotelial growt factor (VEGF) salınımını azalttığı, mikrovasküler flep komplikasyonlarını arttırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (15-17) Buna ek olarak in vitro çalışmalarda TAM'ın ASClerde apoptozise neden olduğu, ASCs proliferasyonunu, ASCs multipotent hücre farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir. (18)

Öte yandan, otolog yağ grefti içindeki adipositlerin, ASCslerin çoğu serbest yağ doku etrafındaki vasküler desteğin azalmasına bağlı olarak hipoksi ve iskemi sonucu apoptoza uğrar. Greft kaybı vakaların %40-60'ında meydana gelir. (19, 20) Otolog yağ greftlerinin tahmin edilemeyen nekroz oranı, tekrar eden greft uygulamalarına, nekroza bağlı kist formasyonu oluşumuna neden olabilir ve bu durumlar otolog yağ greftlerinin en önemli dezavantajlarıdır. (7, 19, 20) Yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla Platelet Riched Plasma (PRP), kök hücre uygulamaları gibi birçok metod kullanılmıştır ve bu yöntemlerin başarı oranları değişkenlik göstermektedir. (21-23) Maalesef, yağ grefti hazırlanmasında bir çok farklı teknikler tanımlanmış olmasına rağmen, yağ grefti hazırlanmasında da ideal bir yöntem tanımlanmamıştır. (21, 22, 24)

Deferoxamine (DFO), bir demir şelatörüdür aynı zamanda anti-oksidan, antiviral, kök hücre aktivatörü ve immün modülatuar özellikler göstermektedir. (25, 26) Buna ek olarak hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) aktivitesini arttırarak anjiogenik growth faktörlerin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. (27, 28) Daha da önemlisi DFO anjiogenic ve antioksidan özellikleriyle yağ grefti sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir. (29)

Biz bu çalışmamızda yağ grefti sağ kalımında en önemli faktörün yağ grefti vasküleritesi olduğunu göz önünde bulundurarak DFO'in TAM verilen ratlardaki yağ grefti yaşayabilirliğine olan etkisini araştırmayı amaçladık. Endotel hücre proliferasyonunu azaltan, VEGF salınımını azaltan, in vitro çalışmalarda ASCs'de apoptozise neden olan TAM'ın bu etkilerini DFO ile geriye çevirilebileceğini bunun sonucunda DFO'nun TAM'a rağmen yağ grefti yaşayabilirliği arttıracığı hipotezini kurduk.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Dokusu

Yağ dokusu mezenkimal kaynaklıdır. Temel olarak adipositlerden oluşur. Adipositler ile birlikte stromal vasküler komponent adı verilen hücre grubu bulunmaktadır. Bu hücre grubunda nötrofil, makrofaj, fibroblast, perisit, endotel hücreleri ve kök hücreler bulunmaktadır.(30) Bu kök hücreler mezenkimal kaynaklı kök hücreler ADSCs' lerdir.(31) Bu hücreler, her üç embriyonik tabaka hücrelerine dönüşme potansiyeline sahiptir. Yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerinin hem in vitro hem de in vivo olarak kemik, kıkırdak, kas ve sinir dokusuna dönüştüğü gösterilmiştir.(32, 33) Yağ dokusu beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşittir. İnsan vücudunda esas olarak beyaz yağ dokusu bulunmaktadır. Kahverengi yağ dokusu yeni doğan dönemde vücudun belli bölgelerinde bulunur ve yaş ilerledikçe miktarı azalmaktadır. (34) Beyaz yağ dokusunun temel görevleri mekanik travmalara karşı iç organları, iskelet sistemini korumak ve yağ depolamaktır. Bunun yanında endokrin ve metabolik olaylarda görev aldığı ortaya çıkmıştır. Leptin, adipositlerden salınan bir hormondur ve beyin ile periferik organlara etki eder. Salınımı tokluk durumunda artar, açlık durumunda azalır. (35) Beyindeki reseptörlere bağlanarak beyne tokluk sinyalinin iletir. Farelerde yapılan çalışmalarda leptin veya leptin reseptör eksikliği durumunda obezite görüldüğü ortaya konmuştur. Yağ dokusundan peptid yapıda bir takım medyatörler de salınmaktadır. Bunların ortak adı adipokinlerdir. Bunlar metabolik ve enflamatuar olaylarda görev almaktadır. Adipokinlerin en önemlilerinden olan adiponektin kas dokusunda ve karaciğerde reseptörlere sahiptir. Glukoz ve yağ metabolizmasında görev alır. Yapılan çalışmalarda düşük adiponektin düzeyinin obezite, insülin rezistansı, diyabet, yüksek kan basıncı, proenflamatuar durum ve koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. (35) Yağ dokusu zengin bir damarsal ağa sahiptir. Her bir yağ hücresi bir kapiller ağ ile temas halindedir. Yağ hücresinin çapı 50-150 mikrometredir ve yaşam süresi birkaç yıldan 10 yıla kadar değişmektedir. Kök hücreler perivasküler olarak yerleşim gösterir ve perisit ile adiposit arasında yer alır. Bu hücreler iskemiye sekonder anjiyojenik faktör salgılar ve fizyolojik olarak vasküler endotelial hücrelere dönüşürler.(36) Yaşlılarda yağ dokusunun azalması ile bu kök hücrelerin sayısı da azalmaktadır ve dolayısıyla fizyolojik "turnover" bozularak yıkım yapımın önüne geçmektedir. Yağ dokusu vücutta en yüksek doku parsiyel oksijen basıncına sahip dokudur. Bunun sebebi zengin kapiller ağının olması ve düşük oksijen tüketimi olmasıdır. Yağ dokusunda iskemiye en hassas hücreler adipositlerdir. Kök hücreler ise ciddi iskemide üç gün süre ile canlı kalabilirler. (37) Doku hasarında oluşan enflamatuar süreçte ortaya çıkan medyatörler nedeni ile yıkım devam eder. Ancak hasarlı hücrelerden salınan medyatörler kök hücreleri aktive ederek, hem proliferasyonu tetikler hem de kök hücrelerinin salgıladığı büyüme faktörleri ile fibrojeniz bastırılmaya çalışılır.

Yağ dokusunun son zamanlarda keşfedilen ve üzerinde halen çalışılan metabolik, hormonal özellikleri ile içerdiği kök hücreleri bilim adamlarının ilgisini çekmektedir. Yağ dokusunun greft olarak yaygın olarak kullanımı, kök hücrelerin başka farklı hücrelere dönüşmesi ve bu özelliğin de çok sayıda sağlık sorunlarının tedavisi olma ihtimalinden dolayı bu ilgi zamanla artmakta ve yapılan çalışmaların yoğunluğu da artmaktadır.

2.2. Yağ Greftinin Tarihçesi ve Özellikleri

Yağ grefti diğer doku greftleri gibi kan dolaşımı kesilerek vücudun bir bölgesinden başka bir bölgesine aktarılan yağ dokusudur. Aktarılan yağ dokusunun en fazla kullanıldığı amaç tarihte de ilk olarak kullanıldığı amaç gibi hacim kazandırmaktır. Bunun yanında deri kalitesini artırmak ve kronik ağrılarda ağrının azaltılması gibi hedeflerle de kullanılmaktadır.

Tarihçe

Gustav Neuber 1893' te deprese skar dokularının altına uygulanabilirliğini göstermiş ve hastanın kolundan aldığı yağ dokusunu, orbital bölgedeki osteomyelite bağlı skar dokusu altına yerleştirmiştir.(3) Bundan kısa bir süre sonra Viktor Czerny 1895' te parsiyel mastektomi yapılan hastanın doku eksikliği onarımını hastanın uyluğunda bulunan lipomu eksize edip memeye yerleştirerek yapmıştır.(38) Ondokuzuncu yüzyıl sonlarında dolgu maddesi olarak kontur deformitelerinin düzeltilmesi amacı ile parafin kullanılmıştır. Ancak parafin uygulamasında görülen yan etkilerin fazla ve ciddi olmasından dolayı doğal bir dolgu maddesi aranmış ve yağ dokusu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Eugene Hollander 1910 ve 1912 yıllarındaki yayınlarında kontur deformiteleri, depresyonlar, postmastektomi skarları için insan yağ dokusu ile koç yağ dokusunu karıştırdığını ve sıvılaştıracaya kadar ısıttığını belirtmiştir. İşlem sonrası 2-3 gün kızarıklığın olduğunu ancak sonuçların tatmin edici olduğunu belirtmiştir.(39) Erich Lexer 1919 yılında "Die freien Transplantationen" adlı 2 ciltlik kitabında 300' den fazla sayfa yağ grefti için ayırmıştır. Soket rekonstrüksiyonu, meme asimetrisi, hemifasyal atrofi, deprese skar, mikrognati, tendon onarımı sonrası yapışıklık azaltılması gibi konular üzerine çalışmalar yapmıştır. Uyluk laterali en sık kullandığı donör saha olmuştur.(40) 1930' larda yağ greftinin erken sonuçları tatmin edici olsa da uzun dönemde rezorpsiyona bağlı sonuçların iyi olmaması nedeni ile tartışılır hale gelmiştir. 1950' lerde Lyndon Peer yağ grefti uygulandıktan 1 yıl sonra yaptığı incelemelerde greft hücrelerinin %50' sinin rüptüre olduğu ve canlılığını yitirdiğine dikkat çekmiş ve bu rüptüre olan kısmın yerini fibröz dokunun aldığını belirtmiştir. Canlı kalan hücrelerin kalan yağ dokusunu oluşturduğunu göstermiştir. Illouz 1980'

lerde liposakşının yaygınlaşması ile aspire edilen yağ dokusunun greft olarak enjekte edilebileceğini göstermiş ve uygulamıştır.(5) Abel Chajchir aspire edilen yağ dokusunu serum fizyolojik ile yıkayarak ölü hücreleri ve debrisi elimine ederek sağ kalımı arttırdığını öne sürmüştür.(41) 1990' larda Sydney Coleman yağ grefti uygulamalarını sistematize etmiş ve greft sağ kalımını maksimumda tutmuştur. Üç mm'lik künt kanülü 10 ml' lik enjektöre bağlayarak düşük negatif basınçla yağ hücrelerinin daha az travmatize edilerek aspire edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Alınan yağ greftinin santrifüj edilerek yağ komponentini ayrıştırıp alıcı alana çok sayıda tünel açılması ile 18-G kanül ile enjekte edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Bu tekniğe 'Lipostructure' ismini vermiştir.(12, 42)

Yağ Greftinin Özellikleri

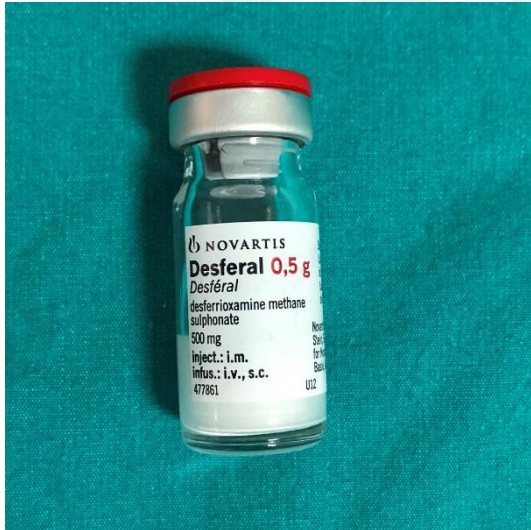
Yağ greftinin kendine özgü bazı özellikleri vardır. Diğer greft olarak kullanılan dokulara nazaran yaşayabilirliği önemli ölçüde az olan bir dokudur. Kolay travmatize olur, enfeksiyona olan direnci azdır. Alıcı sahada oluşan ufak bir hematoma bile yağ greftinin yaşayabilirliğini azaltmaktadır. Yağ greftinin yaşayabilirliği konusu tartışmalıdır. Kimi araştırmacı optimum şartlarda tutma oranının %80-90 olabileceğini söylese de bazı araştırmacılar ise optimum şartlar sağlansa dahi bu oranın %25-50 olacağını savunmaktadır. (19, 20)

Greft alıcı alana yerleştirildikten sonra ilk birkaç gün revaskülarizasyon başlayana kadar çevre dokulardan plazmatik imbibisyon ile beslenmektedir. Bu dönemde çok sayıda adiposit canlılığını yitirir. Ölü hücrelerden, iskemiye maruz kalan hücrelerden ve travmatize olan alıcı alandan bir çok faktör salınarak enflamatuar hücre göçüne sebep olur. Enflamatuar hücrelerin infiltre olması ile de bu hücrelerden interlökin gibi enflamatuar sitokinler salınır. Ciddi iskemi olsa dahi kök hücreler 3 gün süre ile görevlerini yerine getirmeye devam eder ve hasarlı dokuların onarımına yardımcı olur.(43) Yapılan son çalışmalarda greft alıcı alana yerleştirildikten sonraki ilk üç ay 'yeniden yapılanma dönemi' olarak adlandırıp bu dönemden sonra adipogenez gerçekleşmektedir. Yağ grefti üç bölge ile kategorize edilmektedir. Dıştan içe doğru yüzeysel, rejenerasyon ve santral yani nekroz bölgesi olarak isimlendirilmiştir.(44) Demarkasyon hatları yüzeysel ile rejenerasyon bölgesi arasında 1. haftada, rejenerasyon ile nekroz bölgesi arasındaki ise 2-4 haftada belirginleşir. Greft yerleştirildikten sonraki ilk 24 saatte rejenerasyon ile nekroz bölgesindeki adipositler canlılığını yitirirler. Yüzeysel bölgedekiler ise canlılığını devam ettirirler. Ölü hücrelerin yıkımı fagositler tarafından yapılır ve bu işlem haftalar veya aylar alır. Hücre ölümlerine rağmen greft hacminde ilk 4 haftada bir değişiklik olmaz. Kök hücreler rejenerasyon ve nekroz bölgesinde aktive olur ve onarım işlemlerine başlarlar. Yeni küçük preadipositler rejenerasyon bölgesinde ilk 1-2 haftada ölü hücrelerin etrafını sararlar. Ancak adipogenez nekroz bölgesinde gözlenmez. Rejenerasyon bölgesinde ilk 3 gün içinde damarlanma oluştuğu için kök hücreler canlılığını devam ettirir ve yeni adipositlere dönüşürler. Bu dönüşüm 2-3 ay süre ile devam

eder. Nekroz bölgesinde damarlanma oluşmadığı için üç günden sonra kök hücreler yaşayamaz ve dönüşüm gerçekleşmediğinden adipogenez gözlenmez. Bu ölü alan fibröz doku ile yer değiştirir veya yağ kistleri oluşur. Nekroz bölgesi ile yüzeysel/rejenerasyon bölgelerinin birbirlerine oranı kalan yağ greftinin hacmini belirler. Rejenerasyon bölgesinde adipogenez 4. haftada pik yapar ve azalarak 3. ayda sonlanır. Stabilizasyon ile bir kaç ay daha devam eder ancak klinik gözlemlerde hacmin azalması 1 yıla kadar sürer.(44)

Yağ grefti uygulamalarının en önemli dezavantajı yaşayabilirliğinin net olarak bilinmemesidir. Bu konu üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış ve teknik olarak Coleman tarafından standardize bir teknik ortaya konmuştur. Bu teknikle yapılırsa dahi yaşayabilirlik halen öngörülememekte ve yerleştirilen greftin çoğunun kaybı ihtimali mevcuttur. Bu nedenle son zamanlarda teknikten ziyade yağ grefti ile birlikte çeşitli büyüme faktörleri, organik sıvılar, kök hücreler, kimyasal ajanlar kullanılarak yaşayabilirlik arttırılmaya çalışılmıştır.(21-23) Ayrıca alıcı sahanın da önemi bilindiği için alıcı saha hazırlığı hakkında da çalışmalar yapılmaktadır.(34)

2.3. Desferrioksamin Hakkında Genel Bilgiler



Resim 1. Desferrioksamin

Desferrioksamin demir şelatörüdür. Hemolitik anemilerde, akut demir zehirlenmesi ve transfüzyona sekonder serum demirinin arttığı durumlarda demir bağlayıcı olarak kullanılmaktadır.

Neovaskülarizasyonun en önemli uyarıcı doku hipoksisidir. Hipoksik kalan dokuda HIF salınımı gerçekleşir. Bu faktör de VEGF aracılığıyla vaskülarizasyonu tetikler. Bu faktörü ortamdaki uzaklaştıran enzim grubu PHDs' dir.(45) Bu enzim grubunun kofaktörü demir iyonudur. Yapılan çalışmalarda iskemik dokulara uygulanan desferrioksaminin demir iyon şelasyon etkisi ile ortamdaki HIF ve VEGF seviyesini arttırarak dokuların sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir.(45) Wang ve arkadaşları iskemik diyabetik random flep oluşturdukları farelerde desferrioksaminle yüksek HIF ve VEGF seviyeleri ile

neovaskularizasyonu arttırmışlardır.(46) Mericli ve arkadaşları radyasyona maruz kalmış “Transvers Rectus Abdominis Myocutaneous” (TRAM) flebinde desferioksaminin sağ kalımı arttırdığını ve flepteki VEGF düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.(47) Flacco ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, DFO ön koşullandırmasının radyasyona maruz kalmış dokuda perfüzyonu ve yağ grefti yaşayabilirliğini artırdığını göstermişlerdir. (48)

2.4. Tamoksifen Hakkında Genel Bilgiler



Resim 2. Tamoksifen citrate

Tamoksifen(TAM), östrojen reseptör (ER) antagonistidir. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri hastalarında yaygın kullanımı olan ve meme kanseri insidansını azaltan hormonal terapilerdendir. (14) Mastektomi sonrası klinik takipte hastalar selektif östrojen reseptör modülatör (SERM)lerini 5 yıla kadar kullanırlar. TAM’in endotel hücre proliferasyonunu engellediği, vascular endotelial growt factor(VEGF) salınımını azalttığı, mikrovasküler flep komplikasyonlarını arttırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (15-17) Buna ek olarak in vitro çalışmalarda TAM’ın ASClerde apoptozise neden olduğu, ASCs proliferasyonunu, ASCs multipotent hücre farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir.(18)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi tarafından incelenerek tez olarak onaylanmış olan bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Çalışmaları Etik Kurulu Tarafından onaylanmıştır. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi “Deneysel ve Klinik Araştırmalar Laboratuvarı”nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 200 (\pm 20) gr olan, Wistar türü dişi sıçan kullanılmış olup her grupta 8'er denek olmak üzere 4 grupta toplam 32 deney hayvanı kullanılmıştır.

Gruplar

Grup 1 (Yaşayabilirlik - kontrol grubu) : Yağ grefti konulan alana serum fizyolojik enjekte edilip, intraperitoneal serum fizyolojik verildiği, 8 hafta sonra yaşayabilirliğin değerlendirildiği 8 sıçandan oluşan grup

Grup 2 (Yaşayabilirlik – tamoksifen grubu) : Yağ grefti konulan alana serum fizyolojik enjekte edilip, intraperitoneal serum fizyolojik verildiği, aynı zamanda günde oral gavaj ile 0.3 mg/kg tamoksifen citrate verilen grup, 8 hafta sonra yaşayabilirliğin değerlendirildiği 8 sıçandan oluşan grup

Grup 3 (Yaşayabilirlik – tamoksifen+ lokal desferioksamin grubu) : Yağ grefti konulan alana deferoksamin lokal (100mg/kg/gün) enjekte edilip, intraperitoneal serum fizyolojik verildiği, aynı zamanda günde oral gavaj ile 0.3 mg/kg tamoksifen citrate verilen grup, 8 hafta sonra yaşayabilirliğin değerlendirildiği 8 sıçandan oluşan grup

Grup 4 (Yaşayabilirlik – tamoksifen+ intraperitoneal desferioksamin grubu) : Yağ grefti konulan alana serum fizyolojik enjekte edilip, intraperitoneal deferoksamin (100mg/kg/gün) verildiği, aynı zamanda günde oral gavaj ile 0.3 mg/kg tamoksifen citrate verilen grup, 8 hafta sonra yaşayabilirliğin değerlendirildiği 8 sıçandan oluşan grup

Çalışmada tamoksifen verilen ratlarda yağ greftinin yaşayabilirliğinin etkisi aynı zamanda tamoksifen verilen ratlarda desferioksaminin, lokal ve sistemik uygulanmasının yağ grefti yaşayabilirliği üzerine etkisi ve bu süreçte yağ greftinde VEGF düzeyi gözlemlendi. Deney hayvanları randomize olarak 4 gruba ayrıldı. Her grup 8 hayvandan oluştu. Yağ greftleri deney hayvanlarının sağ inguinal bölgelerinden alındı. Alıcı alan, paraskapular olarak belirlendi. Alıcı alanın büyüklüğü hazırlanan 1 cm² 'lık silikon tabaka ile standardize edildi. Supramuskuler alana greftler yerleştirildi.

Desferioksamin uygulaması

Desferioksaminin iskemik dokularda uygulandığı çalışmalarda kullanılan doz farklılık gösterse de özellikle flep yaşayabilirliği üzerine yapılan deneylerde flebe enjekte edilen doz 100 mg/kg'dır. Bununla birlikte deferroksaminin yağ grefti yaşayabilirliğine olan etkisini araştıran çalışmalarda da dozlama 100 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Çözelti, içerisinde toz halinde 500 mg desferioksamin bulunan flakona 5 cc serum fizyolojik enjekte edilerek hazırlandı.

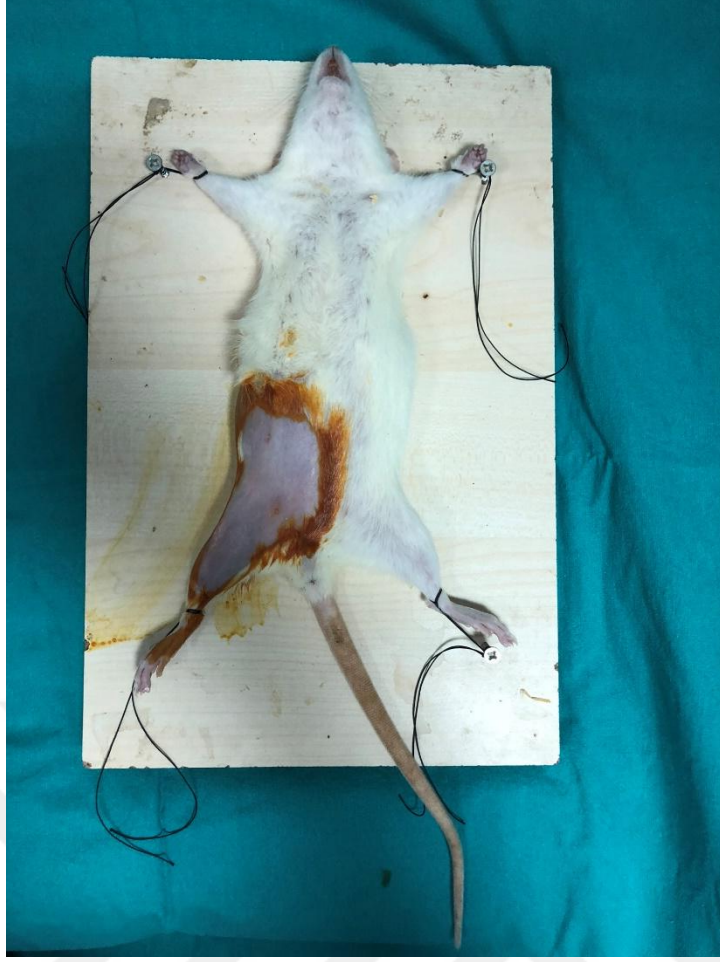
Biz de bu çalışmada Grup 3'deki deney hayvanlarına, alınan greft dokusunun sıçanların paraskapular alanına yerleştirilmesini takiben greftin yerleştirildiği alana 100 mg/kg'lık çözeltiyi günlük olarak enjekte ettik. Desferioksaminin iskemik kalan dokuların yaşayabilirliği üzerine yapılan bazı çalışmalarda ise desferioksamin sistemik olarak uygulanmış. Bu çalışmalarda sistemik enjeksiyonlar intraperitoneal olarak yapılmış ve 100mg/kg'lık çözeltiler kullanılmıştır. Biz de bu 4. Gruptaki 100mg/kg'lık çözeltileri intraperitoneal olarak uyguladık.

Tamoksifen uygulaması

Tamoksifen uygulaması literatürdeki uygulamaları da göz önünde bulundurularak oral gavaj ile 0,3 mg/kg/gün dozunda uygulandı. 1500 ml'de 112,5 mg tamoksifen olacak şekilde solüsyon hazırlandı ve günlük olarak 1 ml solüsyon oral gavaj ile verildi. Kontrol grubuna SF olarak şekilde oral gavajla 2. 3. 4. Gruplara tamoksifen uygulaması çalışma boyunca yapıldı.

Cerrahi Yöntem

Tüm gruptaki hayvanlara intramuskuler 50 mg/kg Ketamine HCL (Ketalar, Eczacıbaşı İstanbul, Türkiye) and 10 mg/kg of Xylazine HCL (Rompun 23.32 mg/ml, Bayer Korea) enjeksiyonu ile genel anestezi uygulanarak gerçekleştirildi. Anestezi sonrası inguinal bölgeleri ve paraskapular alan traşlanarak deney tablasında pozisyon verildi. (Resim 1).

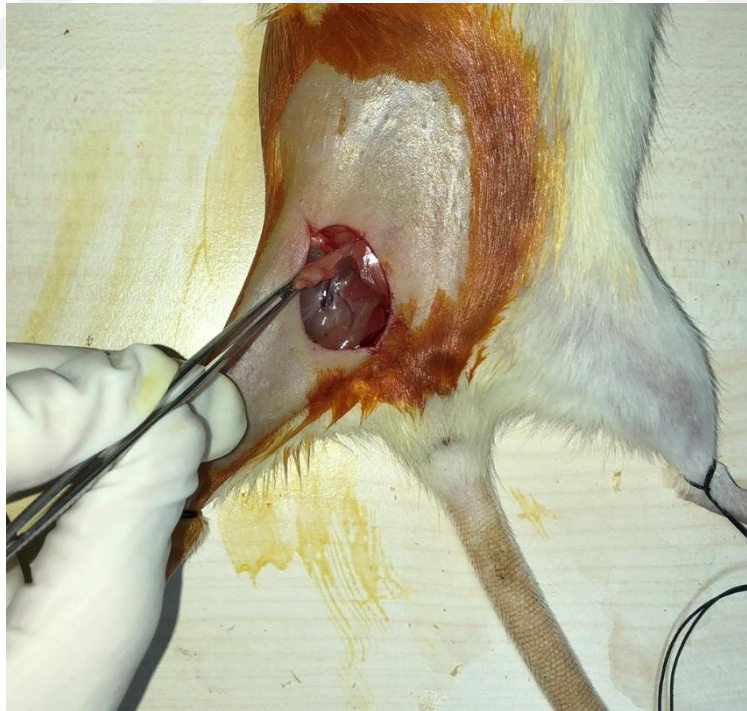


Resim 3. Sıçanlara deney tablasında pozisyon verilerek ayaklarının tespit edilmesi

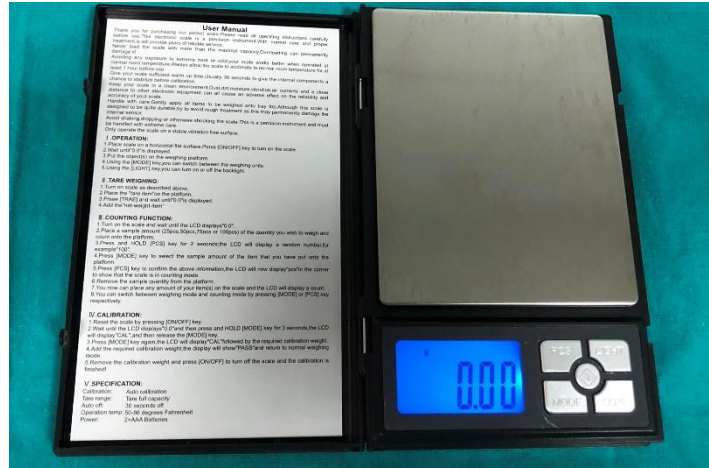
Povidon iyot ile antisepsi sağlandıktan sonra yağ grefti almak amacı ile inguinal bölgeye 2-3 cm' lik insizyon yapıldı (Resim 2). Diseksiyon ile nörovasküler yapılar korunarak yağ grefti alındı ve hemostaz sağlandı (Resim 3).



Resim 4. İnguinal bölgeye 2-3 cm' lik insizyon yapılması



Resim 5. Künt diseksiyon sonrası yağ dokusunun çevre dokulardan serbestleştirilmesi ve eksize edilmesi



Alınan yağ dokusu hassas tartıda steril olarak tartılıp taşıma yöntemi ile greftin hacmi ölçüldü. Daha sonra greft alınan alan 3/0 prolen ile primer onarıldı (Resim 4,5).

Resim 6. Hassas tartı



Resim 7. Taşıma yöntemi

Ratların paraskapuler alanına yağ greftini yerleştirmek amacı ile rata yeniden pozisyon verilip ön ve arka ayakları tespit edildi. Antisepsi sağlandı. Yapılan 1 cm' lik insizyon sonrası diseksiyon ile uygun alan hazırlandı. Alan tüm gruplarda daha önce hazırlanan silikon tabaka ile standardize edildi (

1. grupta yağ grefti, hazırlanan alana yerleştirildi ve alana 1 ml/ kg hacimde serum fizyolojik enjekte edilerek insizyon 3/0 ipek ile primer olarak kapatıldı (Resim 6).
2. Grupta yağ grefti hazırlanana alana yerleştirilip, lokal ve intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı.
3. grupta yağ grefti, hazırlanan alana yerleştirip sonrasında alana 100 mg/kg ' lık desferioksamin çözeltisi enjekte edildi. Takiben insizyon 3/0 prolen ile primer olarak kapatıldı. 4. grupta yağ grefti, hazırlanan alana yerleştirilerek insizyon hattı 3/0 ipek ile primer olarak kapatıldı. Takiben intraperitoneal olarak 100mg/kg' lık desferioksamin çözeltisi enjekte edildi. Deney hayvanları Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi "Deneysel ve Klinik Araştırmalar Laboratuvarı"nda uygun ortam sağlanıp günlük bakımları yapıldı.



Resim 8. Yağ greftinin hazırlanan alana yerleştirilmesi

Ratlar 8 hafta süreyle takip edildi. Takip süresince sıçanların genel durumunda, verici saha ya da alıcı sahada problem yaşanmadı. Belirlenen sürelerin sonunda genel anestezi altında sıçanların

paraskapular alana supramusküler plana yerleştirilen yağ greftleri eksize edildi (Resim 9). Eksizyon sonrasında sıçanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Eksize edilen yağ greftlerinin, hassas terazide ağırlığı ölçüldükten sonra taşıırma yöntemiyle hacimleri ölçüldü.



Resim 9. Yağ greftinin eksizyonu

Histolojik Yöntem

Işık Mikroskobu (IM) İncelemeleri İçin Yapılan alışmalar

Kontrol ve deney gruplarından alınan yağ dokusu örnekleri %10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonunda 72 saat tespit edildi. Tespit işlemi sonrası formalin solüsyonu içinden alınan doku örnekleri eşme suyu altında yıkandı ve sırasıyla %75, %96 ve %100 etanol serisinden geçirilerek suyunu giderme işlemi uygulandı. Bundan sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular iki değişim sıvı parafinle 60°C'lik etüvde 3 saat inkübe edilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan Leica

RM 2125RT model “sliding” mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Doku kesitlerine Hematoksilen-Eozin boyası uygulandı.

Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

Ksilen ile deparafinizasyon

% 100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidrasyon

Yıkama (çeşme suyunda)

Hematoksilen solüsyonu, 1 dakika

Yıkama (çeşme suyunda)

Eozin solüsyonu, 1 dakika

Yıkama (çeşme suyunda)

% 75, %96 ve % 100 etanol serisi ile dehidrasyon

Ksilen ile şeffaflandırma

Entellan kullanarak lamelle kapama

İmmünohistokimya İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar

İmmünohistokimyasal inceleme için parafin bloklardan 4 µm kalınlığında poli-lizin kaplı lamalar üzerine alınan kesitler gece boyunca 60°C’de ksilen ile deparafinize edildi. Dereceli alkol serilerinden geçirilerek hidrasyonu takiben tripsin ile antijenik maskelenme giderildi. PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için metanol içinde çözündürülen %0.1 H₂O₂ ile 15 dakika işleme tabi tutuldu. PBS ile yıkanarak 1 saat , 37°C’de bloking solüsyon (Histostain Plus Kit, 85-9043, USA) ile inkübe edildi. Primer antikor (primary anti-VEGF (1:200, ab171828, ABCAM)) ile 37°C de bir saat inkübe edildi, sonrası dokular PBS ile yıkandı ve oda ısısında 1 saat sekonder antikor ile inkübe edildi. Negatif kontrol olarak primer antikor yerine PBS sıvısı kullanıldı. Kesitler 30 dakika avidin–biotin kompleks (ABC) ile inkübe edildikten sonra PBS ile yıkandı ve kromojen olarak kesitlerin üzerine 3,3- diaminobenzidine (DAB) solüsyonu damlatılarak bir dakika beklendi. Harris Hematoksilin ile ters boyama yapılarak kesitler dehidrate edildi entellan ile kapatıldı.

H-E ve immünohistokimya prosedürlerine uygun olarak boyanan preparatlar, Zeiss Axio Scope A1 marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğraflandı.

Yağ dokusu;

1) adiposit yaşayabilirliği ,

2) yağ nekrozu,

3) kist-vakuol oluşumu,

4) fibrozis,

5) enflamasyon,

6) Apoptoz Oranı (Tunnel metoduyla)

7) yağ dokusu bütünlüğü (integrity)

8) Neovaskülerizasyon (20 alanda kapiller sayılarak elde edilen ortalama kapiller sayısı ile) parametreleri açısından skorlandı.

Skorlama için değerler %0 ; (-) Yok, %1-20; (+1) az, %21-40; (+2) azdan ortaya, %41-60 ; (+3) orta, %61-80; (+4) ortadan şiddetliye ve %81-100; (+5) şiddetli olarak belirlendi.

Yağ dokusu greftinden alınan örneklerde damarlanmanın değerlendirilmesi için kan damarları, Gundersen ve arkadaşları tarafında geliştirilen yöntemle, 100 nokta ve 50 çizgiden oluşan tablo üzerinde nokta sayım tekniği kullanılarak sayıldı.(49) Buna göre her bir preparat x400 büyütme ile birbirinden bağımsız 10 farklı alanda incelendi. Her bir örnek için toplamda 1000 noktada, 81 225 μm^2 alan içinde sayım yapıldı. Noktalar ile çakışan damarlar sayıldı ve Pi değeri olarak kaydedildi. Alanda parankima bölgesine karşılık gelen alanlarla örtüşen noktalar da sayılarak P parankima değeri olarak kaydedildi. Düzeltilmiş P değerini bulmak için elde edilen değerler $P \text{ nokta} = (P_i \times 100) / P$ parankima formülünde belirlenen yerlere konarak P nokta değeri elde edildi.

İmmünohistokimya boyanması için değerlendirme

VEGF için immünoreaktivite gösteren ve kahverengi boyanan hücreler her bir örnek için x1000 büyütmede üç farklı alanda sayıldı.

İstatistiksel Analiz

Ratların ve greftlerin çalışma öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri, varyansların homojen dağılması ve normallik testlerinin sağlanması nedenleriyle “One Way ANOVA” testiyle karşılaştırıldı. Gruplar arasında farkın anlamlılığını araştırmak amacıyla Post Hoc test olarak Tukey testi kullanıldı.

Karşılaştırılan grup sayısı dört olduğundan dolayı Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Farklılıkların hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla da Dunn’s Z Çoklu Karşılaştırma Testinden yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Makroskopik bulgular

Greftlerin, sıçanların interskapular alana yerleştirilmesini takiben 8. Haftada greftler eksize edildi. Bu süre içerisinde herhangi bir komplikasyon gelişmedi. Greftleme öncesi ve 8 hafta sonra greftler alındığında sıçanların ağırlıkları, greftlerin hacim ve ağırlıkları kaydedildi. Sıçanların ağırlık değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sıçan No	Sıçan ağırlığı (gr) Deney başlangıcı	Sıçan ağırlığı (gr) Deney bitimi
1	215	195
2	206	188
3	194	180
4	186	172
5	205	180
6	195	186

7	198	184
8	215	186

Tablo 1. 1. gruptaki (Kontrol grubu) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları

Tablo 2. 2. gruptaki (Sadece tamoksifen verilen grup) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları

Sıçan No	Sıçan ağırlığı (gr)	
	Deney başlangıcı	Deney bitimi
1	205	177
2	204	176
3	206	178
4	194	166
5	190	162
6	198	168
7	210	176
8	204	180

Tablo 3. 3. gruptaki (Tamoxifen+Lokal desferioksamin grubu) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları

Sıçan No	Sıçan ağırlığı (gr) Deney başlangıcı	Sıçan ağırlığı (gr) Deney bitimi
1	206	194
2	208	186
3	186	174
4	194	172
5	200	186
6	196	192
7	202	190
8	204	180

Tablo 4. 4. gruptaki (Tamoksifen+Sistemik desferioksamin grubu) sıçanların deney başlangıcındaki ve bitimindeki ağırlıkları

Sıçan No	Sıçan ağırlığı (gr) Deney başlangıcı	Sıçan ağırlığı (gr) Deney bitimi
----------	---	-------------------------------------

1	206	184
2	198	176
3	194	176
4	200	178
5	205	178
6	195	172
7	201	176
8	188	170

Her grupta greftlerin hacim ve ağırlıklarının deney öncesi ve sonrasındaki ölçümleri yapıldı. Tüm ratlarda deney sonrası ağırlıklarında azalma meydana geldiği bu azalmanın%20'den daha az olduğu izlendi. (Tablo 4). Sadece Tamoksifen verilen grupta (Grup 2) ağırlıkta meydana gelen azalma, kontrol ve Tamoksifen+Lokal deferroksamin verilen gruplara göre anlamlı olarak farklı olduğu($p<0,05$), oral tamoksifen+ intraperitoneal Deferroksamin verilen grup (Grup 4) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Yağ greftlerinin implant öncesi ve harvest sonrası ağırlıklarının karşılaştırılmasında ise; ortalama implant edilen greft ağırlığı 0,388 g (SD 0,121) olarak bulundu. Harvest edilen greftlerin ortalama ağırlığı ise 0,426 g (SD 0,165) olarak bulundu. Varyansların homojen dağılması üzerine yapılan One-Way ANOVA testine göre greftlerin implantasyon öncesi ve sonrası ağırlıklarının karşılaştırılmasında Kontrol grubuna göre TAM+Lokal DFO ve TAM+ IP DFO grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. ($p<0,05$) Kontrol grubu ile TAM grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi.

Yağ greftlerinin hacimsel olarak değişimlerinde ise, kontrol grubunda greft hacminde azalma meydana geldiği, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te ise yağ grefti hacimlerinde artmanın meydana geldiği izlendi. Yapılan istatistiksel analizde Kontrol ve Grup 2 arasında anlamlı bir fark olmadığı, TAM grubunda hacimsel olarak artış olduğu izlendi. Kontrol ve Grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak belirgin farkın olduğu izlendi. Grup 2(Tamoksifen) grubu ile Lokak ve sistemik DFO grupları arasında (Grup 3-4) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı izlendi.

Tablo 5. Graftlerin hacim ve ağırlık değişimleri

	Grup	n	Başlangıç				n	Son			
			Ortalama	Std. Hata	Min.	Maks.		Ortalama	Std. Hata	Min.	Maks.
Ağırlık	1	8	403,8	9,4	270	560	8	273,3	10,3	110	430
	2	8	335	7,8	230	440	8	381,3	8,1	260	500
	3	8	435	18	260	780	8	562,5	19,8	380	960
	4	8	381	10,7	190	490	8	490	16,5	190	780
Hacim	1	8	350	7,5	200	400	8	293	8,6	200	400
	2	8	287	8,3	200	400	8	337	8,7	250	500
	3	8	368	17,1	200	700	8	456	18,9	300	900
	4	8	387	11,5	200	500	8	483	9,8	320	600

Eksizyon esnasında desferioksamin uygulanan tüm gruplardaki greftlerde ve çevre dokuda damarlanmanın daha fazla olduğu, 2 ve 3. Gruptaki greftlerde doku bütünlüğünün daha iyi olduğu gözlemlendi.

Histolojik bulgular

Gruplar arasında yapılan histolojik analizde, adiposit yaşayabilirliği, yağ nekrozu, kist-vakuol oluşumu, fibrozis, inflamasyon, bütünlük(integrity), neovaskülerizasyon açısından değerlendirildi.

Adiposit yaşayabilirliği açısından yapılan analizde; adiposit yaşayabilirliği açısından TAM+Lokal DFO ve kontrol grubu arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. ($p<0,05$) Adiposit yaşayabilirliği TAM ve TAM+ intraperitoneal DFO gruplarında artmış olarak izlense de bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi.

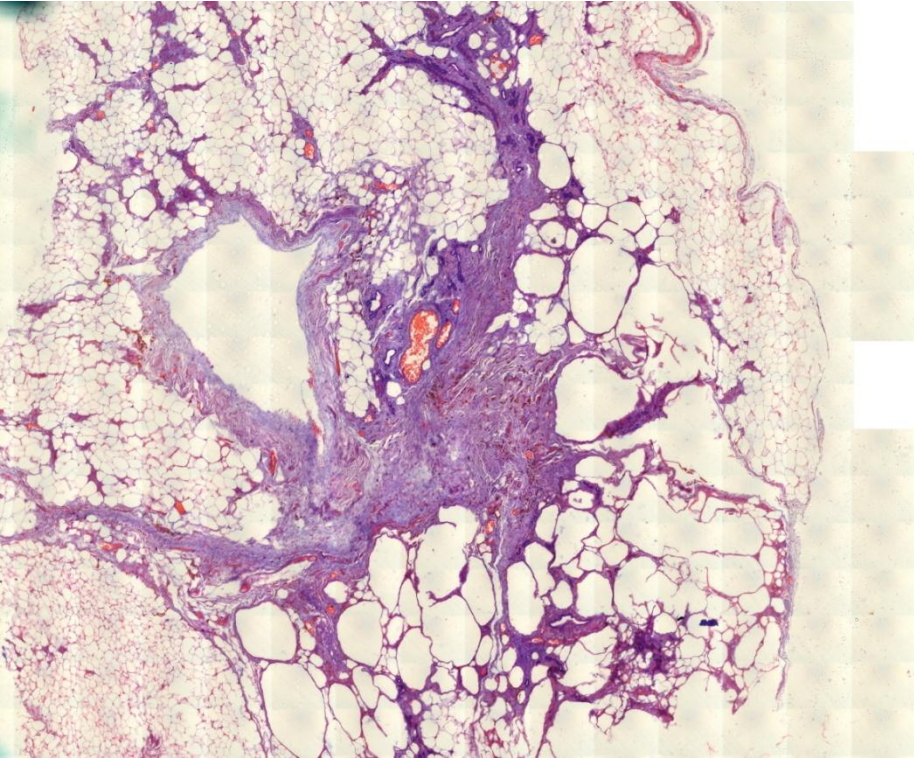
Yağ nekrozu açısından yapılan değerlendirmede, kontrol grubuna göre TAM, TAM+ lokal DFO ve TAM+ IP DFO gruplarında yağ nekrozunun azalmış olduğu izlendi. Bu farkın kontrol grubu ve TAM+ IP DFO grubunda anlamlı olduğu izlendi. ($p<0,05$)

Kist/vakuol oluşumu açısından yapılan değerlendirmede ise kist/vakuol oluşumunun TAM, TAM+lokal DFO ve TAM+ IP DFO gruplarında azalmış olduğu bu azalmanın kontrol grubuna göre TAM+Lokal DFO ve TAM+ IP DFO gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. ($p<0,05$)

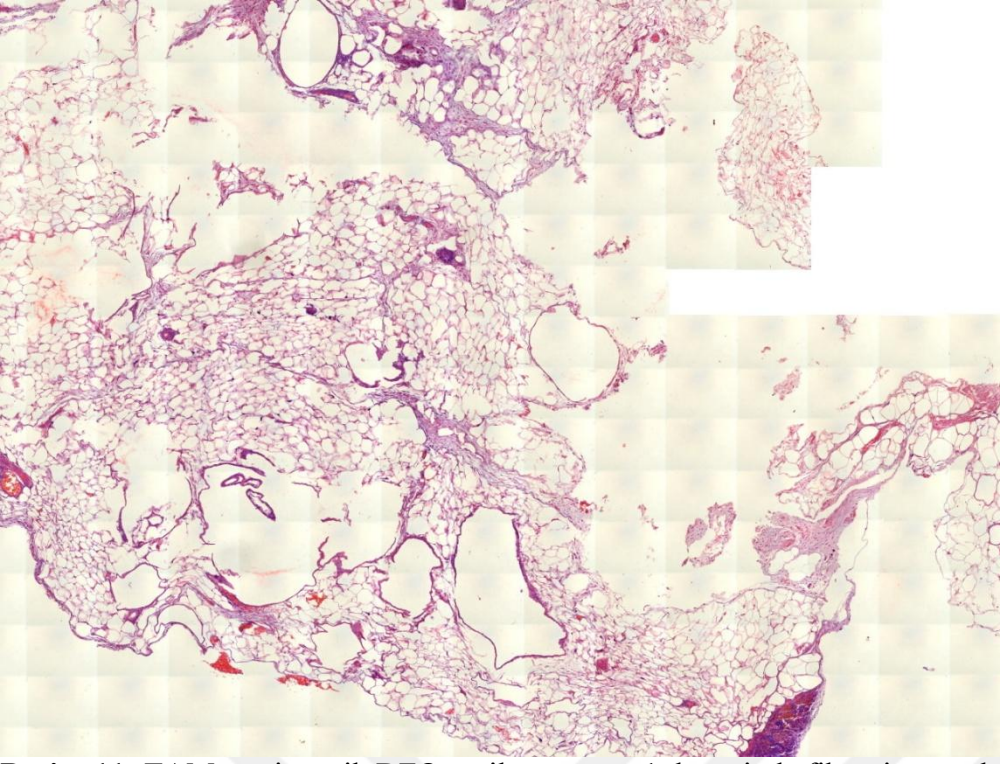
Yapılan değerlendirme sonucunda: kontrol grubuna göre, TAM, TAM+ lokal DFO, TAM+ intraperitoneal DFO gruplarında fibrozisin azalmış olduğu izlendi. Bu azalma TAM+intraperitoneal DFO grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0,05$)

Inflamasyon açısından yapılan değerlendirmede ise, Tüm gruplarda inflamasyonun kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde azalmış olduğu izlendi. ($p<0,05$)

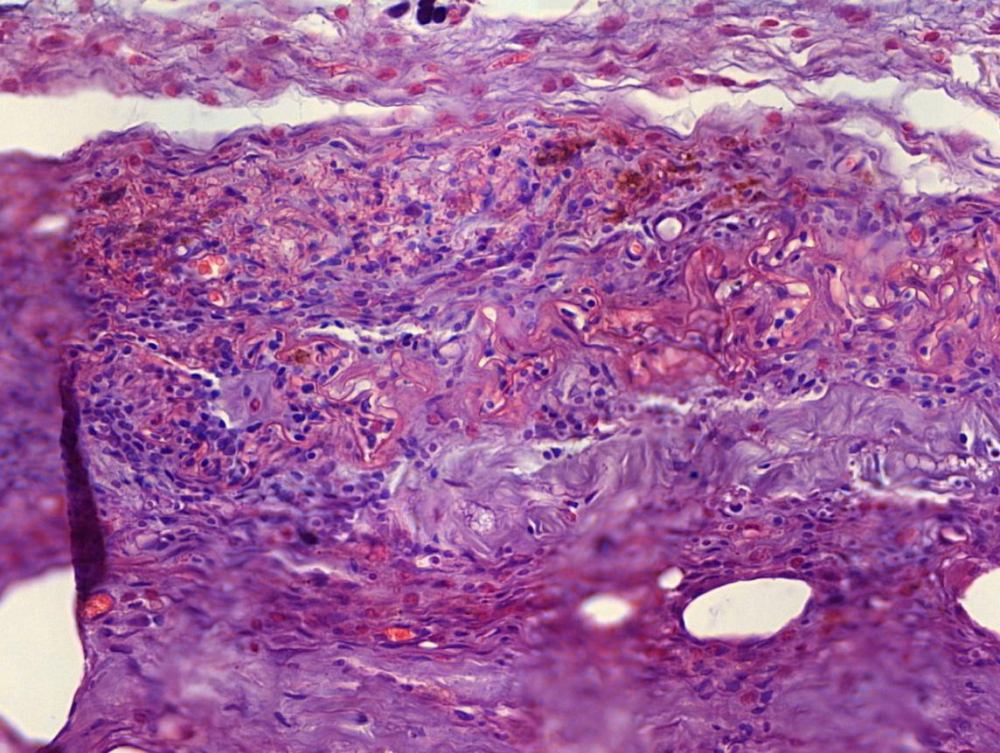
Yağ doku bütünlüğü(integrity) tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha iyi olarak izlenirken, TAM+Lokal DFO ve TAM+ intraperitoneal DFO gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde iyi bulundu. ($p<0,05$)



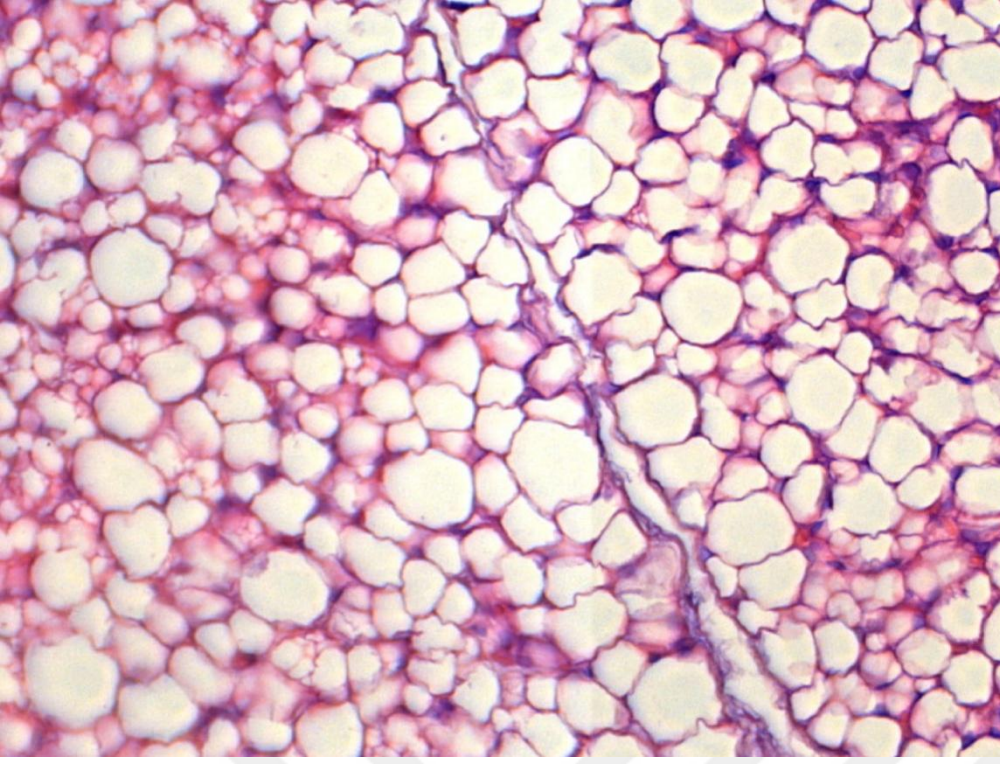
Resim 10: TAM ve lokal DFO verilen grupta, 2 düzeyinde fibrozis ve inflamasyon



Resim 11: TAM ve sistemik DFO verilen grupta, 1 düzeyinde fibrozis ve vakuol oluşumu



Resim 12: TAM ve lokal DFO verilen grupta neovaskülerizasyon bulguları



Resim 13: TAM grubunda izlenen vakuol oluşumu.

5.TARTIŞMA

Günümüzde yağ greftleri sadece yüz ve vücut şekillendirme ameliyatlarında değil aynı zamanda yanık skarları, velofaringeal yetmezlik, travma, konjenital deformiteler ve tümör cerrahisi sonucu oluşan doku defektlerinin doldurulmasında kullanılmaktadır. (6, 7) Rekonstrüktif cerrahide çok yönlü bir araç olan otolog yağ dokunun, meme rekonstrüksiyonlarında da kullanımı yaygınlaşmaktadır. (8) Meme kanseri sonrası total ve parsiyal meme rekonstrüksiyonunda yağ grefti kullanımının sonuçları iyileştirdiğine dair yayınlar giderek artmaktadır.(9, 10) Tamoksifen hormon reseptörü pozitif meme kanseri hastalarında yaygın kullanımı olan hormonal terapilerdendir. (14) Mastektomi sonrası klinik takipte hastalar selektif östrojen reseptör modülatör (SERM)lerini 5 yıla kadar kullanırlar. TAM'in endotel hücre proliferasyonunu engellediği, vascular endotelial growt factor(VEGF) salınımını azalttığı, mikrovasküler flep komplikasyonlarını arttırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (15-17) Buna ek olarak in vitro çalışmalarda TAM'ın ASClerde apoptozise neden olduğu, ASCs proliferasyonunu, ASCs multipotent hücre farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir.(18) C57/BL56 fareler üzerinde yapılan TAM önkoşullanması sonucu yağ dokusunun bej adipositlere dönüştüğü ve bej adipositlerle yapılan greftlemede yağ grefti retansiyonunun ve VEGF ekspresyonunun arttığı, TAM önkoşullanması olmayan, yağ grefti sonrası TAM verilmeye başlayan grupta ise yağ grefti retansiyonunun kontrol grubuyla benzer olduğu ve VEGF ekspresyonunun azalmış olduğu bildirilmiştir. (50) Bununla

birlikte TAM'in VEGF düzeylerini azalttığı, mikrovasküler gelişimini azalttığı, VEGF bağımlı endotelial hücre göçünü inhibe ettiği çalışmalar bulunmaktadır. (16)

Mevcut çalışmamızda TAM verilen grupla yağ grefti retansiyonunun kontrol grubuyla hacim ve ağırlık açısından benzer olduğu bulundu. Aynı şekilde VEGF ekspresyonunun TAM grubu ve Kontrol grubu arasında benzer özellikler gösterdiği, hatta TAM grubunda VEGF ekspresyonunun azalmış olduğu izlendi. Çalışmamızdaki bu bulgular mevcut literatürü destekler niteliktedir. Silva ve ark. yaptığı çalışmada TAM verilen ratlardan 21. Günde alınan örneklerde yağ grefti retansiyonunun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir.(51) Mevcut çalışmamızda da benzer olarak TAM verilen grupta yağ grefti retansiyonunu olduğu fakat kontrol grubu ile TAM grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir. (p=0,35)

Çalışmamızda ayrıca TAM + lokal DFO uygulaması yapılan grup ve TAM+sistemik DFO uygulaması yapılan gruplar bulunmaktadır. Bu gruplarda yağ grefti retansiyonu hacim ve ağırlık olarak kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla bulunmuştur. (p<0,05) Literatürde DFO'nun lokal ve sistemik uygulamalarının yağ grefti survive'ını arttırdığı gösterilmiş olmasına rağmen DFO'nun tamoksifen ile birlikte kullanımının yağ grefti sağkalımı üzerine etkisini değerlendiren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. (48, 52) Bu yönüyle çalışmamız TAM'in yağ grefti sağ kalımı üzerine olumsuz etkisinin DFO ile geriye çevrilebildiğini, hatta TAM'a rağmen yağ grefti sağ kalımının lokal ve sistemik DFO uygulamasıyla arttırılabildiğini göstermiş olması yönünden önemlidir. Literatürde DFO'in ADSCs'de HIF- α aktivitesini arttırarak ADSCs'de VEGF, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) gibi anjiogenetik faktörlerin salgılanmasını sağladığı gösterilmiştir.(53) Çalışmamızda da TAM+Lokal DFO ve TAM+IP DFO verilen gruplarda VEGF ekspresyonunun artmış olarak bulunması literatürdeki bu bulguyu desteklemektedir. Buna ek olarak çalışmamızda TAM+Lokal DFO ve TAM+IP DFO verilen gruplarda neovaskülerizasyonun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olması (p<0,05) da bu bulguyu destekleyen çalışmamızdaki diğer bir unsurdur.

Çalışmamızda yağ nekrozunun TAM+sistemik DFO grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az bulunmuştur. Bununla birlikte yağ nekrozunun önemli bir göstergesi olan kist/vakuol oluşumunun TAM+Lokal DFO ve TAM+ IP DFO uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak(p<0,05) daha az bulunmuştur. DFO'nun lokal ve sistemik uygulamasının yağ greftinde bulunan, yağ grefti sağ kalımında önemli etkilere sahip olan ADSCs'de HIF- α üzerinden VEGF salgılanmasını arttırarak yağ greftinin daha hızlı vaskülerize

olmasını sağladığı düşünülmüştür ADSCs ile zenginleştirilmiş yağ grefti uygulamalarında bir stem cell aktivatörü gibi davranan, VEGF, SDF-1 ve FGF-2 gibi anjiogenetik faktörlerin salgılanmasını sağlayan DFO'nun kullanılmasının yağ grefti sağ kalımını belirgin olarak arttıracığı düşünülmektedir ve bu alanda yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda fibrozis gelişimi ve inflamasyon kontrol grubuna göre TAM, TAM+ Lokal DFO, TAM+IP DFO gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. ($p<0,05$) Temiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada intraperitoneal uygulamayla ilgili bir değerlendirme olmamasına rağmen lokal DFO uygulamasıyla elde ettikleri sonuçlar çalışmamızın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.(29) DFO'nun anti-inflamatuar özelliklerini hücresele yolaklarda etkin rol oynayan glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)nın inaktivasyonu üzerinden olduğu düşünülmektedir. Literatürde DFO'nun GSK-3 β inhibisyonu ile anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkiler gösterdiği ortaya konmuştur. (54)

Yağ grefti uygulaması yapılan alana DFO'nun seri enjeksiyonları hasta konforu ve tolerasyonu açısından rahatsız edici olabilir. Son zamanlarda ortaya konan DFO için "transdermal drug delivery system" in diyabetik farelerde yara iyileşmesini olumlu etkilediği ve bası yarası oluşumunu enfellediği gösterilmiştir. Benzer sistemin hastalar üzerinde kullanımının hastalar tarafından daha iyi tolere edilebileceği düşünülmüştür. (55) Alternatif olarak geliştirilmiş olan DFO'nun nanopartikül formülasyonlarının geç uzun salınımlı formlarının yağ greftiyle eşzamanlı uygulaması da erken vaskülerizasyon gelişimini ve yağ grefti sağkalımını arttırabilir. (56)

Çalışmamızda bazı kısıtlamalar mevcuttu. Etik komitenin iznini alamadığımız için İntraperitoneal ve lokal DFO uygulamaları için ayrı ayrı sham grupları oluşturamadık. Dolayısıyla ilaç verilen ratlara benzer stresi uygulamak amacıyla DFO lokal uygulaması yapılan gruba aynı zamanda intraperitoneal SF enjeksiyonu, IP DFO verilen gruba ise lokal SF enjeksiyonu yaptık. Bu durum ratların maruz kaldığı stresi arttırarak sonuçları etkilemiş olabilir. Daha büyük kontrol gruplarıyla yeni çalışmalar dizayn edilebilir. Çalışmamızda yağ grefti eksizyon yöntemiyle elde edilmiştir, yağ greftinin aspirasyonla elde edildiği durumlarda yağ dokusu farklı klinik özelliklere sahiptir. (57) Eksizyon yöntemiyle elde edilen yağ dokuda stromal fazlalık lokal uygulanan DFO'nun hücreler arasına geçişini engellemiş olabilir. DFO'nun aspire edilmiş yağ greftinin DFO'lu solüsyonlarla yıkanmasının yağ grefti sağ kalımını arttıracığı düşünülmektedir. Çalışmamızda yağ grefti mevcut klinik uygulamaya paralel olarak suprafasyal plana uygulanmıştır. Subfasyal, intramuscular yağ grefti uygulamalarında farklı sonuçlar elde edilebilir.

6. SONUÇ

Çalışmamız TAM verilen ratlarda yağ grefti alıcı sahasına lokal DFO uygulamalarının ve sistemik DFO uygulamalarının yağ grefti sağkalımını arttırdığını göstermiştir. TAM'in VEGF üzerine olumsuz etkilerinin DFO'nun lokal ve sistemik uygulamasıyla aşılabildiği izlenmiştir. Böylece TAM kullanmakta olan meme rekonstrüksiyonu hastalarında yağ grefti sağ kalımının artırılmasında DFO kullanımı umut vadetmektedir. Klinik yağ grefti uygulamaları rutinine DFO'nun girmesi için ek klinik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

7. TÜRKÇE ÖZET

Giriş: Otolog yağ grefti sağkalımı vaskülezasyon, inflamasyon gibi birçok değişkene bağlıdır. Meme rekonstrüksiyonlarında da yağ greftleri sıkça kullanılmaktadır.

Amaç: Meme kanseri sonrasında hormonal terapide sıkça kullanılmakta olan Tamoksifen'in Yağ Grefti Sağ kalımı üzerine etkisinin araştırılması ve tamoksifen ile birlikte lokal ve sistemik DFO uygulamalarının olası faydalarının belirlenmesi

Metod: 32 dişi Wistar Albino rat rastgele olarak 4 gruba ayrıldı. İnguinal bölgeden alınan yağ grefti, ratların sırtına sol sub skapular alana, suprafasyal plana transfer edildi. Kontrol grubuna yağ grefti sonrası herhangi bir uygulama yapılmadı. 2. Gruba oral gavajla tamoksifen(TAM), 3. Gruba TAM+yağ grefti alanına lokal(L) desferroksamin(DFO) uygulaması, 4. Gruba tamoksifen+intraperitoneal(IP) DFO uygulaması yapıldı. Cerrahiden 2 ay sonra greftlenen yağ dokusu eksize edildi ve histopatolojik analiz yapıldı.

Bulgular: Postoperatif 2. Ayda TAM+L DFO ve TAM+IP DFO uygulaması yapılan gruplarda, kontrol grubuna göre belirgin olarak yağ greftlerinin ağırlık ve hacimsel olarak daha fazla olduğu, sadece TAM

verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Ötesinde TAM+L DFO ve TAM+IP DFO gruplarında vaskülerizasyonun ve VEGF ekspresyonunun kontrol ve TAM grubuna göre belirgin olarak artmış olduğu izlendi.

Sonuçlar: TAM verilen ratlarda yağ grefti alıcı sahasına lokal DFO uygulamalarının ve sistemik DFO uygulamalarının yağ grefti sağ kalımını arttırdığını göstermiştir. TAM'ın VEGF üzerine olumsuz etkilerinin DFO'nun lokal ve sistemik uygulamasıyla aşılabildiği izlenmiştir. Böylece TAM kullanmakta olan meme rekonstrüksiyonu hastalarında yağ grefti sağ kalımının arttırılmasında DFO kullanımı umut vadetmektedir.

8. İNGİLİZCE ÖZET

Introduction: Autologous fat graft survival depends on various factors such as vascularization and inflammation. Fat grafts are frequently used in breast reconstructions.

Objective: To investigate the effect of tamoxifen on the survival of fat graft which is frequently used in hormonal therapy after breast cancer and to determine the possible benefits of local and systemic DFO applications with tamoxifen.

Methods: 32 female Wistar Albino rats were randomly divided into 4 groups. Fat graft harvested from inguinal region was transferred to left sub scapular area, suprafasial plan on rats' back. No treatment was performed in the control group after fat grafting procedure. Group 2 received tamoxifen (TAM) by oral gavage, and Group 3 recieved TAM + Local (L) desferroxamine (DFO) application to fat graft area. Group 4 recieved TAM+Intraperitoneal(IP) desferroxamine application respectively. The graft tissue was excised 2 months after surgery and histopathological analysis was performed.

Results: In postoperative 2nd month TAM + L DFO and TAM + IP DFO treated groups, fat grafts were significantly higher in weight and volume than in the control group. It was observed that vascularization and VEGF expression were significantly increased compared to control and TAM groups in TAM + L DFO and TAM + IP DFO groups.

Conclusions: Local DFO applications to recipient site and systemic use of DFO increased fat graft survival. It was observed that the negative effects of TAM on VEGF could be overcome by local and systemic application of DFO. Thus, the use of DFO is promising for increasing fat graft survival in breast reconstruction patients who are using TAM.



1. Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD. Autologous fat transfer--a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS.* 2008;61(12):1438-48.
2. Coleman SR, Saboeiro AP. Primary Breast Augmentation with Fat Grafting. *Clinics in plastic surgery.* 2015;42(3):301-6, vii.
3. Neuber G. Fettransplantation. . *Verh Dtsch Ges Chir.* 1893(22):66.
4. Broeckaert T. Contribution a L'étude des greffes adipeuses. *Bull Acad R Med Belgique* 1919(28):440.
5. Illouz YG. The fat cell "graft": a new technique to fill depressions. *Plastic and reconstructive surgery.* 1986;78(1):122-3.
6. Bishop A, Hong P, Bezuhly M. Autologous fat grafting for the treatment of velopharyngeal insufficiency: state of the art. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS.* 2014;67(1):1-8.
7. 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.
8. Delay E, Guerid S. The Role of Fat Grafting in Breast Reconstruction. *Clinics in plastic surgery.* 2015;42(3):315-23, vii.
9. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plastic and reconstructive surgery.* 2007;119(3):775-85; discussion 86-7.
10. Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, Brenelli F, Manconi A, Martella S, et al. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS.* 2011;64(4):477-83.

11. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007;119(5):1409-22; discussion 23-4.
12. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;118(3 Suppl):108s-20s.
13. Zweegman S, Kessler FL, Kerkhoven RM, Heimerikx M, Celie JW, Janssen JJ, et al. Reduced supportive capacity of bone marrow stroma upon chemotherapy is mediated via changes in glycosaminoglycan profile. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2007;26(7):561-71.
14. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(22):1652-62.
15. Blackwell KL, Haroon ZA, Shan S, Saito W, Broadwater G, Greenberg CS, et al. Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(11):4359-64.
16. McNamara DA, Harmey J, Wang JH, Kay E, Walsh TN, Bouchier-Hayes DJ. Tamoxifen inhibits endothelial cell proliferation and attenuates VEGF-mediated angiogenesis and migration in vivo. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2001;27(8):714-8.
17. Kelley BP, Valero V, Yi M, Kronowitz SJ. Tamoxifen increases the risk of microvascular flap complications in patients undergoing microvascular breast reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(2):305-14.
18. Pike S, Zhang P, Wei Z, Wu N, Klinger A, Chang S, et al. In vitro effects of tamoxifen on adipose-derived stem cells. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2015;23(5):728-36.
19. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plastic and reconstructive surgery*. 1990;85(3):378-86; discussion 87-9.
20. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *The Laryngoscope*. 2000;110(8):1333-8.
21. Smith P, Adams WP, Jr., Lipschitz AH, Chau B, Sorokin E, Rohrich RJ, et al. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plastic and reconstructive surgery*. 2006;117(6):1836-44.
22. Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, Heller JB, Wasson K, O'Hara C, et al. Autologous fat transfer national consensus survey: trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007;119(1):323-31.
23. Locke MB, de Chalain TM. Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Annals of plastic surgery*. 2008;60(1):98-102.
24. Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE, Jr., Vasconez HC. Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(3):932-7.
25. Farberg AS, Jing XL, Monson LA, Donneys A, Tchanque-Fossuo CN, Deshpande SS, et al. Deferoxamine reverses radiation induced hypovascularity during bone regeneration and repair in the murine mandible. *Bone*. 2012;50(5):1184-7.
26. Park K, Chung KY, Sung SH, Kim BR, Kim YS. Protective effect of desferrioxamine during canine liver transplantation: significance of peritransplant liver biopsy. *Transplantation Proceedings*. 2003;35(1):117-9.
27. Duscher D, Neofytou E, Wong VW, Maan ZN, Rennert RC, Inayathullah M, et al. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(1):94.
28. Thangarajah H, Vial IN, Grogan RH, Yao D, Shi Y, Januszyk M, et al. HIF-1 α dysfunction in diabetes. *Cell Cycle*. 2010;9(1):75-9.
29. Temiz G, Sirinoglu H, Yesiloglu N, Filinte D, Kaçmaz C. Effects of Deferoxamine on Fat Graft Survival. *Facial plast Surg*. 2016;32(04):438-43.
30. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-8.
31. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose-derived cells. *Cell transplantation*. 2007;16(9):963-70.

32. Li X, Liu H, Niu X, Yu B, Fan Y, Feng Q, et al. The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo. *Biomaterials*. 2012;33(19):4818-27.
33. Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Ogura T, Notodihardjo PV, Hara T, et al. Effects of transforming growth factor-beta1 on cell motility, collagen gel contraction, myofibroblastic differentiation, and extracellular matrix expression of human adipose-derived stem cell. *Human Cell*. 2012;25(4):87-95.
34. Sezgin B, Ozmen S, Bulam H, Omeroglu S, Yuksel S, Cayci B, et al. Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2014;67(5):712-20.
35. Freitas Lima LC, Braga VA, do Socorro de Franca Silva M, Cruz JC, Sousa Santos SH, de Oliveira Monteiro MM, et al. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Frontiers in physiology*. 2015;6:304.
36. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-63.
37. 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.
38. Czerny V. Drei plastische Operationen. III. Plas- tischer Ersatz der Brustdrü se durch ein Lipom. . *Arch F Klin Chir* 1895;50:544–50.
39. Hollander E. Uber einen Fall von fortschreitenden Schwund des Fettgewebes und seinen kosmetischen Ersatz durch Menschenfett. *Munch Med Wochenschr*. 1910;57:1794–5.
40. Lexer E. Die freien Transplantationen: Enke.
41. Chajchir A, Benzaquen I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plastic and reconstructive surgery*. 1989;84(6):921-34; discussion 35.
42. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clinics in plastic surgery*. 1997;24(2):347-67.
43. 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.
44. Mashiko T, Yoshimura K. How does fat survive and remodel after grafting? *Clinics in plastic surgery*. 2015;42(2):181-90.
45. Li B, Li H, Jin R, Cheng C, Wang J, Zhu H, et al. Desferrioxamine: a practical method for improving neovascularization of prefabricated flaps. *Annals of plastic surgery*. 2015;74(2):252-5.
46. Wang C, Cai Y, Zhang Y, Xiong Z, Li G, Cui L. Local injection of deferoxamine improves neovascularization in ischemic diabetic random flap by increasing HIF-1alpha and VEGF expression. *PloS one*. 2014;9(6):e100818.
47. Mericli AF, Das A, Rodeheaver P, Rodeheaver GT, Lin KY. The Impact of Deferoxamine on Vascularity and Soft-Tissue Biomechanics in a Rat TRAM Flap Model. *Plastic and reconstructive surgery*. 2015;136(1):125e-7e.
48. Flacco J, Chung N, Blackshear CP, Irizarry D, Momeni A, Lee GK, et al. Deferoxamine Preconditioning of Irradiated Tissue Improves Perfusion and Fat Graft Retention. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018;141(3):655-65.
49. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1988;96(5):379-94.
50. Cai J, Li B, Wang J, Liu K, Zhang Y, Liao Y, et al. Tamoxifen-Prefabricated Beige Adipose Tissue Improves Fat Graft Survival in Mice. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018;141(4):930-40.
51. Silva ABD, Haupenthal F, Morais AD, Ascenco ASK, Sebastiao APM, Cavalcanti MAR, et al. Relationship between Tamoxifen and the Absorption of Subfascial Autologous Fat Grafts. *Plastic and reconstructive surgery*. 2018;141(6):1408-15.
52. Temiz G, Sirinoglu H, Yesiloglu N, Filinte D, Kacmaz C. Effects of Deferoxamine on Fat Graft Survival. *Facial Plast Surg*. 2016;32(4):438-43.
53. Mehrabani M, Najafi M, Kamarul T, Mansouri K, Iranpour M, Nematollahi MH, et al. Deferoxamine preconditioning to restore impaired HIF-1alpha-mediated angiogenic mechanisms in adipose-derived stem cells from STZ-induced type 1 diabetic rats. *Cell proliferation*. 2015;48(5):532-49.
54. Fine JM, Baillargeon AM, Renner DB, Hoerster NS, Tokarev J, Colton S, et al. Intranasal deferoxamine improves performance in radial arm water maze, stabilizes HIF-1alpha, and phosphorylates GSK3beta in P301L tau transgenic mice. *Experimental brain research*. 2012;219(3):381-90.
55. Duscher D, Neofytou E, Wong VW, Maan ZN, Rennert RC, Inayathullah M, et al. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(1):94-9.

56. Jiang X, Malkovskiy AV, Tian W, Sung YK, Sun W, Hsu JL, et al. Promotion of airway anastomotic microvascular regeneration and alleviation of airway ischemia by deferoxamine nanoparticles. *Biomaterials*. 2014;35(2):803-13.

57. 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.

