



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

SİSTEMİK ve LOKAL MİNOSİKLİNİN
YAĞ GREFTİ SAĞKALIMI VE APOPTOTİK YOLAK
İNHİBİSYONU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kırdar GÜNEY

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Serhan TUNCER

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2013-05 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA - 2013

ÖNSÖZ

Altı yıllık Tıp hayatımın ardından ikinci yuvam olarak gördüğüm ve ikinci 6 yılımı geçirdiğim Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi bölümünün sonuna, ancak meslek hayatımın başlangıcına ve tüm bilgi birikimimi insanlığın hizmetine sunabileceğim yılların başlangıcına gelmiş bulunmaktayım. Öncelikle buraya kadar hangi aşamalardan geçerek, kimlerin destek ve yardımlarını alarak geldim belirtmek istiyorum.

Bu yolda her zaman yanımda olan, üstün beceri ve bilimselliği ile her zaman bana yol gösteren, tez aşamasında ve asistanlık hayatımda her zaman önder olan değerli hocam Doç. Dr. Serhan TUNCER' e teşekkür ederim.

Gazi Plastik Cerrahisi aile üyelerinden son dönemlerinde Anabilim dalı başkanımız olan, Plastik cerrahinin önemini ve Plastik cerrah gibi düşünebilmeyi öğreten Prof. Dr. Cemalettin Çelebi hocama (kendisine uzun bir emeklilik, sağlık, mutluluk ve huzur diliyorum), bana tez konumu bulmamda yardımcı olan, bilgi birikimi ve farklı düşünebilme yeteneği ile yol gösteren ve başarıyla Anabilim Dalı Başkanlığı görevini yapan Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu hocama, her zaman ortak bir yol bulabilme özelliği olan, sakinliğini hiç bozmayan ve hep güler yüzlü olan Prof. Dr. Osman Latifoğlu hocama, daha kliniğe başlamadan kuvvetli ve güçlü ses tonuyla beni Gazi Plastik Cerrahiye başlamam için ikna eden ve olaylara objektif bakabilen ve hep bilimsel çizgide bulunan sevgili Prof. Dr. Sühan Ayhan hocama, disiplinli, azimli, çalışkan, hırslı ve her zaman kapısı çalınabilecek olan Prof. Dr. Selahattin Özmen hocama, sağlıklı yaşam konusunda örnek olan ve hep bizlere destek olan Doç. Dr. Ayşe Gülşen hocama, ailemin en genç üyesi olup, tam bir abilik görevi yaparak bilimsel yolda yol gösterici aynı zamanda sanatımı öğrenmemde yardımcı olan Doç. Dr. Kemal Fındıkçioğlu

hocama teŖekkür etmek istiyorum. Ŗu an aynı klinikte olmasak da beraber alıŖtıđımız bilimsel, akademik, cerrahi ve hayat konularında destek olup gelişmemde yardımcı olan Prof. Dr. Kenan Atabay ve Prof. Dr. Reha Yavuzer hocalarıma da teŖekkür ederim. Ayrıca tezimi hazırlamamda yardımcı olan gülyüzlü ekibi ile Doç. Dr. Çiğdem Elmas'a, Dr. Merve Seymen'e, Dr. Gülce Naz Yazıcı Saraç'a ve tüm Histoloji ve Embriyoloji asistanlarına çok teŖekkür ederim.

Asistanlığa beraber başladığımız eşkıdemlim, aynı zamanda Ankara Tıp dönem arkadaşım, hep yanımda olan ve olacak olan sevgili dostum Dr. Bora Özel'e arkadaşlığı ve desteği için teŖekkür ederim.

Ailevi temel eğitimimi bana veren, benim için her türlü fedakarlıkta bulunan ve bugünlere gelmemde en çok emeği geçen annem Hayriye Güney'e, bana her zaman yedek annelik görevi yapan, sırdaşlarım olan, maddi ve manevi destek veren, hiç kopmayacak parçalarım olan Zülal ve Jülide ablamlara teŖekkür ederim.

Yakında başlayacağım meslek hayatımda sayın hocalarımla hakkını vererek, hekimlik yeminime sadık kalarak çalışacağımı, insan sevgisi özelliğimi hiç kaybetmeyeceğimi vurgulayarak beni yetiştiren ve bende emeği olan sevgili babam Genel Cerrah uzmanı Op. Dr. Zihni Güney'e layık biri olacağıma söz veriyorum ve bütün yardımları için çok teŖekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yağ dokusu yapısı ve fizyolojisi	4
2.2. Yağ grefti nedir	5
2.3. Yağ greftinin tarihçesi	6
2.4. Yağ greftinin özellikleri	8
2.4.1.1. Yağ grefti elde edilmesi	8
2.4.1.2. Avantajları	9
2.4.1.3. Dezavantajları	9
2.4.1.4. Yağ greftinin fizyolojisi	10
2.5. Sağ kalımı arttırma teknikleri	11
2.6. Hücre ölümü ve mekanizmaları (apoptoz)	12
2.7. Minosiklin nedir	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gruplar ve açıklamaları	23
3.2. Minosiklin uygulama yöntemleri	25
3.3. Cerrahi yöntem	27
3.4. Histolojik ve İmmünohistokimyasal yöntemler	33
3.5. İstatistiksel yöntemler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Makroskopik bulgular	37
4.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal bulgular	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
6. ÖZET	66
7. İNGİLİZCE ÖZET	68
8. KAYNAKLAR	70

GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest otolog yağ grefti uygulamaları yüzyılı aşkın süredir kullanılan ve günümüzde gerek kozmetik amaçlı gerekse rekonstrüktif amaçlı sık başvurulmuş bir prosedür olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok kullanım endikasyonu mevcuttur. Bunlar arasında; kontür bozukluklarının giderilmesi, hasar görmüş cilt ve cilt altı doku kalitesinin artırılması ve estetik amaçlı yumuşak doku dolgunlaştırılması bulunmaktadır. Yağ grefti uygulaması ucuz ve pratik olması, bol miktarda yağ elde edebilme olanağının olması, toksik olmayışı, hipersensitivite reaksiyonlarına yol açmayışı, gerektiğinde uzaklaştırılabilir olması, tekrarlanabilir olması ile avantajlı hale gelmektedir. Bunun yanında rezorpsiyon oranları, rezorpsiyon süresi ve uygulama sonuçları hala öngörülememektedir. Yağ grefti sağkalımının artırılmasına yönelik güncel literatür ve bilimsel çalışmalar oldukça yaygındır^{1,2}.

Yağ greftlerinin yüksek absorpsiyon oranları mevcut olup literatürde yüzde 20 ile 90 arasında değişiklikler göstermektedir³. Yüksek absorpsiyon oranlarının altında yatan mekanizma tam olarak net değildir⁴. Bu konuda en çok kabul gören teori ise Peer'in hücre sağkalım teorisidir. Bu teoriye göre, greft uygulama anında sağ kalan yağ hücre (adiposit) sayısı, ileriki dönemde greft sağkalımını belirleyen ana faktördür⁵. Bu çalışmanın yanında sağkalımı etkileyen başka faktörlerin olduğu çalışmalarda bulunmaktadır⁶. Genelde serbest yağ greftinin sağkalımını etkileyen faktörler; alıcı sahanın kanlanması, mikrovasküler yoğunluk iskekiye dayanma süresi, canlı adiposit sayısı, inflamasyon tipi ve derecesi, sistemik büyüme faktörleridir⁸. Yağ hücrelerinin alım ve aktarılması sırasındaki mekanik travma sonucu adipositlerin zarar görmesi, alıcı sahada devaskülarizasyona bağlı olarak iskemik sürece maruz kalarak nekroza uğramaları önemli faktörler arasındadır^{9,10}.

Histolojik çalışmalarda, yağ grefti sonrası ilk 48 saatte adipositlerin etrafında kısmi revaskülarizasyon başlamış ve az oranda da adiposit nekrozu görülmüştür. Adipositler bu

aşamada daha çok plazmatik imbibisyonla beslenmektedirler. Dördüncü günde ise alıcı yataktan greft alanına neovaskülarizasyon ilerlemiştir⁷. Böylece erken ve uygun şekildeki revaskülarizasyon greft sağkalımı için önem taşıyan bir diğer teoridir. Kan desteğinin herhangi bir sebeple gecikmesi ile adipositler iskemiye maruz kalıp kolayca nekroza uğramaktadırlar¹¹. Alıcı yatağın kan damarları açısından zengin olması yağ greftinin sağkalımını arttırdığını destekleyen çalışmalar bu teorileri desteklemektedir. Bunlardan bir tanesi de kanlanma açısından zengin olan kas dokusu içerisine verilen yağ hücrelerinin büyük oranda rezorbe olmadan sağkalımının fazla olduğunu destekleyen çalışmadır¹². Ayrıca daha önce FGF, EGF, vitamin E, fibrin glue, insülin, PRP ve eritropoetin uygulamalarının yağ grefti sağkalımını arttırmaya yönelik olumlu etkilerini gösteren çalışmalar da mevcuttur¹³.

Bütün bu çalışmalara rağmen serbest yağ grefti uygulamalarında klinik kullanıma rutin olarak girmiş, ucuz ve pratik bir yöntem bulunmamaktadır.

İskemi, hücre zedelenmesinin en sık görülen şeklidir. Damar yatağında kan akışının azalması ya da dokunun damar yatağı olmayan bir bölgeye aktarılması sonucu iskemi başlar. Tanım olarak greft tamamen devaskülarize şekilde bir dokunun vücutta başka bir alana aktarılmasıdır. İlk aşamada plazmatik imbibisyonla beslenen greft dokuları daha sonra alıcı sahadan revaskülarizasyon ile beslenirler. Yağ hücreleri ilk aktarıldıkları zaman alıcı sahada mutlaka iskemiye uğramaktadırlar ve adipositlerin nekrozuna kadar giden süreç görülür. Bu süreçte iskemi, iskemi reperfüzyon hasarı ve inflamatuvar hücre akını ile hücre yıkımı olmaktadır. Serbest radikaller, büyüme faktör ve hormonların azalması, sitotoksik T hücreleri, ATP sentezinin azalması sonucu DNA hasarı, kalsiyum bağımlı proteaz ve diğer enzim sistemleri kaspas aktivasyonu, matriks metallopeptidaz (MMPs) enzim aktivasyonu, mitokondriyal sitokrom C salınımları gibi mekanizmalarla hücre nekrozuna ve programlanmış hücre ölümlerine (apoptoz) yol açmaktadırlar. Yağ hücreleri de aktarıldıkları alıcı sahada bu

mekanizmalarla hücre ölümleri görülmekte ve canlı adiposit sayısı azalması sonucu da yağ grefti sağkalımının azaldığı düşünülmektedir.

Minosiklin 2. kuşak, yüksek lipofiliteye sahip bir tetrasiklin grubu antibiyotiktir. Bu ilacın antiinflamatuvar antibakteriyel, antiapoptotik ve nöroprotektif olduğu bilinmektedir¹⁴. Kaspas bağımlı ve bağımsız iki hücre ölüm yolunu da inhibe etmektedir. Ayrıca inflamatuvar hücrelerden serbest oksijen radikal salınımını, lökosit aktivitesini, sitokrom C salınımını, MMPs ekspresyonunu ve COX-2 enzim inhibisyonu yapmaktadır^{15,16}.

Bu çalışmadaki amacımız minosiklinin hücre ölümü üzerine ve inflamatuvar sistem üzerine olan etkisini ve yağ greftinin maruz kaldığı iskemik süreçteki hücre ölümünü engelleyerek yağ grefti sağkalımını artırıp arttırmadığını araştırmaktır. Böylece ileride yağ grefti uygulanacak hastalara antibiyotik olarak minosiklin verilerek hem antibakteriyel etkisinden hem de yukarıda bahsettiğim etkilerinden yararlanarak yağ greftinin kalıcılığı arttırılmış olacaktır. Bu etki sağlanabilirse tekrar eden yağ grefti uygulama prosedürlerine de gerek duyulmayacaktır.

GENEL BİLGİLER

Yağ Dokusunun Yapısı ve Fizyolojisi

Olgun yağ hücresi (adiposit), hacminin %85-90'i kadar trigliserit depolayabilen fibroblastlardan gelişen bir hücredir. Yağ hücreleri fibroblastlardan preadipositlere farklılaşır daha sonra ilk iki yılda preadipositlerden adipositler gelişir ve ergenliğe kadar mitoz ile çoğalırlar^{17,18,19}. Ergenlik sonrası hücre sayıları artmaz sadece boyut olarak büyüme gösterebilirler. Yağ hücrelerinin çapı 20-200µm arasında olup, hücre çapı 20 kat, hacim olarak ise 1000 kat büyüme gösterebilmektedir^{17,18}. Adipositler, stromal vasküler komponent ile beraber gevşek bir bağ dokusu olan matür yağ dokusunu oluştururlar. Stromal vasküler komponentte fibroblastlar, kan hücreleri, makrofajlar, mezenşimal hücreler, preadipositler ve endotel hücreleri bulunmaktadır.

Histolojik olarak yağ dokusu hücreleri, içerdiği lipid türüne göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) olarak ikiye ayrılmaktadır. Beyaz yağ dokusunun özelliği geniş lipid depolama olduğu için çekirdek ve organeller kenara doğru itilmiş durumdadır ve bu yüzden taşlı yüzük görünümü mevcuttur. Visceral yağ (omental yağ) ve deri altı yağ (subkutan yağ) olarak kendi içinde ikiye ayrılmaktadır. Kahverengi yağ dokusunu oluşturan hücreler ise birden fazla lipid damlacığı bulundurur ve fazla miktarda mitokondri taşıdığı için çıplak gözle kahverengi olarak görülürler^{19,20}. Lipid damlacığının %95'i trigliseritten ibaret olup geri kalan kısım kolesterol, fosfolipidler, yağ asitleri ve nötral yağlardan oluşmaktadır.

Yağ dokusunun asıl görevi en yüksek enerji kaynağı olmasıdır. Lipogenez ve lipoliz ile yağ asitlerini trigliserit olarak depolayabilir ve gerektiği zaman yıkımını sağlayabilirler. Enerji depolamasının yanında, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma, ısı üretimi fonksiyonu, otokrin, parakrin ve endokrin bir takım fonksiyonları mevcuttur^{21,22}. Bu salgı maddeleri immün sistem, kan dolaşımı ve steroid metabolizmasında da rol oynadığı

gösterilmiştir. Yağ hücresinden leptin, resistin, TNF- α , adiponektin, adipsin, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), IL-6, TGF- β , IGF-I, PGI₂, anjiyotensinojen, makrofaj inhibitör faktör gibi bir çok farklı görevde maddeler salgılanmaktadır^{20,23,24,25,26,27,28,29,30,31}.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yağ dokusunda bulunan stromal vasküler hücre komponentleri zengin kök hücre kaynağı olarak görülmektedir³². Adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerin çeşitli anjiyogenik ve antiapoptotik faktörler salgıladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir³³. Bu nedenle bunların saf olarak elde edilmesi ise kanlanma ihtiyacı olan ve mezenşimal hücrelerden dönüşüm yolu ile hücre ihtiyacı olan alanlarda kullanımı giderek artmaktadır. Greft dokusu, ilk olarak alıcı sahaya aktarıldığında iskemiye maruz kalmaktadır, adipoz dokudan elde edilen kök hücreler (ASCs) anjiyogenik ve antiapoptotik özellikleri ile sağ kalım çalışmalarında kullanılmıştır^{34,35,36}.

Yağ Grefti

Greft, vücuttaki herhangi bir dokunun, aktarılacağı alanda form ve fonksiyon kazanmak amacı ile bu dokuyu besleyen damar ve sinir bağlantısı olmadan başka bir bölgeye nakil edilmesidir. Sıklıkla greft olarak kullanılan dokular; deri, kıkırdak, kemik, damar, sinir, fasya, **yağ**, dermis, saç folikülü ve kök hücrelerdir. Tek başlarına uygulanabileceği gibi birden fazla doku (dermis ve ciltaltı yağ) aynı anda kompozit olarak kullanılabilir.

Seksenli yılların başlarında liposuction yöntemi ile yağ dokusu yarı sıvı halde elde edilebilir oldu. Sadece kanül kullanımı gibi kolay bir yöntemle yağların elde edilebilir olması ile de yağ grefti uygulanabilirliği daha popüler bir hale geldi. Yağ dokusunun greft olarak kullanımı daha çok yumuşak dokuda boşluk doldurma olarak başladı. Kişinin kendisinden elde edilebilir olması, miktar olarak büyük hacimlerin alınabilmesi, gerektiğinde geri

alınabilmesi, aktarıldığı alanda uyumlu olması gibi özelliklerinden dolayı son 10 yılda uygulama alanı arttı ve ideal bir dolgu maddesi olarak da görülmeye başlandı⁴⁴. Plastik cerrahide estetik ve rekonstrüktif birçok alanda kullanımının yanında göz, dermatoloji, kulak burun boğaz bölümlerinde de kullanımı yaygınlaştı.

Yağ grefti ideal bir dolgu olmasının dışında da skar eliminasyonunda, radyasyon hasarında, meme kapsül kontraksiyonlarında, vokal kord hasarlarında, kronik ülserasyonlarda, kalvariyal kemik büyümesinde kullanılmıştır^{38,39,40,41,42,43}. Böylece yağ grefti, ideal bir dolgu maddesi olmasının dışında çok daha fazla özelliklere sahiptir³⁷.

Ancak çok çeşitli cerrahi alanlarda kullanılır olmasına rağmen greft sağkalımı en büyük tartışma konusu olmuştur.

Yağ Greftinin Tarihçesi

İnsanlarda otolog yağ grefti uygulaması ilk olarak 1800'lerde rapor edilmiştir. İlk olarak yağ dokusu transplantasyonu 1889 yılında *Van Der Meulen* tarafından rapor edilmiş olup serbest olarak omentum ve yağ dokusunu karaciğer ve diyafram arasına aktarımını sağlamıştır⁴⁸. *Neuber* ise ilk olarak serbest yağ greftini tüm özellikleri ile kullanmış olup, 1893 yılında orbitada kozmetik amaçlı olarak yağ greft uygulamasını yayınlamıştır. Ancak daha önce geniş yağ dokusu kullanıp başarısız olduğu için küçük parçalar halinde kullanmayı tercih etmiştir⁴⁵. Daha sonra 20. yüzyılda enükleasyon sonrası orbital defektlerde, hemifasiyal atrofilerde, küçük memelerde büyütme amaçlı kullanımı başlamıştır⁴⁶. *Bruning* ise 1911 yılında yağ grefti uygulamasını subkutan olarak uygulayan ilk kişidir ve bu uygulamayı yumuşak doku dolgusu olarak gündeme getirmiştir⁴⁷. *Charles Conrad Miller*'in 1926' da yağ

dokularının kişiden kanül yardımı ile temini ve infiltrasyonu hakkında yayını olmuştur⁴⁹. Ama hiçbir zaman tarif ettiği yöntemler popüler hale gelmemiştir.

Sonraki yıllarda deneysel yağ grefti çalışmaları hız kazanmıştır. *Peer*, 1950 yılında yağ grefti çalışmaları yapmış, histolojik kesitler almıştır. Yağ hücrelerinin transferinden 1 yıl sonra yaklaşık yarısının yaşayabildiğini göstermiş olup hücre sağkalım teoremini yayınlamıştır⁵⁰.

Leaf ve Zarem, 1972 yılında dikkatleri yüzdeki konturları dermal yağ grefti ile doldurulmasına çekmişlerdir. Rezorpsiyon oranlarını düşürmek için greft alım tekniklerine önem vermişlerdir⁵¹. *Chajchir*, 1983'lerin başlarında yüzde liposuction ve yağ grefti çalışmalarını yayınlamıştır⁵². *Illouz* ise 1986 yılında deprese alanları doldurmak için yeni teknik olarak yağ hücre grefti adlı yayını yayınlamıştır⁵³. Seksenli yılların sonlarında ise yağ hücreleri alımı sırasında mekanik travmanın önemi ve uzun dönem sağkalıma etkisi önem kazanmıştır⁵⁴.

İlk olarak Avrupa'da, 1970 yıllarında, künt kanüller ve negatif basınç kullanılarak yağ aspirasyonu popüler hale gelmiştir⁵⁶. Daha sonra *Fournier*, *Illouz* ve *Ottenti* 1982 yılında Amerikan Plastik ve Rekonstrüktif cerrahlar derneği toplantısında deneyimlerini aktarmışlardır. *Fournier*, mikrokantülleri yağ aspire etme ve enjekte etme yöntemleri arasına sokarak popülaritesini arttırmıştır^{57,58}. *Klein* ise 1987 yılında yağ aspirasyonunda tümesan tekniğini yayınlamıştır. Sulandırılmış lokal anestetik maddeler geniş hacimli alanlara verilerek direk infiltrasyon uygulanmış ve intraoperatif az kanamalara, postoperatif ise ağrı kontrolüne katkı sağlamıştır^{59,60}.

Coleman ise 90'lı yıllarda elde edile yağın santrifüj edilmesi gerektiğini, şırınga yardımı ile aspire edilmesi gerektiğini, çoklu planda küçük kanüller ile enjekte edilmesi gerektiğini vurgulamıştır ve "*Coleman tekniği*" adı altında 1994 yılında yayınlamıştır^{55,61}.

Bütün bu gelişmelerden sonra yağ grefti uygulaması plastik cerrahide hem estetik hem de rekonstrüktif amaçlı yaygın kullanılır hale gelmiştir. Yağ grefti uygulaması, plastik cerrahi dışında birçok branşlarda da kullanılmaktadır.

Yağ Greftinin Özellikleri

Yağ grefti elde edilmesi:

Kişinin kendisinden temin edilen serbest yağ grefti uygulaması ideal bir yumuşak doku dolgu maddesi olarak kabul görmektedir⁴⁴.

Yağ greftleri çeşitli yöntemlerle temin edilir. Tarihte de ilk önce yağ dokusu tek parça halinde greft olarak nakledilmiştir. Ancak neovaskülarizasyon periferden santrale doğru olduğu için bu tek parça halinde aktarılan yağın özellikle santral kısmı beslenme problemi yaşadığı için başarılı sonuçlar alınamamıştır. Daha sonra kanlanmanın her alana eşit yayılabilmesi ve yağ hücrelerinin sağkalımını arttırabilmek amacıyla elde edilen bu tek parça yağın doku makasıyla kıyılması ve küçük parçalara ayırıp yüzey alanının arttırılması yöntemi kullanılmıştır. Günümüzde bu yöntemler insanlarda klinik olarak pek uygulanmamaktadır. Daha çok deneysel hayvan çalışmalarında bu yöntemler kullanılmaktadır⁶². Klinik olarak yağ elde etmenin en sık başvuru yöntemi vakum yardımcı yağ çekme yöntemi olan ‘liposuction’dır. Bu yöntem iğne ya da kanüller yardımı ile yapılmaktadır. Ama hala herhangi bir standardizasyonu bulunmamaktadır. Hava teması olan ya da olmayan, makine yardımcı ya da enjektör yardımcı vakum uygulaması gibi farklı yöntemler bulunmaktadır. Son zamanlarda mekanik travmayı ortadan kaldırmak için *Coleman* tekniği popüler olmuştur⁶³. Geleneksel liposuction yerine enjektör ile elde edilmesiyle daha az negatif basınç uygulanmakta, bu sayede hem adiposit bütünlüğü korunup hem de fonksiyonları olumsuz

etkilenmemektedir^{64,65}. Yağlar hangi yöntemle elde edilirse edilsin santrifüj edilip edilmemesi de bir tartışma konusudur^{66,67}. Bazı çalışmalarda elde ettikleri yağları enzimatik (kollajenaz II) reaksiyonlara uğratıp etraftaki istemeyen hücrelerden kurtulup ve ardından yıkanması ile daha verimli sonuçlar alındığı savunulmaktadır⁸. En son olarak elde edilen yağların alıcı sahaya verilme yöntemleri de tartışılmıştır. En sık kullanılan yöntem, yağların küçük hacimler halinde, birçok katmana azar azar enjekte edilmesidir. Bütün bu farklılıklara rağmen halen yağ greftlerinin elde edilmesi, hazırlanması ve enjekte edilmesi konusunda ortak kesin bir görüş bulunmamaktadır.

Otolog yağ greftlerinin birçok avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

Avantajları:

Ucuz, kolay elde edilebilirlik, istenilen hacimlerde elde edilebilme, otolog olmasından dolayı alerjik ve yabancı cisim reaksiyonlara yol açmaması, güvenilir, doğal görünüm oluşturması ve alıcı sahada yüksek uyum kapasitesi, uzun kalıcılık^{37,44,68,69,70} ...

Dezavantajları:

Cerrahi bir işlem ile elde edilebilir olması, verici alan morbiditesi, bazı hastalarda verici sahanın yetersiz olması, uygun yöntem kullanılmaz ise yağ nekrozu riski, cerrah işlem olmasından dolayı enfeksiyon ve yara yeri problemleri, kalıcılığın her zaman önceden saptanamaması, ameliyata ve verilen ilaçlara bağlı komplikasyonlar...

En son tartışılan konu ise aktarıldıktan sonra yağ dokusunun hangi miktarlarda kalıcı olacaktır. Literatürde yağ nakli sonrası greft hacminin %20 ila %80 arasında kaybedileceği söylenmektedir^{62,71}. Kalıcılık sürelerinin ise 3 ay ile 8 yıl arasında değişiklik gösterdiği belirtilmektedir^{55,72}. Bu konuda en çok kabul gören teori ise *Peer*'in hücre sağkalım teorisidir⁵. Bu teoriye göre canlı olarak aktarılan ve canlılığını sürdürebilen adiposit sayısı

ilerideki sağkalımı belirleyen ana faktördür. Bu teoriden yola çıkarsak yağ hücreleri elde edilirken en az travmaya maruz kalmalı, hücrelere zarar vermeyecek hazırlıklar yapılmalı, vasküler açıdan zengin alıcı sahaya aktarılmalı, enjekte edilirken yüzey alanları arttırılmalı, birçok plana verilmeli ve postop immobilizasyon greft sağkalımı için sağlanmalıdır. Sağkalımı belirlemede kişisel faktörlerin de öne çıktığı unutulmamalıdır^{64,73}.

Yağ greftinin fizyolojisi:

Yağ grefti alıcı alana aktarılır aktarılmaz hemen hasara uğramaktadır. Bunun nedeni alım, hazırlık ve aktarım işlemlerinde mekanik travmaya maruz kalması ve alıcı sahada akut iskekiye maruz kalmasıdır. Greft uygulamasının ardından ilk gün yağ hücre alanına nötrofil infiltrasyonu olmaktadır. Daha sonra makrofajlar, histiyositler ve multinükleer dev hücreler alana gelmektedir. Bütün bu hücreler sellüler atıkları temizlemektedirler. Aynen deri greftlerinde olduğu gibi ilk 4 gün plazmatik imbibisyon ile beslenmektedirler. Kırksekizinci saatte yapılan histolojik analizlerde otolog yağ greftinin bir kesiminde revaskülarizasyon görülmüştür. Dördüncü günde greft damarlanması neovaskülarizasyon ile sağlanmaya başlamaktadır. Yalnız bu damarlanma periferden başlar ve santral bölge iskemik kalır. Erken ve uygun damarlanma greft sağkalımında kritik rol oynar. İskekiye hassas olan hücreler nekroza uğramaktadır. İskemi sonucunda bir takım dejeneratif değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler, hücre membranları bütünlüğünün bozulması, yağ kistlerinin ve vakuollerinin oluşması gibidir. İleriki dönemde ise fibrozis kaybolmuş olan yağ hücrelerinin yerini alır ancak hacim olarak yeterli miktarda kompanse edemez^{6,7,11,74,75,76}. Bazı çalışmalar revaskülarize olmasına rağmen yağ greftinde hacim kayıplarının devam ettiğini göstermiştir. Bunun nedeni ise apoptotik hücre ölümlerine bağlı adiposit sayı azalması olarak gösterilmektedir¹. Erken hacim kayıpları akut nekroza bağlı, geç hacim kayıpları ise apoptotik ölümlere bağlı olabilmektedir. İşlem sonrası 30 gün boyunca ölü yağ hücreleri ve yağ parçacıkları makrofajlar tarafından temizlenmektedir. Bu da hacim kaybının devam etmesini

açıklayabilir. Yağ hücrelerindeki apoptozları sitokinler, insülin, kortikosteroidler, ısı veya serum azalması başlatabilir. Sonuçta yağ grefti aktarıldığı zaman hipoksik kalmakta ve beslenme ürünleri açısından eksik kalmaktadır. Ayrıca erken dönemde lökosit infiltrasyonları da görülmektedir. İnflamasyona bağlı sitokinler veya hipoksi ve besin maddelerindeki yetersizlik sonucu oluşan genetik bozulmalarla apoptoz kolaylıkla yağ hücrelerinde görülebilmektedir^{1,77,78}.

Yağ Grefti Sağkalımı Arttırma Teknikleri

Yağ grefti uygulaması plastik cerrahide bu kadar popüler hale geldikten sonra sağkalım miktarları öngörülemediği için, kalıcılığını arttırmaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Literatürde bununla ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır.

Yağ greftinin yaşayabilirliği, canlı yağ hücre sayısına, alıcı saha kanlanma özelliklerine, mikrovasküler yoğunluğa, iskemiye dayanma süresine, ortamdaki inflamasyon tipi ve derecesine, sistemik büyüme faktörlerine bağlıdır⁸. Bütün bu basamakların değişik seviyelerine müdahale edilerek sağ kalımı arttırmaya yönelik çalışmalar yapılabilir.

Canlı hücre sayısını arttırmak için negatif basınçla alım işlemi sırasında minimal travmaya maruz bırakılmalıdır. Yine canlı hücre sayısını arttırmak için yıkama yapılarak ya da enzimatik prosedürlerle inflamatuvar hücrelerden ve mediatörlerden arındırılabilir. Santrifüj yöntemi ile yağ hücre yoğunluğu arttırılarak canlı hücre sayısı en fazla düzeyde tutulup kalıcılığı arttırılabilir⁷⁹.

Bir diğer sağkalım arttırma yöntemi ise deneysel modellerde birtakım faktörler ekleyerek alıcı sahanın kanlanmasının arttırılmasıdır. Bunlara örnek olarak, insulin, vitamin E, fibrin glue, fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit zengin plazma (PRP), eritropoetin

(EPO), interlökin-8 (IL-8), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi ek ajanlarla sağkalım artırma çalışmaları yapılmıştır^{13,62,75,80,81,82}. Dışarıdan eklenecek ek ajanlar dışında endojen olarak bir takım yöntemlerle de kanlanma arttırılabilir. Bunlar için yapılmış iskemik önkoşullandırma çalışmaları, silikon blok yerleştirilmesi, travmatik önkoşullandırma gibi çalışmalarla kanlanma artırma ya da iskemiye direnci artırma çalışmaları örnek verilebilir^{83,84,85}.

Bir diğer teori, yağ grefti uygulandıktan sonra iskemi-reperfüzyon hasarında olduğu gibi iskemik hasara bağlı yağ hücrelerinin apoptoza uğraması ve reabsorbe olmasıdır. Bu aşamadaki apoptozu önlemek için yüksek antioksidan özelliği olan lipoik asid (LA) denenmiş ve hem antioksidan hem de immünmodülatör etkileriyle erken apoptozu azalttığı, 6 haftalık dönemde ise artmış yağ grefti sağkalımı saptanmıştır⁸⁶.

APOPTOZ

Hücre Ölümü ve Mekanizmaları

Hücre ölümü iki şekilde gerçekleşmektedir; **nekroz** ve **apoptoz**. Nekroz genelde olumsuz dış faktörlere bağlı olarak ortaya çıkar. Nekrozda hücrenin kendi içinde sindirimi (otoliz), lökositler tarafından sindirimi (heteroliz) ve protein denatürasyonu şeklinde olaylardan kaynaklanır^{87,88}.

Apoptoz çok hücreli organizmalarda görülen, fizyolojik veya patolojik olaylarda, genetik materyal tarafından ne zaman gerçekleşeceğine karar verilen, irreversible programlı hücre ölüm mekanizmasıdır. Latince kökenli bu kelime ayrı düşme anlamında kullanılmaktadır. Bin dokuz yüz yetmiş ikide *J.F.K.Kerr* tarafından iskemiye maruz kalmış doku etrafında nekrozdan farklı hücre ölümünün saptanmasıyla keşfedilmiştir⁸⁹. Fizyolojik olarak

vücudumuzda normal hücre döngüsü için sürekli apoptoz görülmektedir. Ancak mutasyonlar, radyasyon gibi çevresel faktörler, inflamasyon gibi etkenlerle de patolojik olarak apoptoz görülebilir. Genelde bütün vücutta hücre sayısının sabit tutulmasında, hormon bağımlı atrofilerde, embriyonik gelişimde, immün sistem gelişimi ve fonksiyonel olmasında apoptoz rol oynar. İmmün sistemdeki apoptoz dengesinin bozulması, Alzheimer, Parkinson, dejeneratif hastalıklar, ülseratif kolit gibi kronik hastalıklara, çeşitli kanserlere yol açabilir^{90,91,92}.

Apoptoz genetiğindeki aşamalar, ölüme karar verme, hücre ölümünü gerçekleştirme, parçalanma ve fagositoz şeklinde olur. İlk olarak bir takım sinyalleşmeler ile apoptoz indüklenir. Bunlar, büyüme faktör yokluğu, özgül reseptör-ligand etkileşimleri (TNF/TNF-reseptör), sitotoksik T hücrelerinden granzimlerin salınması, radyasyon toksinler, hipoksi ve serbest radikaller gibi faktörlerdir.

Apoptoz morfolojisi:

Apoptoz sırasında hem ışık hem de elektron mikroskopunda bir takım spesifik morfolojik görüntüler belirlenir. Erken evrelerinde hücre büzülmesi ve çekirdek büzülmesi (piknoz) görünür hale gelir. Büzülmüş hücreler boyut olarak daha küçük, sitoplazmaları daha yoğun ve organeller sıkı paketlenmiş halde bulunur. Bu hale gelen hücrenin, H&E ile boyanması ile yuvarlak veya oval bir hücrede koyu eozinofilik sitoplazma ve mor kromatin fragmanları şeklinde gözlenir. Daha sonra piknotik haldeki çekirdek parçalanır (karyoreksis), hücre fragmanları apoptotik parçacıkları oluşur. Bu aşamaya tomurcuklanma denir. İntakt bir sitoplazma içinde sıkıca paketlenmiş organeller bulunur, çekirdek yapılarını içerebilir ya da içermeyebilir. Bu apoptotik parçacıklar çevredeki makrofajlar tarafından fagosite edilerek uzaklaştırılırlar^{89,93}.

Apoptoz genetiği:

Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik alt birimlerden oluşan ve apoptozda çok önemli rol oynayan bir protein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL'nin apoptozu nleme fonksiyonları vardır. Bu etkilerini ya direk kaspasların nc formlarını durdurarak ya da sitoplazma içine kaspas akışını direk sağlayan apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi faktörleri durdurarak gerekleřtirirler⁹⁴. Bcl-2 benzer fonksiyonu C-myc proteini de gösterir ve apoptozu engeller⁹⁵.

Bax ve Bak ise proapoptotik olup mitokondriden sitokrom-C'yi serbestleştirir ve kaspas serbestleşmesini uyarır^{94,96}.

P53 yine bir proapoptotiktir. Birçok antitümör ilaç p53 seviyesini arttırır ve apoptozu uyarır. Birçok tümör genetiğinde, p53 genindeki bir mutasyonun rolü olduğu günümüzde belirlenmiştir. Ek olarak p53 ile aynı görevleri yapan p63 ve p73 genleri de saptanmıştır^{97,98,99}.

Ces-1 ve Ces-2 gibi genler de apoptozu uyarırlar. Ced-3, 9 ve 11 hücrede lme yol açan diğer genlerdir. Ced-3 geni bir proteazı kodlar^{100,101}. Bu yıkıma yol açan enzimin en önemli etki ettiği enzim, poli ADP riboz polimeraz (PARP)'dır. Bu enzim DNA tamirinde rol oynar ve yıkımı sonucu DNA tamir mekanizması bozulmuş olur^{92,102,103}. Böylece Ced-3 tarafından parçalanan PARP apoptozun ortaya çıkmasında önemli fonksiyonlara sahiptir.

Ayrıca hücre membranında yerleşmiş olan ve apoptoz için özel reseptörler bulunmaktadır. Bunlar TNF (tümör nekroz faktör) olarak bilinen 6 farklı reseptör içeren 24 yesi bulunan reseptör ailesidir. Bu bölge apoptoz aktivasyonunda önemli rollere sahiptir¹⁰³.

Kaspaslar ise sitoplazmada bulunan ve inaktif haldeki proteolitik enzimlerdir. Kaspaslar mitokondri zar fonksiyonlarını bozarak hücrenin iskelet ve çekirdeğinde hasara yol

açarlar^{91,104}. Mitokondriden salınan sitokrom-C ise apoptotik proteaz aktive etme faktörünü (APAF-I) aktive eder ve sitoplazmaya salar, bu da direk kaspas sistemlerinin uyarılmasına neden olarak apoptozu indükler¹⁰⁵.

Apoptotik yolak mekanizmaları:

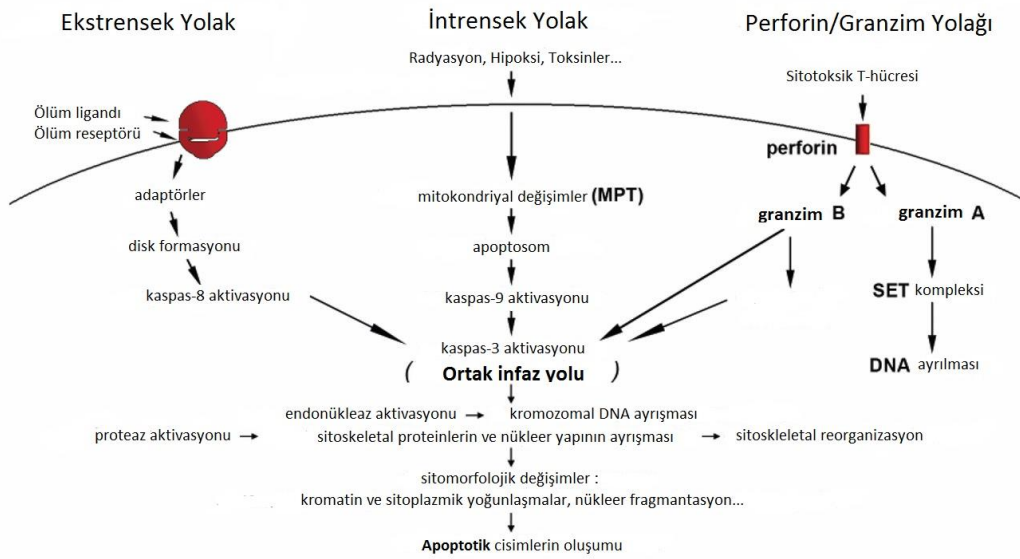
Apoptotik yolak mekanizması oldukça karmaşıktır. Apoptotik yolda 2 ana yol bulunmaktadır. Bunlar, ekstresek (ölüm reseptörleri) ve intrinsek (mitokondriyal) yollardır. Bu yollar birbirleriyle bağlı ve etkileşimde olabilirler¹⁰⁶. Bu iki yolun dışında bir de T-hücre sitotoksitesine bağlı perforin/granzim (granzim A ve B) yolu bulunur. Ekstresek, intrinsek ve granzim B yolları ortak kaspas-3 aktivasyonu ile apoptoza yol açarken, granzim A ise kaspas-bağımsız yol ile hücre ölümüne yol açar¹⁰⁷.

Ekstresek yol membranda bulunan ölüm reseptörleri olan tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen ailesine bağlı başlar¹⁰⁸. Reseptör uyarılması ise sitoplazmaya sinyal iletir ve adaptör protein olan TRADD uyarılır, bu da prokaspas-8'i aktive eder^{109,110}. Böylece ölüm sinyal kompleksi oluşur ve otokatalitik aktivasyon başlar¹¹¹. Daha sonra kaspas-3 aktive edilerek ortak yola girer.

İntrinsek yol genelde büyüme faktörleri azalması, hormonal etki ve sitokinlerle ya da radyasyon, toksinler, **hipoksi**, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikallerle başlayabilir. Bütün bu uyarılar sonrası mitokondri membranında mitokondriyal permabilite geçiş porları (MPT) açılır. İki ana grup proapoptotik maddeler sitoplazmaya geçer. Bunlardan ilki sitokrom-C olup prokaspas-9 ile birleşir ve onu aktive eder. Böylece “apoptosom” oluşmuş olur^{112,113}. Bu da direk kaspas-3'ü aktive ederek ortak yola girer. Diğer ana grup ise AIF, endonükleaz G ve CAD'dır. AIF ve endonükleaz G kaspas-bağımsız olarak evre-1 DNA fragmanlarının oluşumuna, CAD ise kaspas-3 üzerinden evre-2 DNA fragmanlarının oluşumuna yol açar^{114,115}.

Perforin/granzim yolu T-hücre sitotoksitesi sonucu tip IV hipersensitivite reaksiyonu olarak başlar. İki önemli serin proteaz olan granzim A ve granzim B içeriğini porlardan hücre içine gönderir¹¹⁶. Granzim B prokaspas-10'u aktive eder ve o da kaspas-3'ü aktive ederek ortak yola girer. Ancak granzim B direk olarak kaspas-3'ü aktive edebilir¹¹⁷. Granzim A ise kaspas-bağımsız olarak DNA yapısını koruyan enzimleri inaktive ederek DNA ve kromatin yapılarının ayrışmasına yol açar¹¹⁸.

Ortak yol ise kaspas-3 aktivasyonu ile başlar. Kaspas-6 ve kaspas-7 de bu yolda aktive olan diğer proteinlerdir. Endonükleaz aktivasyonları ile kromozomal DNA parçalanması, proteaz aktivitesi ile sitoskeletal proteinlerin parçalanması gözlenir. Daha sonra hücre bütünlüğü bozulup, yoğunlaşmalar meydana gelip çekirdek parçalamaları ile apoptotik parçacıklar oluşur¹¹⁹(şekil-1).



Şekil-1: Apoptoz basamakları¹²⁰ (Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516)

Apoptozu belirleme yöntemleri:

A. Hücrede belirleme

1. Elektron mikroskopu
2. DNA Ladder
3. **Tunel**
4. FACS Analizleri
5. MTT
6. Annexin

B. Gen ürünlerini belirleme

1. **İmmünohistokimya**
2. İmmüblot
3. Semi kantitatif mRNA analizler
4. Rnaz üretim
5. Fas ligand analizi
6. Bcl-2
7. Bcl-XL
8. Kaspaslar
9. Sitotoksiste

İmmünohistokimya:

Dondurma ya da parafin blok sonrası kesitler dokulardan elde edilir. PBS ve TBS içeren %1'lik bovin serum albümin ile yıkanır. Daha sonra oda sıcaklığında 1 saatten az olmamak şartı ile monoklonal ya da poliklonal antikorlarla inkübe edilir. Bir dizi işlem sonrası antikora özgü antijenik yapılar mikroskop altında tespit edilir¹²¹.

MINOSİKLİN

Minosiklin (**Minocycline Hydrochloride**) yarı sentetik 2. kuşak tetrasiklin grubu bir bakteriyostatik antibiyotiktir. Genellikle akne tedavisinde, solunum, üriner sistem enfeksiyöz hastalıklarında, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlarda, aerobik ve anaerobik gram-pozitif, gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında kullanılır.

Tarihçesi:

Bu grup antibiyotiklerin temelleri 1948 yılında Wisconsin Üniversitesinde *Benjamin M. Duggar*'ın, "klortetrasiklin" izole etmesiyle atılmış oldu. Bu madde mezarlık etrafında yaşayan *Streptomyces aureofaciens* adlı bakteriden izole edildi. Yaklaşık 2 yıl sonra *A.C.Finley* yine bir bakteriden "terramycin" elde etti. Daha sonra *R.B.Woodward* "oxytetracycline" bularak, sentetik tetrasiklinlerin bulunmasına öncülük etmiştir. Çoğu tetrasiklin 1950 yıllarında bulundu. En son üyesi 2005 yılında üretilerek kullanılmaya başlandı^{122,123,124,125}.

Antibakteriyel etki:

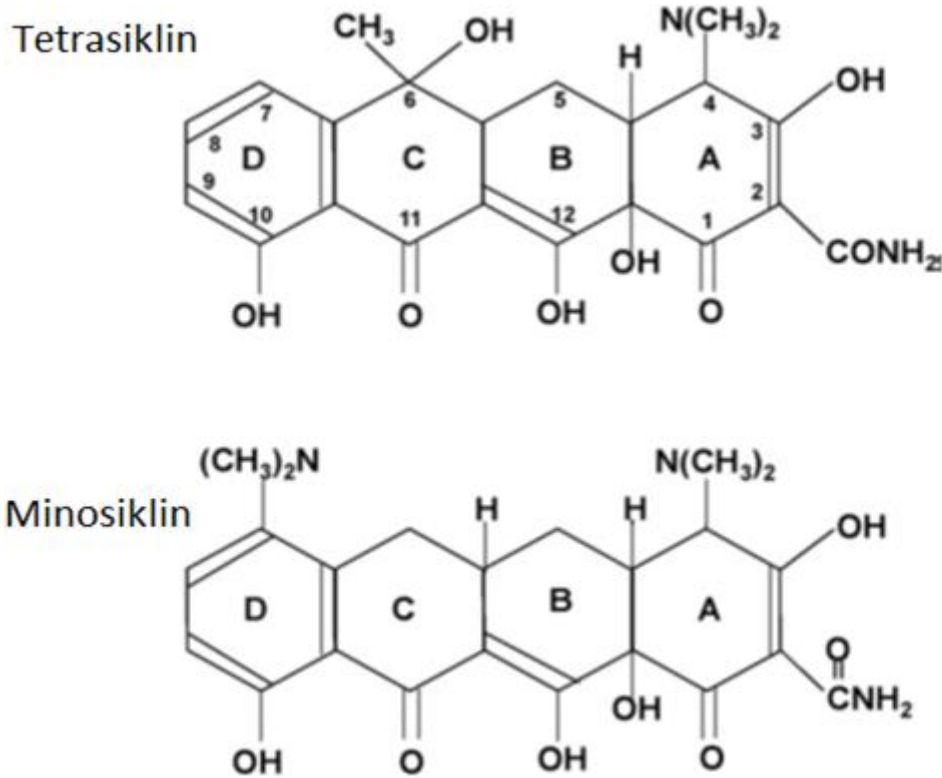
Tetrasiklinler pasif difüzyon ve aktif transport yolları ile bakteri duvarını geçebilirler. Hücre içinde reversible olarak ribozomun 30S alt birimine bağlanırlar. Böylece aminoasil tRNA, RNA-ribozom kompleksine bağlanması engellenmiş olur ve protein sentezi durur. Ayrıca bakteri sitoplazmik membran geçişini bozarak hücre içi nükleotid ve organellerin hücre dışına sızmasına neden olur. Bakterileri öldürmez, ancak bakteriyostatik etki gösterir^{124,126}.

Farmakodinamiği:

Biyoyararlanımı en yüksek olan minosiklidir. Doku penetrasyonu, lipidde çözünürlüğüne göre en yüksek olan yine minosiklidir. **Lipofilitesi** çok yüksek olmasından dolayı vücuttaki tüm membranları ve bariyerleri kolaylıkla geçer¹²⁷. Kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiği için santral sinir sistemi hastalıklarında kullanılır. Genelde oral olarak kullanılır, hızlı bir şekilde tamamen emilir, daha uzun yarı ömrü bulunur, doku penetrasyonu mükemmeldir, %100 biyoyararlanımı bulunur¹³⁸. Minosiklin genelde karaciğerde metabolize edilir. Çok az bir kesimi böbrek ve dışkı yolu ile vücuttan atılır¹²⁸.

Uzun dönem kronik hastalıklarda kullanımı güvenli ve iyi tolere edilir. En sık yan etkileri bulantı ve baş dönmesidir. Ayrıca özefagus erozyonuna da yol açtığı için gece yatmadan önce kullanılması önerilmez. Altı aydan uzun kullanımlarda hastalar hepatotoksisite açısından monitörize edilmelidir¹²². Yine uzun kullanımlarda hiperpigmentasyona yol açabilir, ancak bazı çalışmalar pigmentasyon etkisinin doz ve süre bağımlı olmadığını göstermiştir¹²⁹.

Tetrasiklinlerin antibiyotik etkinlikleri 4. karbondaki dimetilamino grubuna bağlı olarak görülür. Bu karbondaki dimetilamino grubu eğer uzaklaştırılırsa antibiyotik etkileri azalır. Minosiklinde ise dietilamino grubunun 7. karbonda bulunmasıyla ve 6. karbondaki fonksiyonel grubun olmaması ile tetrasiklinden farkı ortaya çıkar ve daha lipofilik hale gelir¹³⁰ (şekil-2).



Şekil-2: Minosiklin ve tetrasiklinin kimyasal yapısı¹³⁰

Diğer etki mekanizmaları:

Antibakteriyel etkilerinin yanında ciddi antiinflamatuvar, **antiapoptotik**, nöroprotektif ve immünmodilatör etkileri mevcuttur.

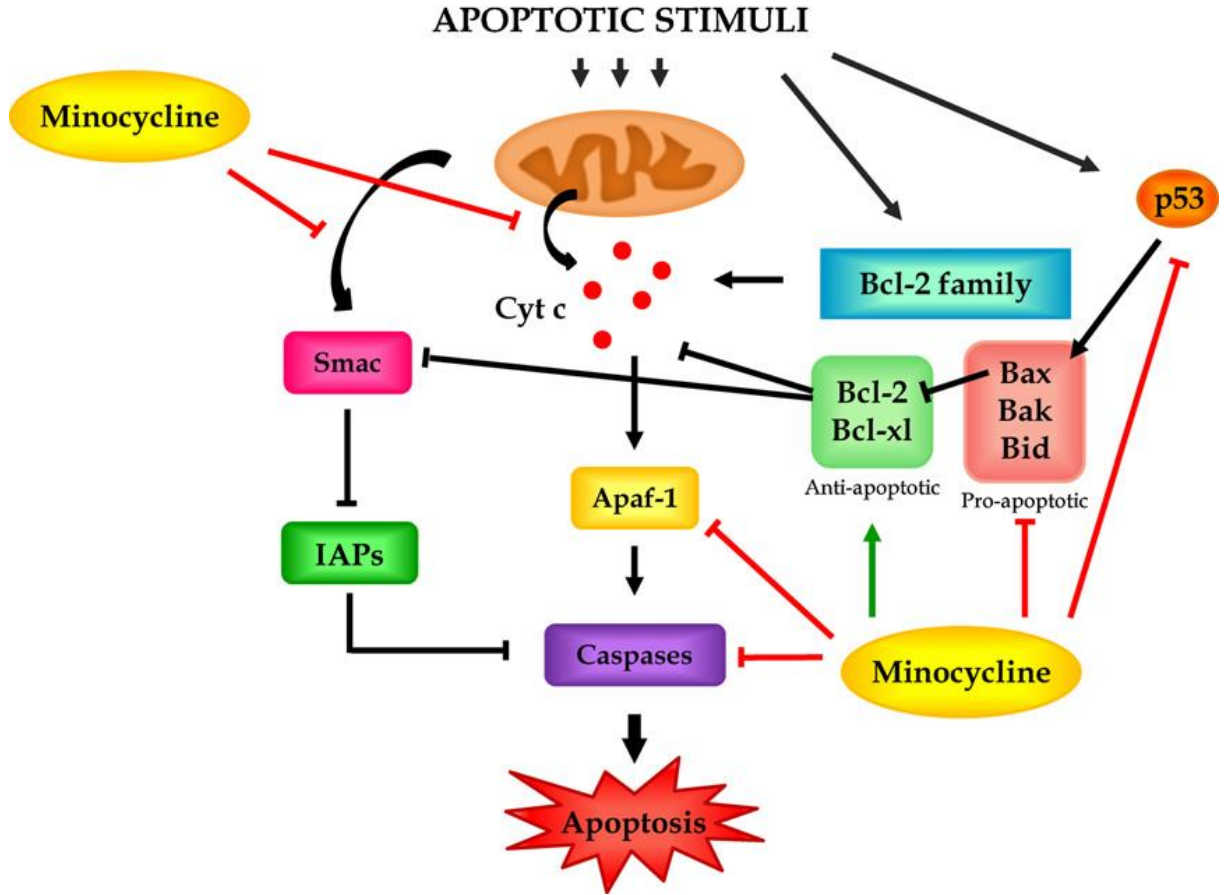
Nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkisinden, ayrıca yüksek lipofiliteye sahip olup kan-beyin bariyerini kolaylıkla aşabildiğinden dolayı ayrıca mikrogliyal aktiviteyi baskıladığından dolayı santral sinir sistemindeki birçok hastalıkta etkinliği gösterilmiştir. Bunlar arasında, beyin iskemisi, amyotrofik lateral skleroz (ALS), multiple skleroz (MS), Parkinson hastalığı, travmatik beyin hasarı bulunmaktadır^{14,16,131,132,133,134,135,136}.

Anti-inflamatuvar etkileri, sitokin salınım inhibisyonu, serbest radikal inhibisyonu, COX₂ ve indüklenir NOS sentez inhibisyonu yaparak ortaya çıkar^{16,137}.

Antiapoptotik etkilerini ise kaspas bağımlı ve bağımsız hücre ölümünde farklı yönleri ile invitro ortamlarda inhibe ederek gösterdiği saptanmıştır. Kaspas bağımlı, mitokondriyal membran geçişini bloke ederek sitokrom-C salınımını inhibe eder¹³³. Böylece kaspas-3 inaktive kalır. Ayrıca direk kaspas-1 inaktivasyonu yapar. Antiapoptotik olan Bcl-2 ve Bcl-xl sentez artışına, proapoptotik olan Bax, Bid, Fas, p53 salınımlarının da azalmasına yol açar¹³⁹ (şekil-3). Hatta bazı çalışmalarda iskemik kalp hücrelerinde kaspas 7, 8, 9 ve 12'nin ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir¹³⁷. Kaspas bağımsız olarak ise PARP-1 bağımlı hücre ölümünü, yani enzim aktivitesini en potent inhibe eden tetrasiklin yine minosiklidir¹⁴⁰ (şekil-4). Ateroskleroz, iskemi reperfüzyon hasarı, intestinal mukozit gibi hastalıklarla ilgili yapılmış çalışmalarda bu etkisi gösterilmiştir^{141,142,143}. Bunların yanında çinko bağımlı proteinazlar olan matriks metalloproteinazları (MMPs) inhibe ederler. Bunlar kollagenaz, gelatinaz gibi enzimler olup iskemi reperfüzyon hasarında rol oynarlar¹⁵.

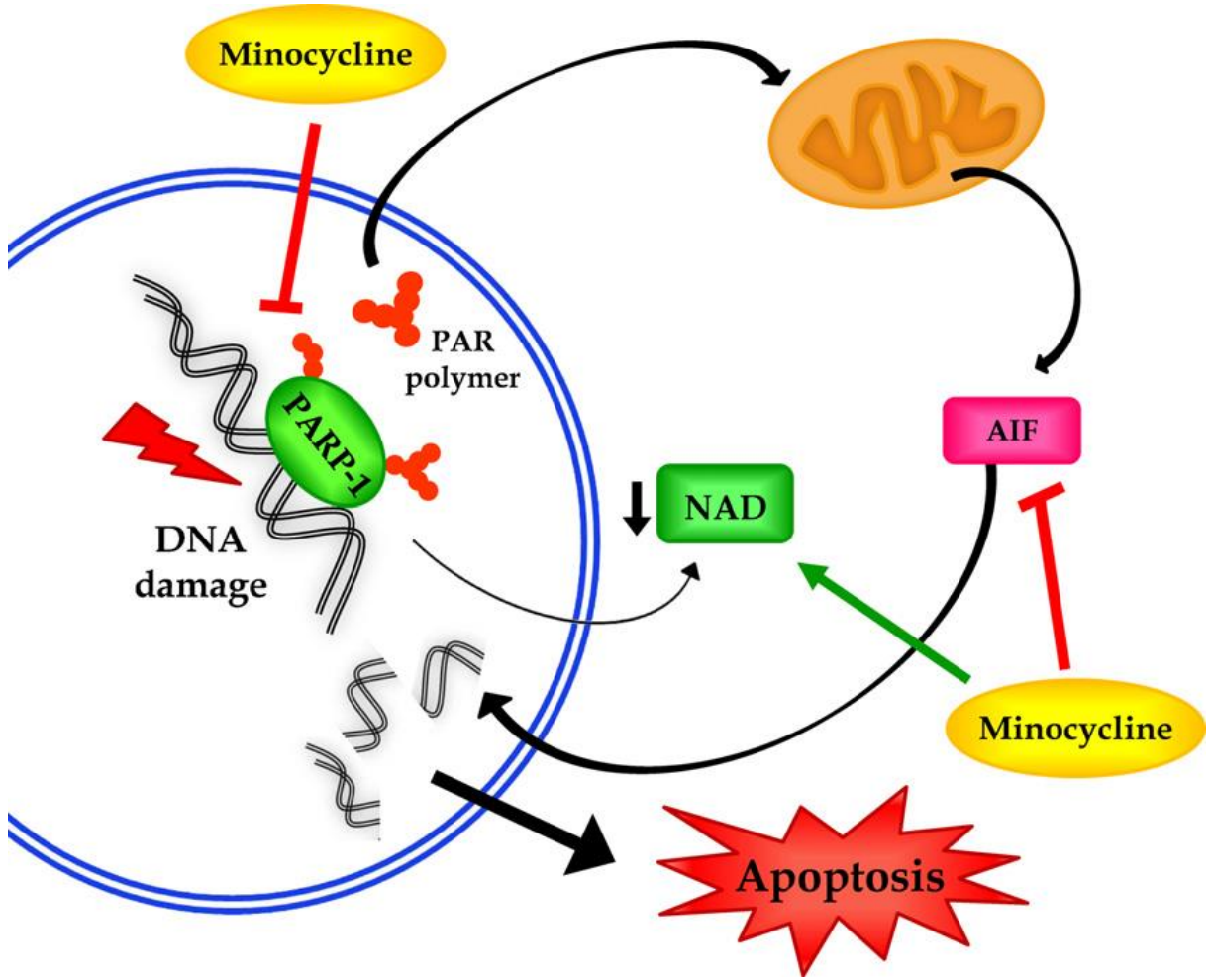
Antiapoptotik, antiinflamatuvar etkilerinden dolayı tetrasiklinler ile ilgili son dönemde hızla yaygınlaşan çalışmalar bulunmaktadır. Bunlara örnek, tetrasiklinlerin mast hücrelerinde

ve kolon kanser hücrelerinde apoptozu azalttığını (alfa-beta), iskemik hasara karşı myokard koruyucu etkilerini¹³⁷, santral sinir sistemi hastalıklarına karşı koruyucu etkilerini¹⁴, viral enfeksiyonlarda apoptozu engellendiğini¹⁴⁴, iskemik akut renal hasarları azalttığını gösteren çalışmalar olabilir¹⁵.



Şekil-3: Minosiklinin antiapoptotik etkisi (kaspas bağımlı) ¹³⁹ (Garrido-Mesa N, Zarzuelo

A. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline? Pharmacol Res. 2013 Jan;67(1):18-30)



Şekil-4: Minosiklinin antiapoptotik etkisi (kaspas bağımsız) ¹³⁹ (Garrido-Mesa N, Zarzuelo A. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline? Pharmacol Res. 2013 Jan;67(1):18-30)

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın, G. Ü. ET-12.038 kod numarası ile Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır. Çalışma, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirildi. Çalışmada ortalama ağırlıkları 235 ($\pm$ 20) gr olan, Wistar türü dişi albino sıçanlar kullanıldı. Toplam 8 grup bulunmakta olup her bir grupta 6'şar hayvan olmak üzere toplam 48 deney hayvanı kullanıldı.

Gruplar ve Açıklamaları

2 ana grup, 4'er alt grup, toplam 8 grup bulunmaktadır (tablo-1).

A- Uzun dönem sağkalım çalışması, işlem sonrası 90. Gün (3 ay) değerlendirme

1: (kontrol grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulandı. (n=6)

2: (sistemik ilaç grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulamasından 2 saat önce intraperitoneal (İP) sistemik minosiklin uygulandı, daha sonra yağ grefti uygulandı ve takip eden 4 gün boyunca günde 1 kez İP, sistemik minosiklin uygulaması yapıldı. (n=6)

3: (lokal ilaç grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulandı, yağ grefti aktarılırken lokal olarak greftlerin üzerine bir kez minosiklin verildi. (n=6)

4: (sistemik ve lokal (mikst) ilaç grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulamasından 2 saat önce intraperitoneal (İP) sistemik minosiklin uygulandı, daha sonra yağ grefti uygulaması sırasında greft üzerine tek seans minosiklin uygulandı, ardından 4 gün boyunca günde 1 kez İP, sistemik minosiklin uygulaması yapıldı. (n=6)

B- Erken dönem apoptoz değerdendirilecek grup, işlem sonrası **9. Gön** değerdendirme

5: (kontrol grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulandı. (n=6)

6: (sistemik ilaç grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulamasından 2 saat önce intraperitoneal (İP) sistemik minosiklin uygulandı, daha sonra yağ grefti uygulandı ve takip eden 4 gün boyunca günde 1 kez İP, sistemik minosiklin uygulaması yapıldı. (n=6)

7: (lokal ilaç grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulandı, yağ grefti aktarılırken lokal olarak greftlerin üzerine bir kez minosiklin verildi. (n=6)

8: (sistemik ve lokal (mikst) ilaç grubu): standart teknik ile yağ grefti uygulamasından 2 saat önce intraperitoneal (İP) sistemik minosiklin uygulandı, daha sonra yağ grefti uygulaması sırasında greft üzerine tek seans minosiklin uygulaması, ardından 4 gün boyunca günde 1 kez İP, sistemik minosiklin uygulaması yapıldı. (n=6)

Grup	Kontrol	Sistemik	Lokal	Lokal+ sistemik	Sağkalım
1	+	-	-	-	3 ay (90 gün)
2	-	+	-	-	3 ay (90 gün)
3	-	-	+	-	3 ay (90 gün)
4	-	-	-	+	3 ay (90 gün)
5	+	-	-	-	9 gün
6	-	+	-	-	9 gün
7	-	-	+	-	9 gün
8	-	-	-	+	9 gün

Tablo-1: Gruplar, ilaç uygulama yöntemleri ve sağkalım süreleri

Yağ grefti kaynağı olarak sıçanların inguinal bölgeleri kullanıldı. Alıcı saha ise sıçanın ense bölgesi olarak belirlendi. Ensede standart cep açıldı ve panniculus carnosus tabakasına yağlar yerleştirildi. Yağlar tek parça olarak nakledildi. Kontrol gruplarına (1 ve 5) hiçbir sistemik ya da lokal ilaç uygulaması yapılmadı. Inguinal bölgeden alınan yağlar salin ile yıkandıktan sonra enseye nakledildi. Sadece 3. ve 7. gruplara lokal olarak yağ grefti elde ettikten sonra minosiklin uygulandı ve daha sonra yağ nakli yapıldı. 2. ve 6. gruplara ise sadece işlemiden 2 saat öncesi periton içine minosiklin uygulaması yapıldı, daha sonra yağ greft işlemi yapıldı ve takip eden 4 gün boyunca günde bir kez periton içine ilaç uygulaması devam etti. 4. ve 8. gruplara ise hem sistemik hem de lokal minosiklin uygulaması yapıldı. 1., 2., 3., 4. gruplar sağkalımı değerlendirmek için oluşturuldu ve 3 ay (90 gün) sonra sakrifiye edilerek yağlar ense bölgesinden alındı. Histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. 5., 6., 7., 8. gruplar ise apoptoz yolağı değerlendirilmesi için 9 gün sonunda sakrifiye edildi ve yağlar enseden alındı. Makroskopik, volümetrik ve histolojik değerlendirmeler yapıldı.

Minosiklin uygulama yöntemleri

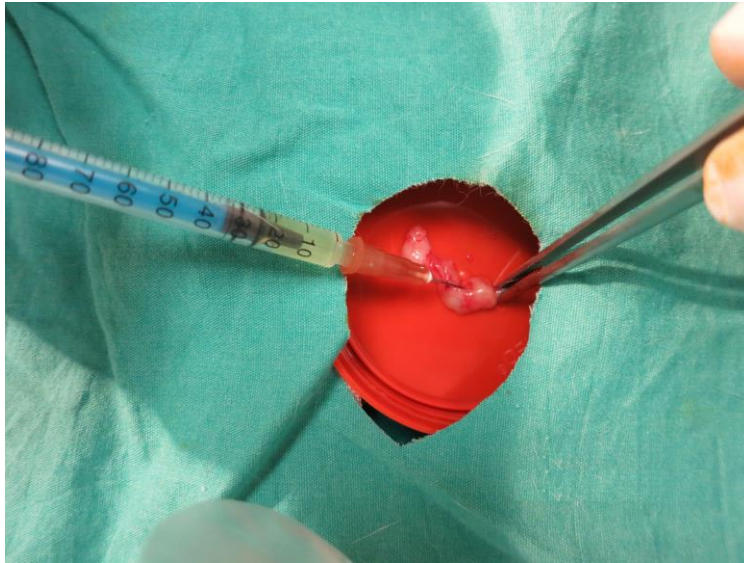
İki yolla ilaç uygulaması yapıldı: **Lokal** ve **Sistemik**

Toz halindeki ilaç serum fizyolojik (SF) ile sulandırıldı. Tek flakonda toplam 1 Gram Minosiklin Hidroklorür olarak temin edildi (şekil-5).



Şekil-5: Minosiklin Hidroklorür (1 gram)

Lokal: inguinal bölgeden elde edilen tek parça yağlar saline ile yıkandıktan sonra steril bir petri kabına yerleştirildi. Daha sonra 6 mg minosiklin enjektör yardımı ile yağ dokusunun içine enjekte edildi ve 37 C⁰ 'de 10 dakika bekletildi (şekil-6).



Şekil-6: Lokal minosiklin uygulaması

Sistemik: işlemden 2 saat önce 30 mg/kg minosiklin, kasık bölgesinden periton içine 27 G enjektör ile 0,5 cc olacak şekilde enjekte edildi. Takip eden 4 gün boyunca, gün içinde aynı saatte 1 defa olmak koşulu ile 30 mg/kg minosiklin yine periton içine enjekte edildi. Böylece her bir hayvan için toplam 5 enjeksiyon, 24 saatte bir yapıldı (şekil-7)



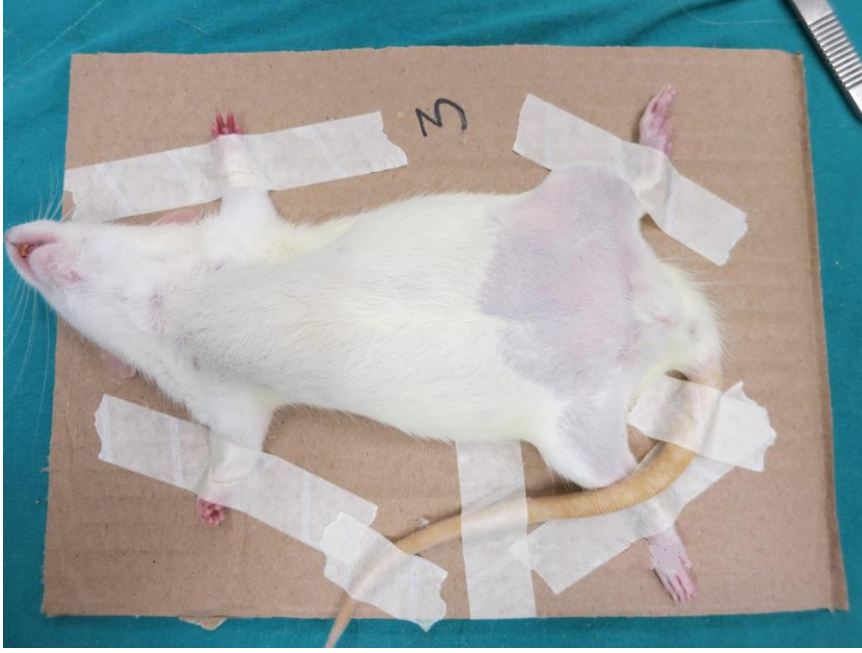
Şekil-7: Periton içine sistemik minosiklin enjeksiyonu

Cerrahi yöntem

Yağ greftlerinin elde edilmesi:

Sıçanların, 45 mg/kg Ketamin HCl ve 5 mg/kg Xylazin intramüsküler enjeksiyonu ile uygun anestezi sağlandı. Ardından ense ve sol kasık bölgeleri traşlandı (şekil-8, 9). Sıçanlar öncelikle sırt üstü pozisyonda her iki kol ve bacaklarından tespit edildi. Uygun saha temizliği ve örtümü takiben sol kasıkta inguinal ligamana paralel deri kesisi yapıldı. Deri

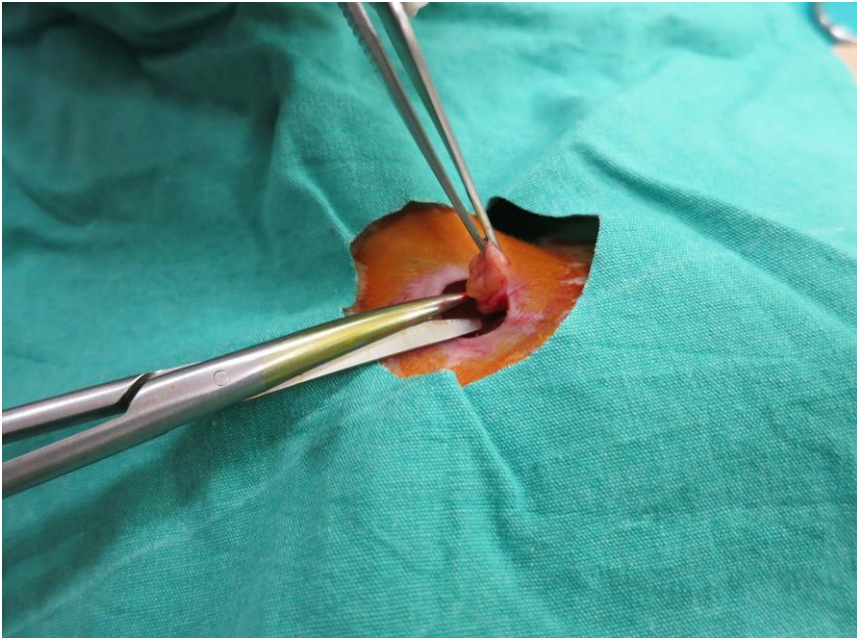
kesisi sonrası adipofasyal yastıkçığa ulaşıldı ve çevre dokudan diseke edildi (şekil-10). Yağ yastıkçığına giden epigastrik damarlar bağlandı. Elde edilen yağlar bekletilmeden hacimleri su taşıma yöntemi ile ölçüldü. Hacimleri dik duran ve içinde 1 mL serum fizyolojik sıvı bulunan 2,5 mL'lik enjektörlerle kurulan düzeneğe ölçüldü (şekil-11). Daha sonra gazlı bez üzerinde kurutulan yağlar hassas tartı ile ağırlıkları gram cinsinden ölçüldü.



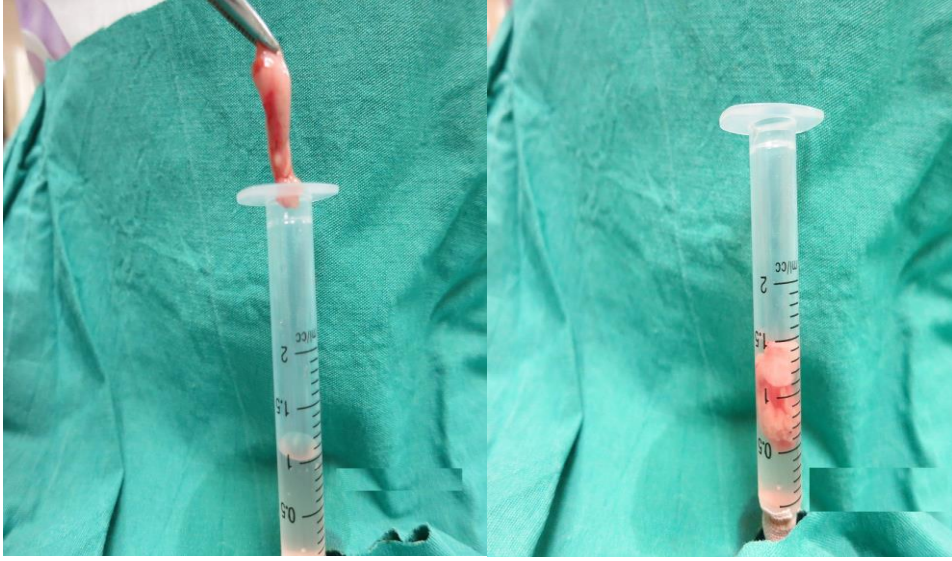
Şekil-8: Sırt üstü pozisyonda tespit edilen ve sol kasık bölgesi traşlanan denek



Şekil-9: Ense bölgesinin hazırlığı



Şekil-10: İnguinal yağ yastıkçığının diseksiyonu

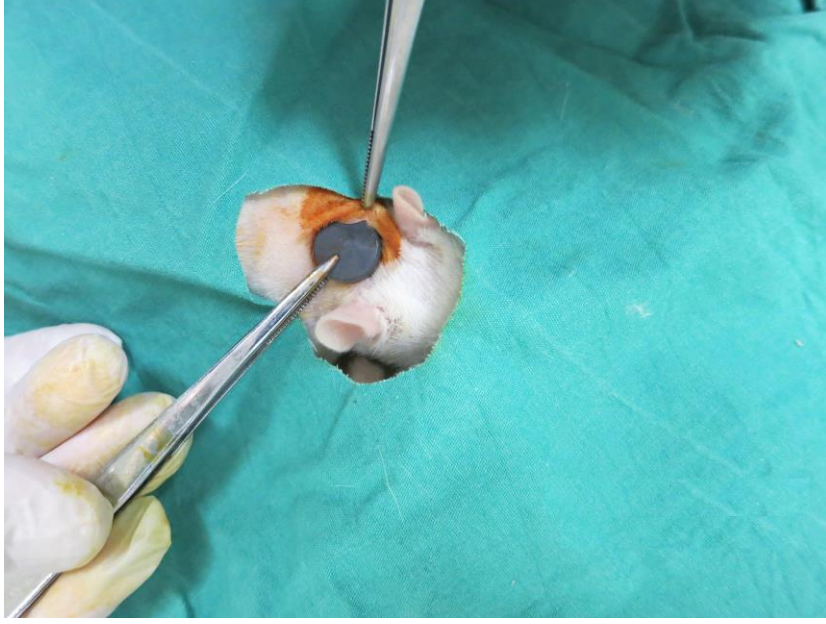


Şekil-11: Su taşıma yöntemi ile yağların hacminin ölçülmesi

Kasık bölgesinde açılan insizyonlar 4/0 absorbe edilen dikişlerle dikildi.

Yağ greftlerinin sıçan ensesine nakli:

Dikiş işlemi sonrası yüzüstü çevrilen sıçanların ensesine uygun saha temizliği ve örtümü takiben lineer insizyon ile girildi. Bu bölgede cilt altı planda panniculus carnosus tabakasının altında cep açıldı. Standardize edilmek üzere dairesel kesilmiş 2x2 cm boyutunda steril bir plastik kullanıldı (şekil-12). Takiben hazırlanmış ve ölçümleri yapılmış yağ tek parça şekilde hazırlanan cep içerisine yerleştirildi (şekil-13). Açılan insizyon 4/0 absorbe edilen dikiş ile dikildi. Daha sonra sıçanlara file giydirildi ve anestezinin etkisinin geçtikten sonra 12 saat gece, 12 saat gündüz döngüsü olacak şekilde uygun koşullarda bakım ve beslenmenin sağlandığı kafeslere alındı.



Şekil-12: Standart bir plaka kullanılarak uygun cep açılması



Şekil-13: Elde edilen yağların ensede açılan cep içerisine yerleştirilmesi

Doku örneklerinin elde edilmesi:

5., 6., 7., 8. grup sıçanların 9 gün yaşatıldıktan sonra 45 mg/kg Ketamin HCl ve 5 mg/kg Xylazin intramusküler enjeksiyonu sonrası uygun anestezileri sağlandı. Ense bölgeleri traş edildi ve yüzüstü tespit edildi. Yağ nakli yapılırken uygulanan lineer insizyon ile tekrar girildi. Cilt diseke edildi ve nakledilen yağlara ulaşıldı. Çevre bağ dokusundan uzaklaştırılarak hacim ve ağırlıkları ölçüldü ve histolojik incelemeler yapılmak üzere %10'luk nötral formol içine yerleştirildi (şekil-14).



Şekil-14: Ense yağ dokularının elde edilmesi

1., 2., 3., 4. grup sıçanlara ise 3 ay (90 gün) yaşatıldıktan sonra aynı işlemler uygulandı. Dokular alındıktan sonra tüm sıçanların kalplerinden tüm kanları enjektör ile alındı ve ötenazi sağlandı.

Histolojik Yöntemler

Yağ pakelerine ait tüm doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 24 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirildiler. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından erimiş parafine gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4-5 mikron kalınlığındaki kesitlere tüm gruplar için Hematoksilen-Eozin boyaması, 9. gün sakrifiye edilen gruplar için immünohistokimyasal TUNEL yöntemi ve 90. gün sakrifiye edilen gruplar için de oil red O boyaması uygulandı. Kesitler Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve resimleri çekildi.

Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan değerlendirmeler sonucunda Dejenerasyon Kriterleri tablosu oluşturuldu.

Boya Solüsyonlarının Hazırlanışı :

1- Harris Hematoksilen Solüsyonu

Hematoksilen 1gr

Alkol 10 ml

Potasyum alum (alüminyum potasyum sülfat) 20 gr

Distile su 200 ml

Civa oksit 0.5 gr

Glasiyal asetik asit 8 ml

2- Eozin Solüsyonu

Eozin 1gr

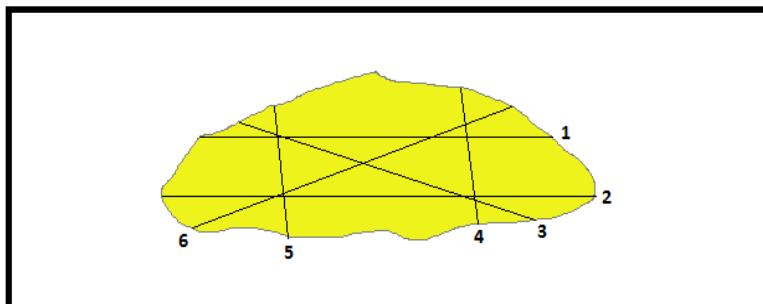
Distile su 100 ml

1 küçük timol kristali

Boyama Yöntemi :

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 30 dakika bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutuldu. 10 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen’de 10-15 dakika boyandı ve 10 dakika akar suda yıkandılar. % 70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asedik asit karışımına batırılıp tekrar 10 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 5-10 dakika Eozinde bekletilip 10 dakika daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

Dokuda tüm alan büyüklüğünün sayısal değerlendirilmesinin yapılabilmesi adına, 1.25x’lik objektif kullanılarak tüm alanda, her grup ve her hayvan için 6 ayrı bölge kesitsel düzlemde uzunluk ölçümü yapıldı (şematik çizim), istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu.



Şematik çizim: Tek parça yağ dokusunun ekvatoryal düzlemde alınan kesit alanında, mikroskop altında (1,25x'lik büyütmede) 2 en uzun, 2 en kısa ve 2 çapraz kesitsel uzunluk (μm) ölçümleri

Oil Red O Boyama Yöntemi

Doksanıncı gün sakrifiye edilen deney gruplarına ait yağ dokusu bloklarından lamlara 4 μm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60°C etüvde 1,5 saat bekletildikten sonra, 2x5 dakika ksilole alınarak deparifizasyonları sağlandı. 2x3 dakika %100'lük alkolden geçirildikten sonra sırasıyla azalan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Kesitler daha sonra distile suyla yıkanarak öncelikle; Bio-optika Oil Red O (Cat: 04-220923, Lot: 4812, Bio-Optica 20134 Milano, ITALY via S. Faustino 58) kitine ait Oil Red O Solüsyonuna (reagent A) 20 dakika etkin bırakıldı. Süre sonunda fazla boyanın arındırılması amacıyla hızlıca akar suda çalkalanarak yıkanan kesitlere 10 damla Hematoksilen Solüsyonu (reagent B) damlatıldı ve 30 saniye bekletildi. Daha sonra, dokular 3 dakika boyunca akar suda yıkandı. Son olarak suyu alınan camlar Large Volume Vision Mount (Thermo Scientific) ile kapatıldı.

TUNEL Yöntemi

DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için in situ apoptozis saptama kiti kullanıldı (Millipore Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Lot: 2199001. Temecula, CA 92590). Parafin bloklardan elde edilen kesitler 37 °C 'deki etüvde bir gece tutuldular, daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57 °C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat tutuldular. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak amacıyla 2 kez 15'er dakika ksilol'e etkin bırakıldılar. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik etil alkol serilerinden geçirildiler. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra 15 dakika 20 $\mu\text{g/ml}$ proteinaz K ile inkübe

edildiler. Distile su ile yıkama aşamasından sonra 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37 °C nemli ortamda TdT enziminde (77 µL Reaksiyon Buffer + 33 µL TdT Enzim, 1µl TdT enzim) inkübe edildiler. Ardından oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tamponunda 10 dakika bekletildi ve Anti-Digoxigenin'de 30 dakika inkübe edildiler. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 5-10 dakika süreyle Metil yeşili uygulandı.

Boyanan camlar artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra 20 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletildiler. Ardından entellan ile kapatıldı.

Dokuda apoptozise giden hücreler saptandı ve hücreler 1 merkez, 5 perifer bölgede olmak üzere toplam 6 bölge için tüm grup ve tüm hayvanlarda sayılarak, istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu.

İstatistiksel Yöntem

Değerlendirilen bütün parametrelerden elde edilen verilerin istatistiksel incelemesi için SPSS for Windows v15.0 programından (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) faydalanıldı. Tüm verilerin ortalama, ortanca, minimum, maksimum ve standart sapmaları hesaplandı. Verilerin karşılaştırılmasında bağımsız değişkenler için Mann Whitney-U testi ve Kruskal Wallis varyans analizi, bağımlı değişkenler için Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılmıştır. Değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Makroskopik Bulgular

Grup 1, 2, 3 ve 4'te bulunan toplam 24 hayvan 3 ay süreyle uygun koşullarda takip edildi. Grup 5, 6, 7 ve 8'de bulunan hayvanlar ise 9 gün boyunca uygun koşullarda takip edildi. Otokanibalizme bağlı inguinal bölgede postoperatif ikinci günde yara yeri açılmaları görüldü tekrar yara yerleri dikilerek günlük takipleri yapıldı. Hiçbir denekte ense bölgesinde abse, enfeksiyon, nekroz, hematoma veya seroma gibi bir komplikasyon görülmedi. Çalışma süresince hiçbir hayvanda kayıp gözlemlenmedi.

Bütün deneklerin işlem öncesi ağırlıkları kaydedildi ve daha sonra kurban edildikleri günler ağırlıkları tekrar ölçüldü. İşlem öncesi 235 (± 20) olan ortalama değerleri işlem sonrası 230 (± 18) olarak ölçüldü. İşlem sonrası ağırlıklar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Ense bölgelerinde yapılan insizyon sonrası elde edilen yağlar incelendiğinde grup 1'de daha küçük boyutlarda ve daha az kanlanan yağ greftleri dikkati çekti. Grup 2, 3'te ise kontrol grubuna göre daha iri ve daha çok kanlanan yağlar saptadı. Grup 4'te ise yağ greftlerinin daha iri olduğu, yapılarını daha iyi muhafaza ettikleri ve daha vasküler oldukları gözlemlendi (şekil 15-16).



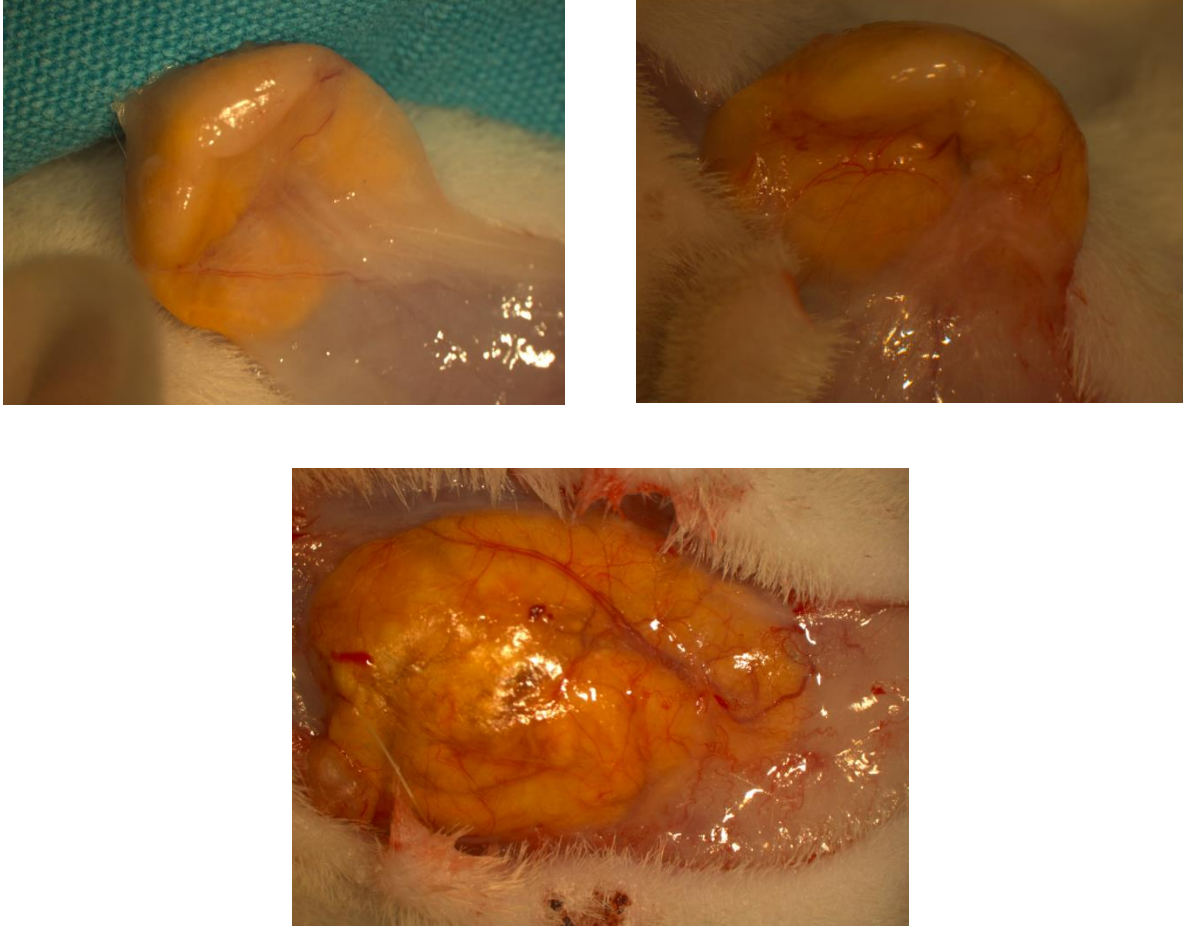
Şekil-15: Kontrol grubuna ait makroskopik görüntü, yağ greftinin solgun ve damarlanmanın az olduğu görülmekte



Şekil-16: Sistemik + lokal grubua ait makroskopik görüntü, yağ dokusunun hacimsel olarak daha büyük olduğu ve kanlanmanın daha fazla olduğu görülmekte

Makroskopik görüntüleri desteklemek için kullanılan 5x büyütmede de (S8 APO, Leica, Weetlar, Germany, DFC 320 Camera, Leica, Weetlar, Germany) grup 2, 3 ve 4'ün kontrol grubu olan grup 1'e göre daha iyi korunduğu ve daha fazla kanlandığı gözlemlendi (şekil-17).

Grup 5 ve diğer gruplar 9. Gün sakrifiye edildikten sonra ense yağlarına bakıldığında makroskopik ve 5x büyütmede (S8 APO, Leica, Weetlar, Germany, DFC 320 Camera, Leica, Weetlar, Germany) yapılan inceleme sonucu grup 5'deki yağların daha az vaküler olduğu gözlemlendi. Grup 6, 7 ve 8 arasında makroskopik bir fark gözlenmedi.



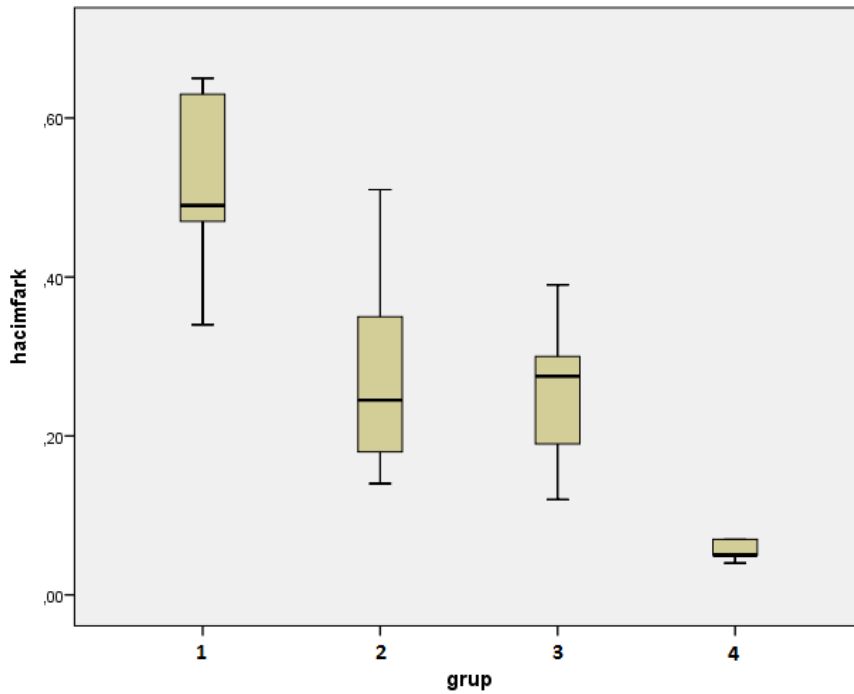
Şekil-17: 5x büyütme, sol üst; grup 1'deki yağ grefti damarlanması, sağ üst; grup 2'deki yağ grefti damarlanması, alt orta; grup 4'deki yağ grefti damarlanması

Yağ greftleri, yapılan insizyondan girilerek çevre dokudan dikkatlice diseke edildi. Daha sonra su taşıma yöntem ile hacimleri ve hassas tartı ile ağırlıkları gram cinsinden ölçüldü (tablo 2). Greftleme öncesi ve sonrası yağ hacim farkları ve ağırlık farkları karşılaştırıldı.

Denek no	Grup 1 (cc)		Grup 2 (cc)		Grup 3 (cc)		Grup 4 (cc)	
	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra
1	0,71	0,10	0,30	0,18	0,41	0,20	0,52	0,48
2	0,68	0,12	0,60	0,30	0,42	0,14	0,51	0,46
3	0,66	0,16	0,57	0,30	0,56	0,21	0,59	0,52
4	0,53	0,10	0,72	0,44	0,82	0,31	0,50	0,45
5	0,52	0,23	0,64	0,45	0,41	0,27	0,59	0,44
6	0,58	0,21	0,68	0,29	0,45	0,27	0,51	0,46
Denek no	Grup 1 (gr)		Grup 2 (gr)		Grup 3 (gr)		Grup 4 (gr)	
	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra
1	0,7165	0,0994	0,3040	0,1897	0,4167	0,2152	0,5092	0,4847
2	0,6864	0,1270	0,6121	0,3031	0,4291	0,1471	0,5034	0,4669
3	0,6699	0,1671	0,5753	0,3077	0,5723	0,2243	0,5852	0,5229
4	0,5332	0,1415	0,7219	0,4408	0,8223	0,3220	0,4950	0,4569
5	0,5261	0,2540	0,6420	0,4550	0,4114	0,2756	0,5801	0,4405
6	0,5836	0,2155	0,6803	0,2959	0,4588	0,2775	0,5186	0,4625

Tablo 2: Grup 1, 2, 3, 4'ün işlem öncesi ve sonrası yağ grefti hacim (cc) ve ağırlık (gr) değerleri

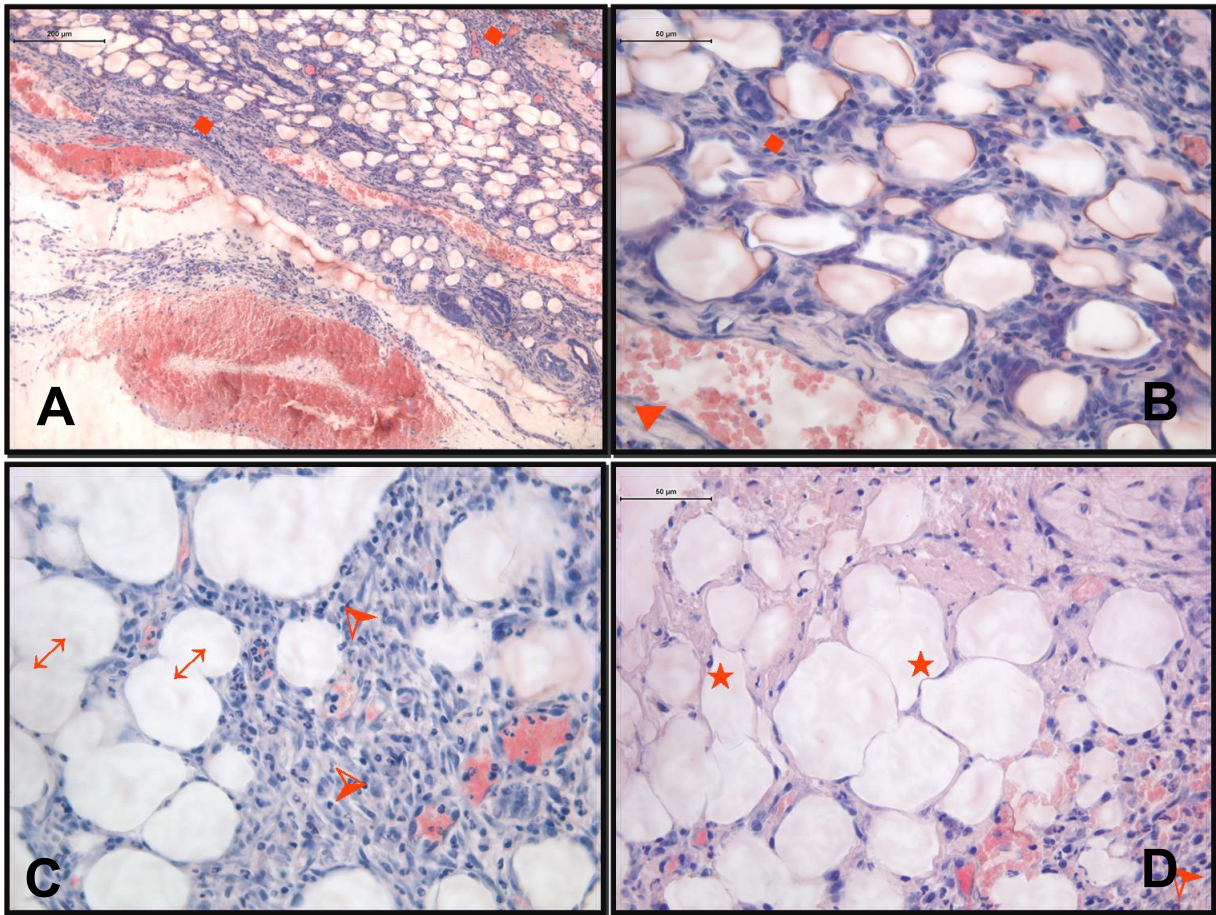
Yağ grefti sağkalımı değerlendirildiği zaman işlem öncesi grup 1’de ortalama yağ grefti hacmi $0,61 \pm 0,08$ iken 3 ay sonunda ortalama yağ grefti hacmi $0,15 \pm 0,05$ olarak hesaplandı. Grup 2’de işlem öncesi ortalama yağ grefti hacmi $0,58 \pm 0,14$ iken 3 ay sonunda hacim ortalaması $0,32 \pm 0,10$ olarak hesaplandı. Grup 3’de işlem öncesi ortalama yağ grefti hacmi $0,51 \pm 0,16$ iken 3 ay sonunda hacim ortalaması $0,23 \pm 0,06$ olarak hesaplandı. Grup 4’de ise işlem öncesi ortalama yağ grefti hacmi $0,53 \pm 0,04$ iken 3 ay sonunda hacim ortalaması $0,46 \pm 0,02$ olarak hesaplandı. İşlem öncesi hacimler incelendiği zaman gruplar arası hacim farklılıkları saptamadı ($p>0,05$), böylece hacimler arası dengesiz dağılımlar görülmemiş oldu. Üç ay sonunda hacim değişimleri ele alındığında grup 1’de hacim azalması diğer bütün gruplara göre daha anlamlı şekilde azaldı ($p<0,05$). Grup 2 ile 3 arasında hacim ve ağırlık azalmasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Grup 4’de ise diğer bütün gruplara göre hacim ve ağırlık azalması anlamlı şekilde az olarak saptandı ($p<0,05$). Böylece 3 ay sonunda en fazla hacim azalması grup 1’de görülürken en az azalma grup 4’de görüldü (grafik-1).



Grafik-1: Gruplar arası 3 aylık süreçte hacim değişim miktarları

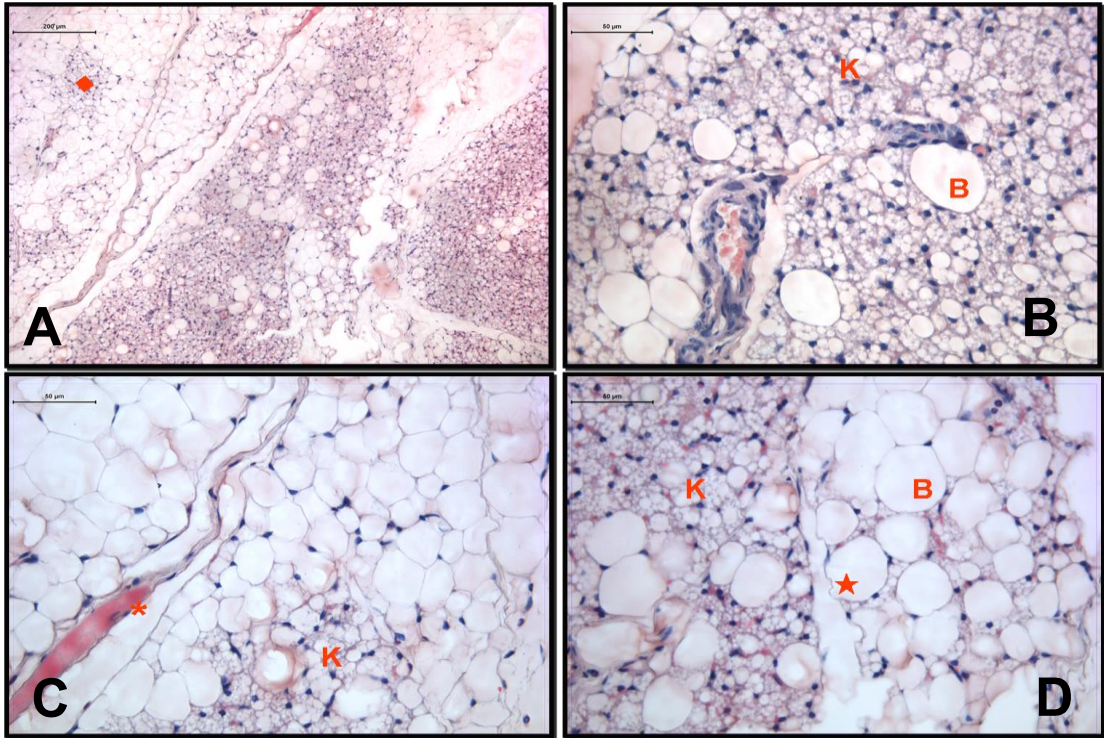
Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan değerlendirmelerde; ilaç verilmeksizin, sadece yağ greft uygulaması yapılan ve 9. gün kurban edilen kontrol grubu'nda (Grup 5); bazı adipositlerde deformasyon, adipositler arası bağ dokuda lenfosit infiltrasyonu ve yine bu alandaki bağ dokuda artış görüldü. İntersellüler matriks ve bağ doku artışı ile birlikte, dilate damarlar da dikkati çekti. Adipositler yer yer birbirleri ile birleşerek, adipositler arasında füzyon izlendi. Ayrıca lipid içeriğinde bozulma, heterojen lipid birikimi ile birlikte bazı adipositlerde de şekil bozukluğu tespit edildi (şekil-18).



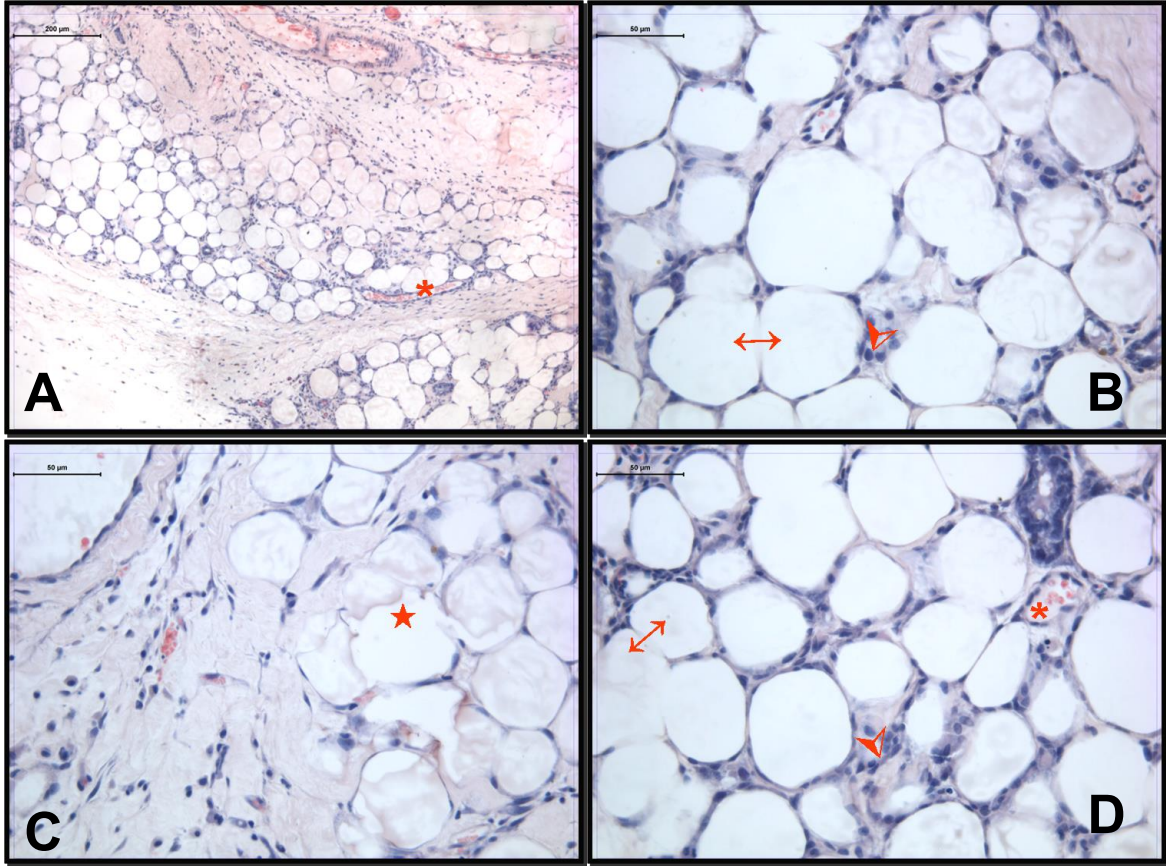
Şekil-18: Grup 5’de bazı adipositlerde deformasyon ve şekil bozukluğu (★) (18D), adipositler arası bağ dokuda (■) artış (18A,18B) ve bu alanlarda lenfosit infiltrasyonu (➤) (18C,18D) izlendi. Doku içerisinde dilate damarlar (▶) (18B) ve adipositlerin oluşturduğu füzyon (↔) (18C) yapıları görüldü (18A: Hematoksilen-Eozin x100; 18B,18C,18D: Hematoksilen-Eozin x400)

İlaç verilmeksizin, sadece yağ grefti uygulanan ve 90. gün sakrifiye edilen kontrol grubu'nda (Grup 1); adipositler arasındaki bağ dokuda azalma, intersellüler matriks ve adipositler arası bağ dokunun normal adiposit dokusu ile uyumlu olduğu görüldü. Bu grup lenfosit infiltrasyonunda belirgin bir azalma dikkati çekti. Adiposit doku çevresindeki kapsüler bağ dokusu yapıları normal kontrol grubu yağ dokusu özellikleriyle uyumlu olarak izlendi. Adipositler arasında kapiller yapılar gelişkin ve normal yapılarında izlendi. Beyaz yağ dokusu hücrelerinin yanı sıra, doku genelinde yaygın olarak kahverengi yağ dokusu hücreleri (Brite Adiposit) ayırt edildi. Beyaz yağ dokusu hücrelerine bakıldığında, Grup 5'den farklı olarak, bu grupta izlenen beyaz yağ dokusu hücrelerindeki füzyon ve şekil bozukluklarının büyük ölçüde azaldığı ancak bazı alanlarda beyaz yağ dokusu hücrelerinde şekil bozukluklarının devam ettiği ve lipid içeriklerinin bozularak, miyelin benzeri figürlerin olduğu saptandı (Şekil-19).



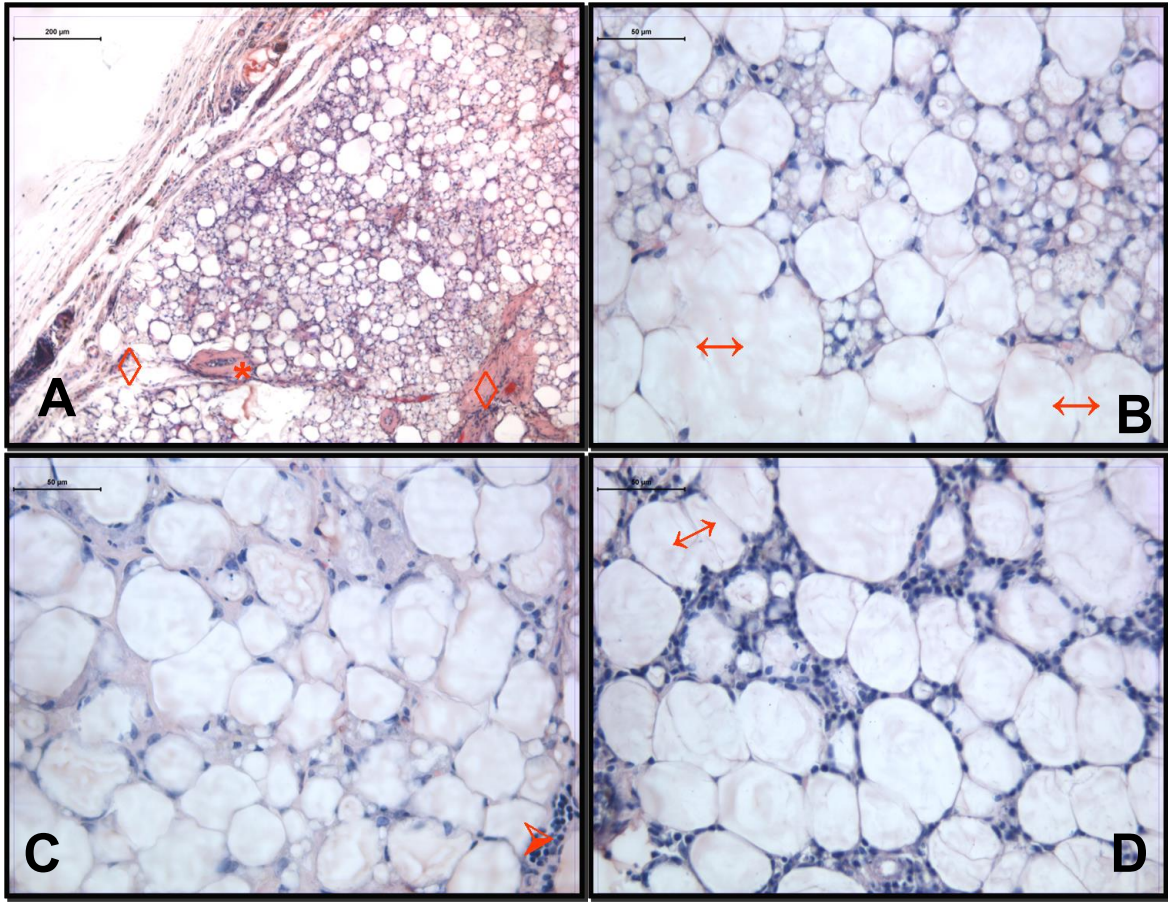
Şekil-19: Grup 1'de adipositler arası bağ dokuda (■) azalma görüldü (19A). Damarlar gelişkin ve normaldi (*) (19C). Beyaz yağ dokusu hücrelerinin (B) yanı sıra, kahverengi yağ dokusu hücrelerinin (K) varlığı dikkati çekti (19B,19D). Adipositlerde deformasyon ve şekil bozukluğu (★) azdı (19D) (19A: Hematoksilen-Eozin x100; 19B,19C,19D: Hematoksilen-Eozin x400)

Yağ grefti uygulaması öncesi lokal minosiklin uygulaması yapılan ve 9. gün sakrifiye edilen Grup 7'nin; 9.gün sakrifiye edilen kontrol grubu (Grup 5) ile karşılaştırıldığında, en belirgin farklılığın lenfosit infiltrasyonundaki azalma olduğu izlendi. Bununla birlikte, damarlardaki dilatasyon da bu grupta izlenmedi. Grup 5'e oranla, doku çok daha normal histolojik görünümde olmakla birlikte, bazı beyaz yağ dokusu hücrelerinde şekil bozuklukları ve bazılarında da füzyon, izlenen dejeneratif bulgular olarak değerlendirildi (şekil-20).



Şekil-20: Grup 7'de lenfosit infiltrasyonunda (➤) azalma (20B,20D) görülürken, damarlar normal yapısındaydı (*) (20A,20D). Bazı beyaz yağ dokusu hücrelerinde deformasyon ve şekil bozukluğu (★) (20C), bazılarında da füzyon (↔) dikkati çekti (20B,20D) (20A: Hematoksilen-Eozin x100 ; 20B,20C,20D: Hematoksilen-Eozin x400)

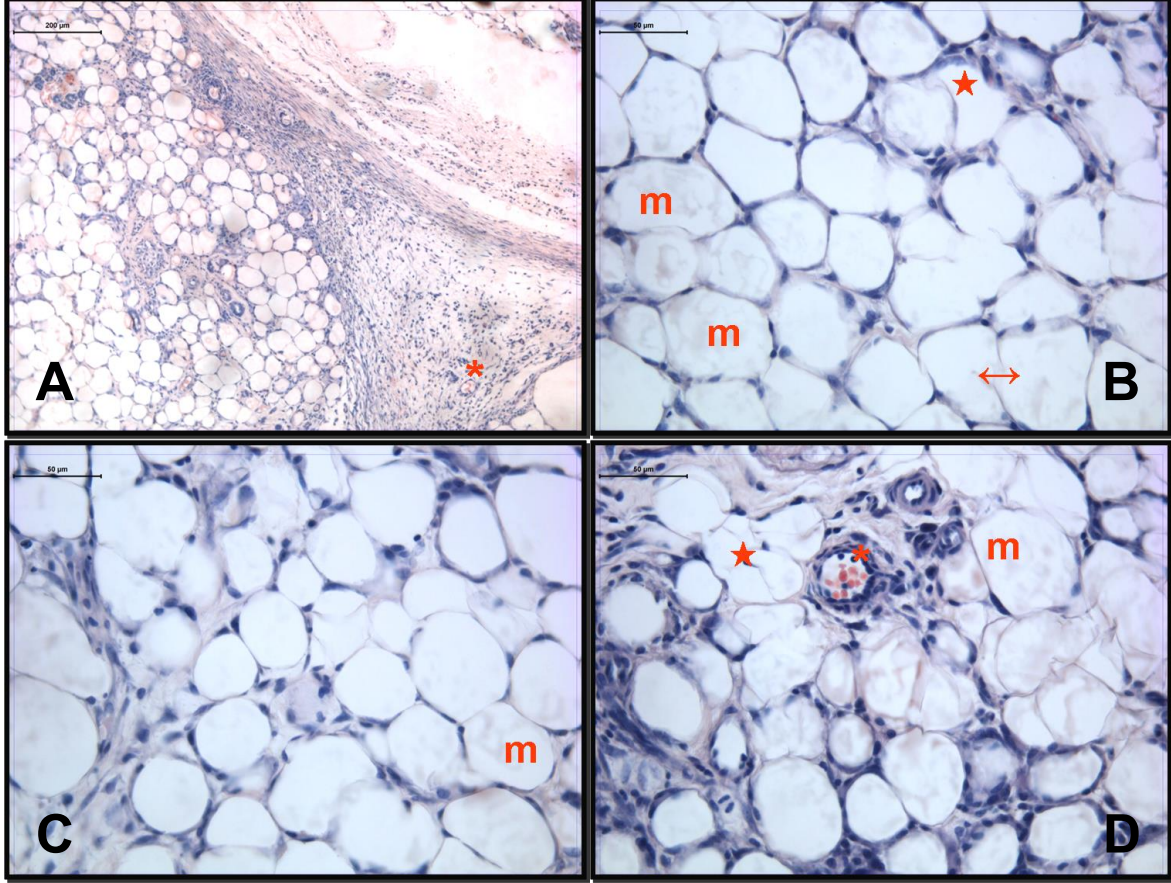
Yağ grefti uygulaması öncesi lokal minosiklin uygulaması yapılan ve 90. gün sakrifiye edilen Grup 3’de; irili ufaklı adipositler arasındaki çevre bağ dokudan gelen kapsüllerin dokuda lobüler yapılar oluşturduğu ve oluşan bu bağ dokusu septaların, adipositler arasına kapiller yapıları taşıdığı izlendi. Beyaz yağ dokusu hücreleri arasında ciddi ölçüde füzyon olduğu tespit edildi. 9. gün sakrifiye edilen kontrol grubu’na (Grup 5) oranla, adipositler arasında lenfosit infiltrasyonu az olmakla beraber, yine de varlığını sürdürdüğü dikkati çekti (şekil-21).



Şekil-21: Grup 3’de çevre bağ dokudan gelen kapsüllerin (◇) dokuda lobüler yapı oluşturduğu ve bu septaların dokuya kapiller taşıdığı (*) (21A), füzyon yapılarının (↔) çoğunlukta olduğu (21B,21D) ve az olmakla birlikte lenfosit infiltrasyonu (➤) (21C) dikkati çekti (21A: Hematoksilen-Eozin x100; 21B,21C,21D: Hematoksilen-Eozin x400)

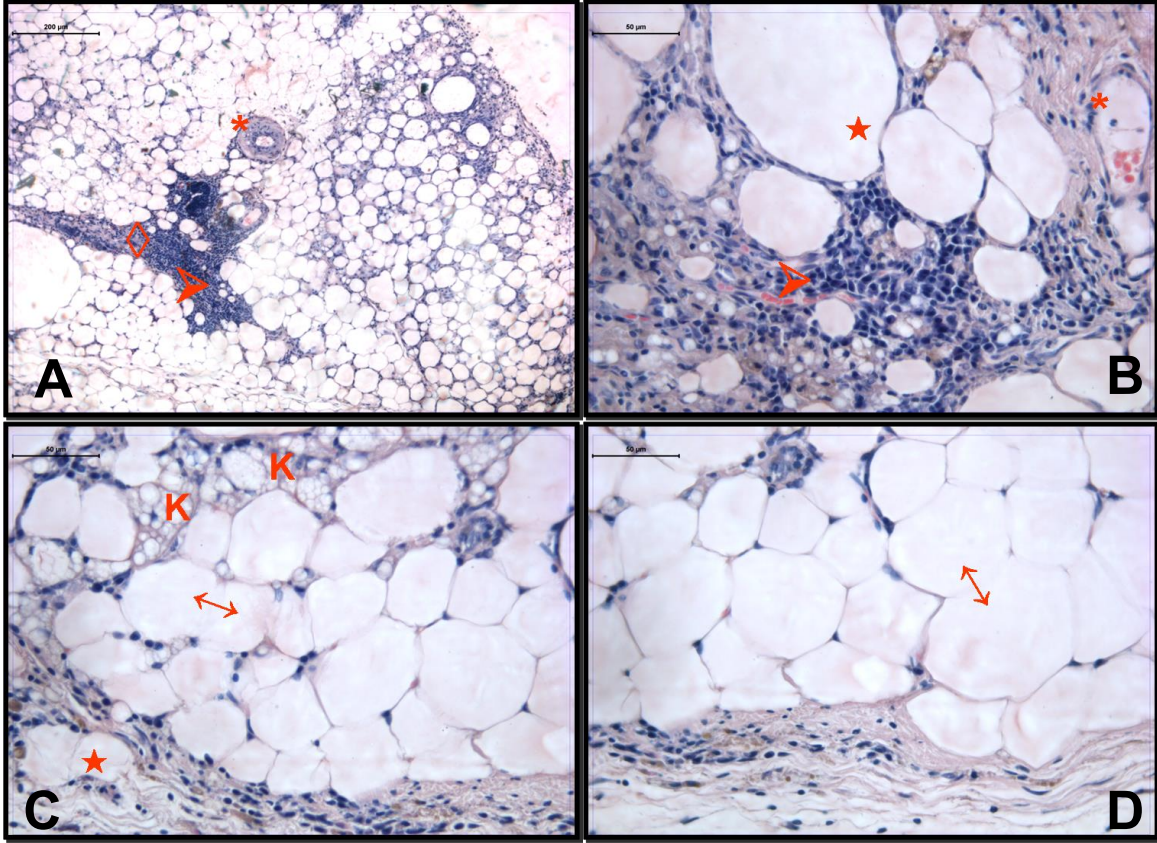
Yağ grefti uygulaması öncesi ve sonrası sistemik minosiklin uygulaması yapılan ve 9. gün sakrifiye edilen Grup 6’da; beyaz yağ dokusu hücrelerinde yer yer şekil bozulmaları ve

bazı yağ dokusu hücrelerinde de füzyon izlenirken, bazı beyaz yağ dokusu hücrelerinin lipid içeriklerinin bozulduğu ve miyelin figür benzeri oluşumlar meydana getirdiği izlendi. Damarlarda dilatasyon tespit edilmedi (şekil-22).



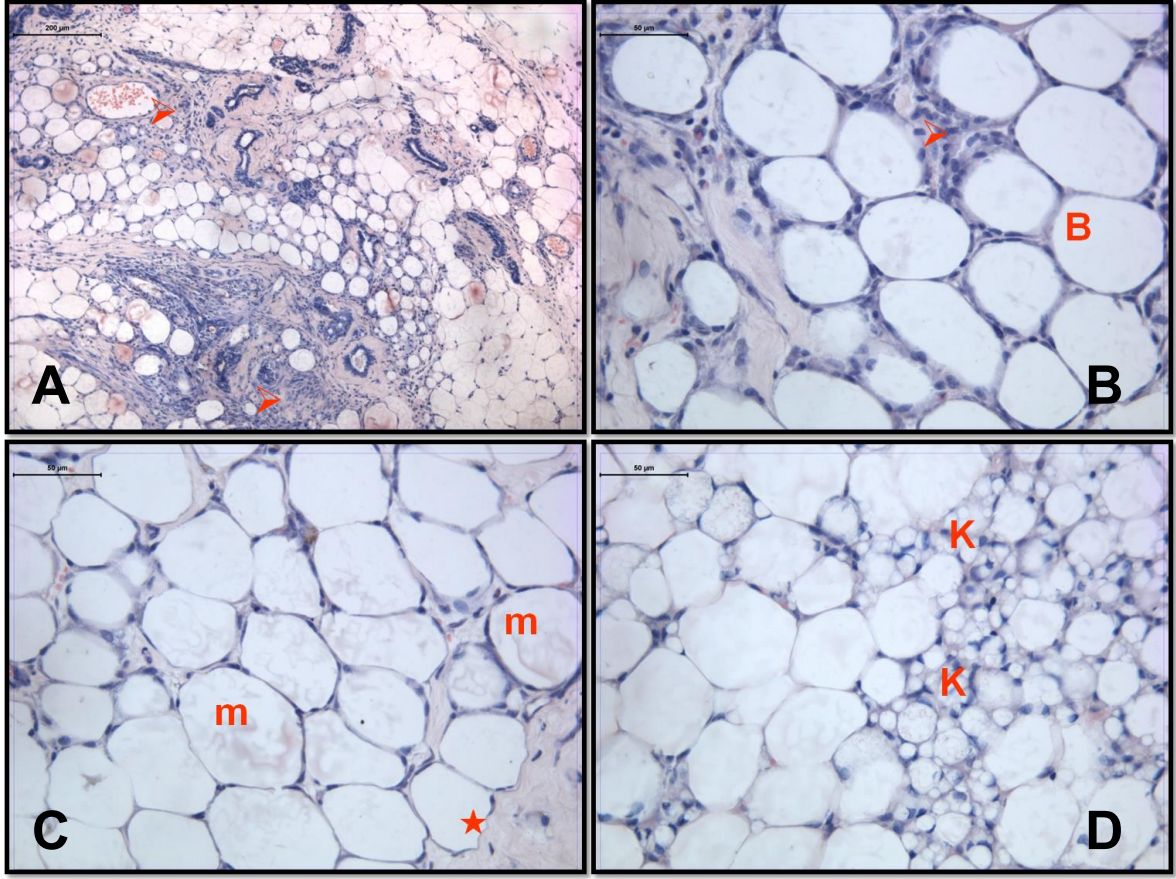
Şekil-22: Grup 6’da beyaz yağ dokusu hücrelerinde yer yer deformasyon ve şekil bozukluğu (★) (22B,22D), bazılarında füzyon (↔) (22C) dikkati çekti. Bazı hücrelerin lipid içeriklerinde miyelin benzeri figür oluşumu (m) izlendi (22B,22C,22D). Damarlar normal yapısındaydı (*) (22A,22D) (22A: Hematoksilen-Eozin x100; 22B,22C,22D: Hematoksilen-Eozin x400)

Yağ grefti uygulaması öncesi ve sonrası sistemik minosiklin uygulaması yapılan ve 90. gün sakrifiye edilen Grup 2’de; çevre bağ dokudan adipositler arasına giren septalarda bol miktarda kan damarı oluşumu izlenirken, bu bağ dokusu içerisinde belirgin lenfosit infiltrasyonu izlenmekteydi. Bazı beyaz yağ dokusu hücrelerinde füzyon ve şekil bozukluğu dejeneratif bulgu olarak izlenmeye devam etti. Kahverengi yağ dokusu hücrelerinin varlığı (Brite Adiposit) belirgindi (Şekil-23).



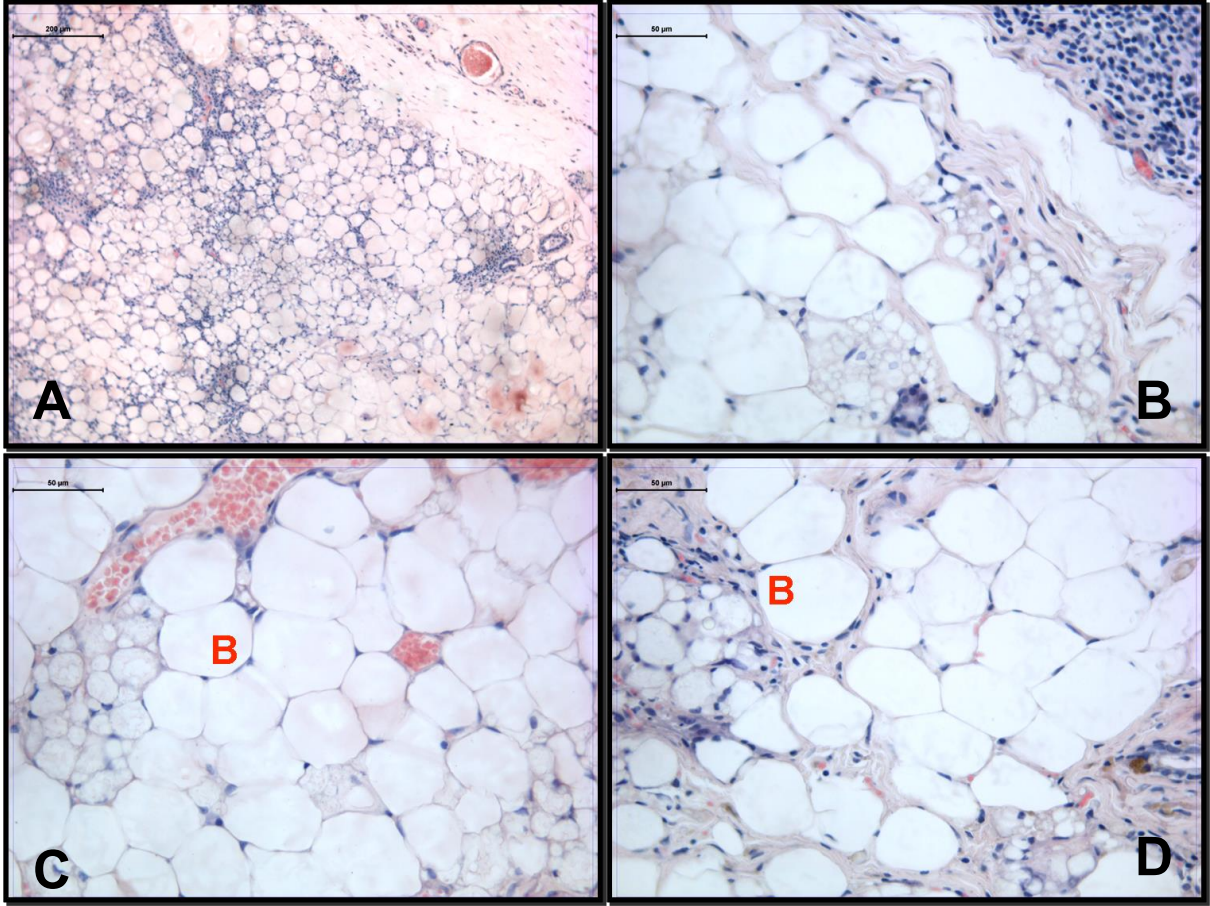
Şekil-23: Grup 2’de çevre bağ dokudan gelen kapsüllerin (◇) adipositler arasına bol kan damarı taşıdığı (*) (23A,23B), bu bölgede belirgin lenfosit infiltrasyonu olduğu (➤) (23A,23B) dikkati çekti. Bazı beyaz yağ dokusu hücrelerinde füzyon (↔) (23C,23D), deformasyon ve şekil bozukluğu (★) (23B,23C) görüldü. Kahverengi yağ dokusu hücrelerinin varlığı (K) belirgindi (23C) (23A: Hematoksilen-Eozin x100; 23B,23C,23D: Hematoksilen-Eozin x400)

Yağ grefti uygulaması öncesi lokal ve sistemik minosiklin uygulaması, sonrasında ise sistemik minosiklin uygulaması yapılan ve 9. gün sakrifiye edilen Grup 8’de; yağ dokusu çevresindeki ve aralarındaki bağ dokusu septalarda bulunan kan damarları çevresinde belirgin lenfosit infiltrasyonu gözlemlenirken, doku genelinde lenfosit infiltrasyonunun çok yoğun olmadığı saptandı. 9. gün sakrifiye edilen diğer gruplardan ayrıcalıklı olarak bu grupta, kahverengi yağ dokusu hücrelerinin belirgin olarak izlendiği tespit edildi. Beyaz yağ dokusu hücreleri düzgün kontürleri ve homojen lipid içerikleri ile ayırt ediliyordu. Bazı yağ dokusu hücrelerinde ve doku genelinde seyrek olmakla beraber bazı alanlarda, minimal ölçüde yağ hücresi kontürlerinde bozulma ve lipid içeriğinde miyelin figür oluşumu izlendi (şekil-24).



Şekil-24: Grup 8’de özellikle bağ doku septalarda bulunan kan damarları çevresinde belirgin lenfosit infiltrasyonu (➤) (24A) görüldü, kahverengi yağ dokusu hücrelerinde (K) belirgin artış (24D) tespit edildi. Beyaz yağ dokusu hücreleri düzgün kontürleri ve homojen lipid içerikleri ile (B) ayırt edildi (24B). Yağ dokusu hücrelerinde minimal düzeyde deformasyon ve şekil bozukluğu (★) ve lipid içeriğinde miyelin figür oluşumu izlendi (m) (24C) (24A: Hematoksilen-Eozin x100; 24B,24C,24D: Hematoksilen-Eozin x400)

Yağ grefti uygulaması öncesi lokal ve sistemik minosiklin uygulaması, sonrasında ise sistemik minosiklin uygulaması yapılan ve 90.gün sakrifiye edilen Grup 4’de; sistemik ve lokal uygulamanın birlikte yapılmasının sonucu olarak; damarlarda dilatasyon, bağ doku hücrelerinde füzyon izlenmezken, doku genelinde kahverengi yağ dokusu (Brite Adiposit) yapısının 90. gün sakrifiye edilen diğer gruplarla karşılaştırıldığında belirgin derecede azaldığı ve sadece birkaç alanda görüldüğü dikkati çekti. Diğer dejeneratif bulgular minimal düzeyde saptandı (şekil-25).



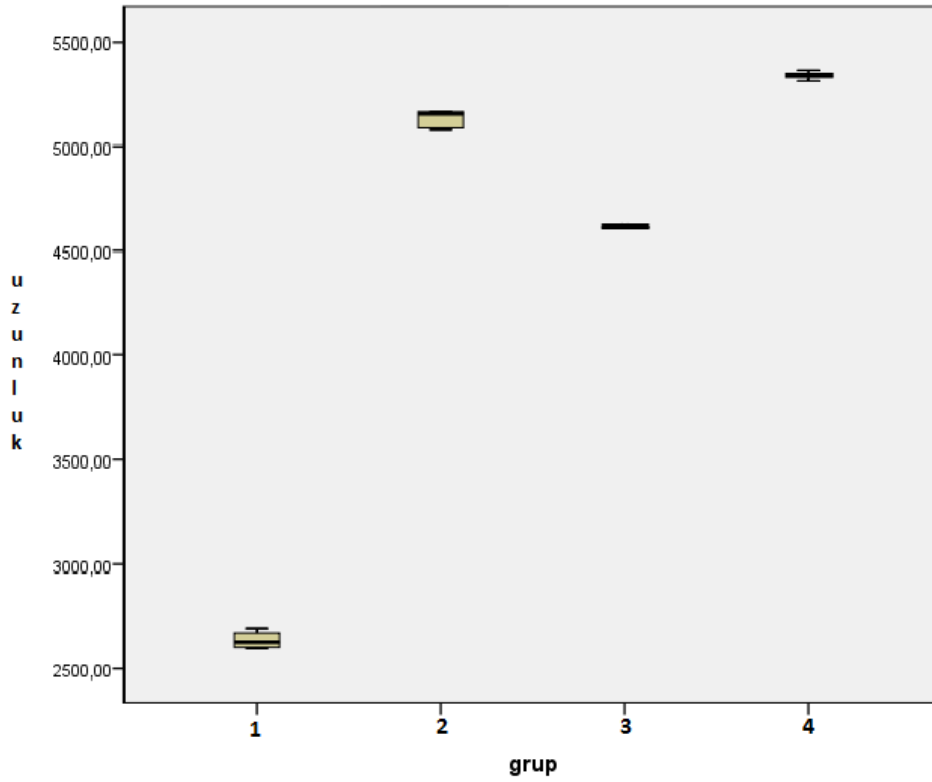
Şekil-25: Grup 4’de beyaz yağ hücreleri düzgün kontürleri ve homojen lipid içerikleri (B) ile belirgindi (25C,25D) (25A: Hematoksilen-Eozin x100; 25B,25C,25D: Hematoksilen-Eozin x400)

Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan değerlendirmeler sonucunda oluşturulan dejenerasyon tablosu sonucu “ 0 = Hiç Yok, 1 = Zayıf, 2 = Orta Dereceli, 3 = En Güçlü” sayısal veriler olarak kabul edildi (Tablo 3).

DEJENERASYON KRİTERLERİ	Kontrol 9. Gün	Kontrol 90. Gün	Lokal 9. Gün	Lokal 90. Gün	Sistemik 9. Gün	Sistemik 90. Gün	Sistemik Lokal 9. Gün	Sistemik Lokal 90. Gün
	Grup-5	Grup-1	Grup-7	Grup-3	Grup-6	Grup-2	Grup-8	Grup-4
Lenfosit İnfiltrasyonu	3	1	2	2	2	2	1	1
Beyaz Yağ Dokusu Hücresinde Şekil Bozuklukları	1	3	2	3	1	1	1	1
Kahverengi Yağ Dokusu Hücrelerinin Yoğunluğu	0	3	0	2	0	1	1	1
Çevre Bağ Dokuda Artış	2	1	2	2	1	1	1	1
Adipositler Arası Bağ Dokuda Artış	3	1	1	2	1	1	1	1
Damarlarda Dilatasyon	2	0	0	1	0	0	0	0
Beyaz Yağ Dokusu Hücrelerinde Füzyon	2	1	1	2	2	1	0	0
Lipit İçeriğinde Bozulma ve Miyelin Figür Oluşumu	1	2	2	3	2	2	1	1

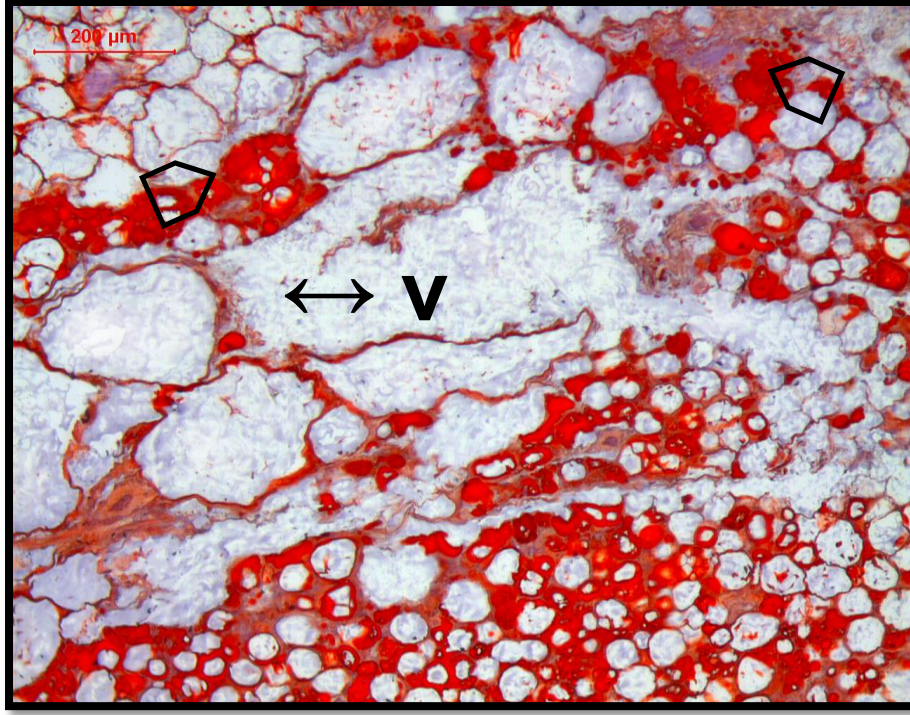
Tablo-3: Hematoksilen-Eozin boyaması sonucu yapılan değerlendirmelere göre, tüm gruplara ait Dejenerasyon Kriterleri (0 = Hiç Yok, 1 = Zayıf, 2 = Orta Dereceli, 3 = En Güçlü)

Ayrıca Hematoksilen-Eozin boyaması sonrasında 1.25x'lik objektif kullanılarak tüm alanda, her grup ve her hayvan için 6 ayrı bölgede kesitsel uzunluk ölçümü yapıldı. Grup 1'de toplam uzunluk ölçümü $2635,38 \pm 40,07 \mu\text{m}$, Grup 2'de toplam uzunluk ölçümü $5158,66 \pm 84,00 \mu\text{m}$, Grup 3'de $4616,68 \pm 25,87 \mu\text{m}$, Grup 4'de ise toplam uzunluk ölçümü $5340,03 \pm 17,93 \mu\text{m}$ olarak saptandı. Saptanan sayısal değerler istatistiksel olarak yorumlandı. Grup 1 diğer tüm gruplardan anlamlı ölçüde küçük olarak hesaplandı ($p<0,05$). Grup 4 ise diğer tüm gruplardan anlamlı ölçüde büyük olarak hesaplandı. ($p<0,05$). Grup 2 ise grup 3'den istatistiksel olarak anlamlı ölçüde büyük olarak hesaplandı ($p<0,05$) (grafik-2).

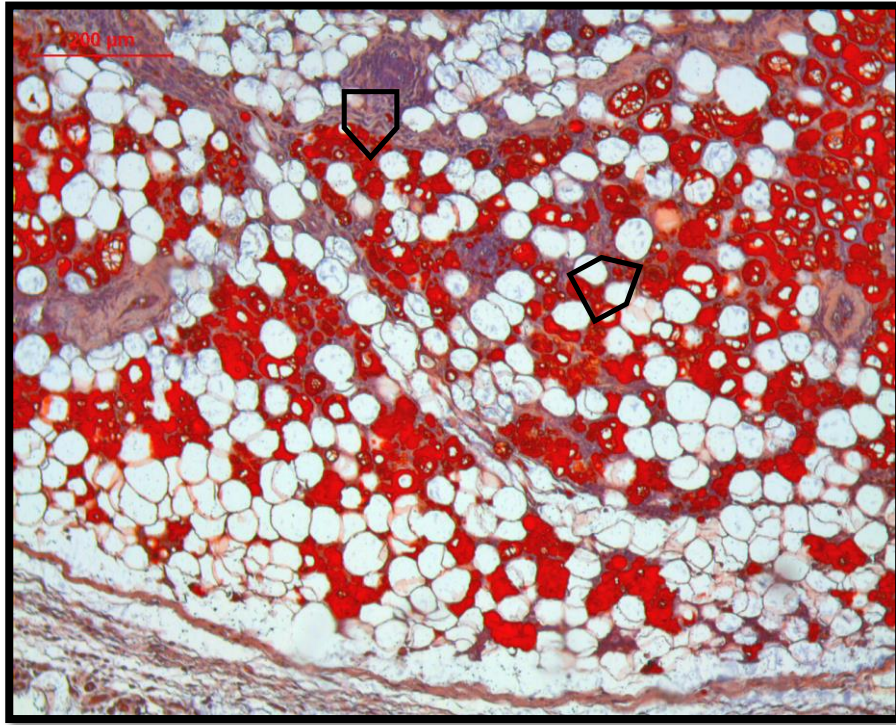


Grafik-2: Üç ay takip sonunda gruplar arası 1,25x’lik objektif ile yapılmış büyütmede yağ grefti toplam uzunluk değerleri ($p<0,05$)

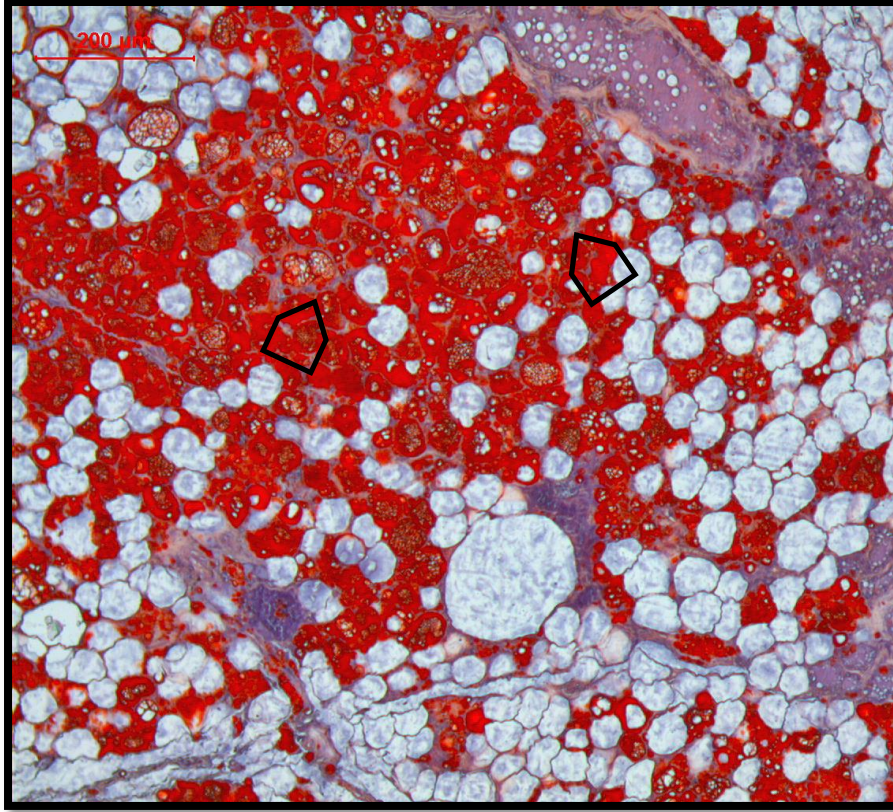
Oil Red O boyaması, 90. günde sakrifiye edilen grupların sağlıklı yağ dokusu hücrelerinin ve bu hücrelerin lipid içeriklerinin gösterilmesi amacı ile yapıldı. Kırmızı ile boyanan alanlar, bu hücrelerin sağlıklı yağ dokusunu ve lipid içeriklerini göstermektedir. Kontrol grubunda füzyon sonucu büyük vakuoler yapılara dönüşmüş adipositler izlenirken, yağ içeriği korunmuş adipositler de göreceli olarak az olmakla birlikte dikkati çekti (şekil-26). Kontrol grubuna oranla, kırmızı ile boyanan yani lipid içerikleri korunmuş alanların belirgin bir biçimde ve yine göreceli olarak sırası ile lokal (şekil-27), sistemik (şekil-28), sistemik ve lokal uygulamanın birlikte yapıldığı gruplarda (şkil-29) arttığı izlendi. Bu durumda, yağ dokusu hücre ve içeriklerinin en iyi sistemik ve lokal uygulamanın birlikte yapıldığı grupta olduğu saptandı.



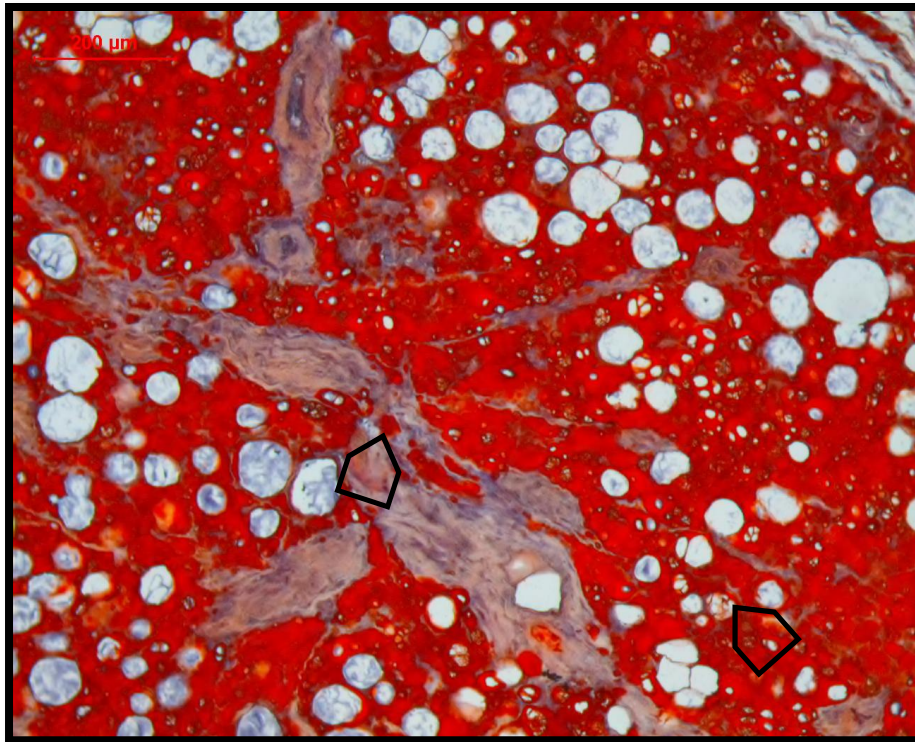
Şekil-26: Grup 1’de füzyon sonucu büyük vakuoler yapılara dönüşmüş adipositler (↔v) ve yağ içeriği korunmuş adipositler (Δ) izleniyor (26: Oil Red O x100)



Şekil-27: Grup 3’de yağ içeriği korunmuş adipositler (Δ) izleniyor (27: Oil Red O x100)

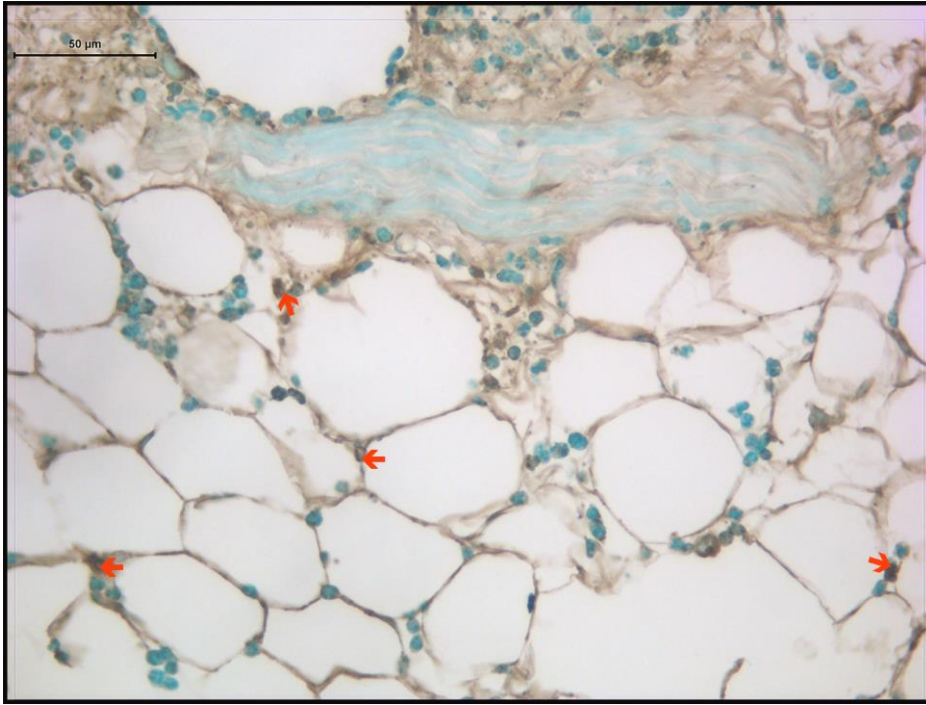


Şekil-28: Grup 2’de yağ içeriği korunmuş adipositler (△) izleniyor (28: Oil Red O x100)

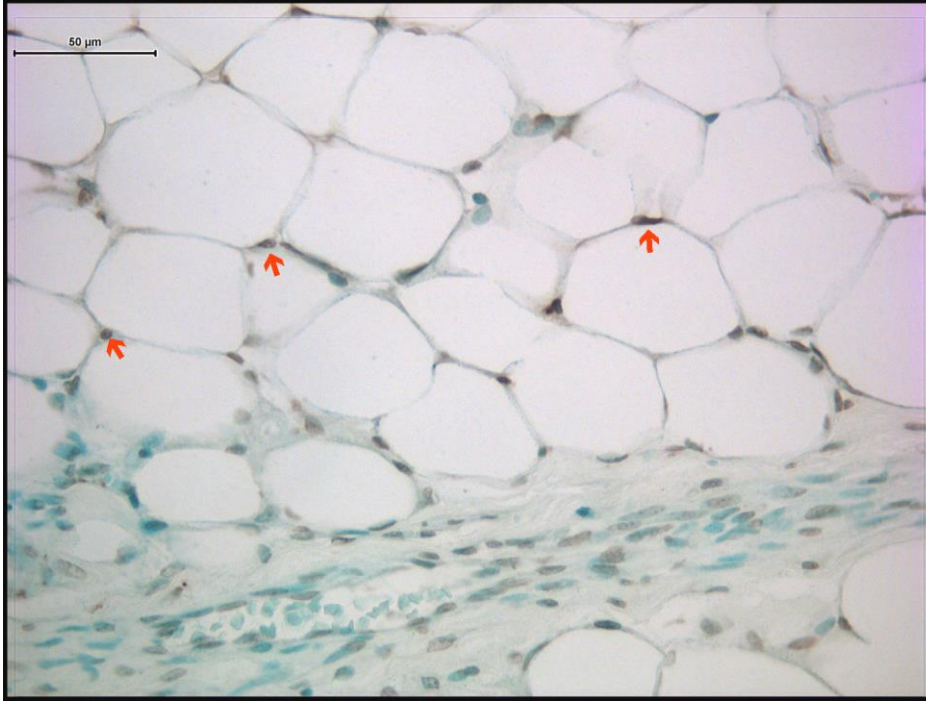


Şekil-29: Grup 4’de yağ içeriği korunmuş adipositler (△) izleniyor (29: Oil Red O x100)

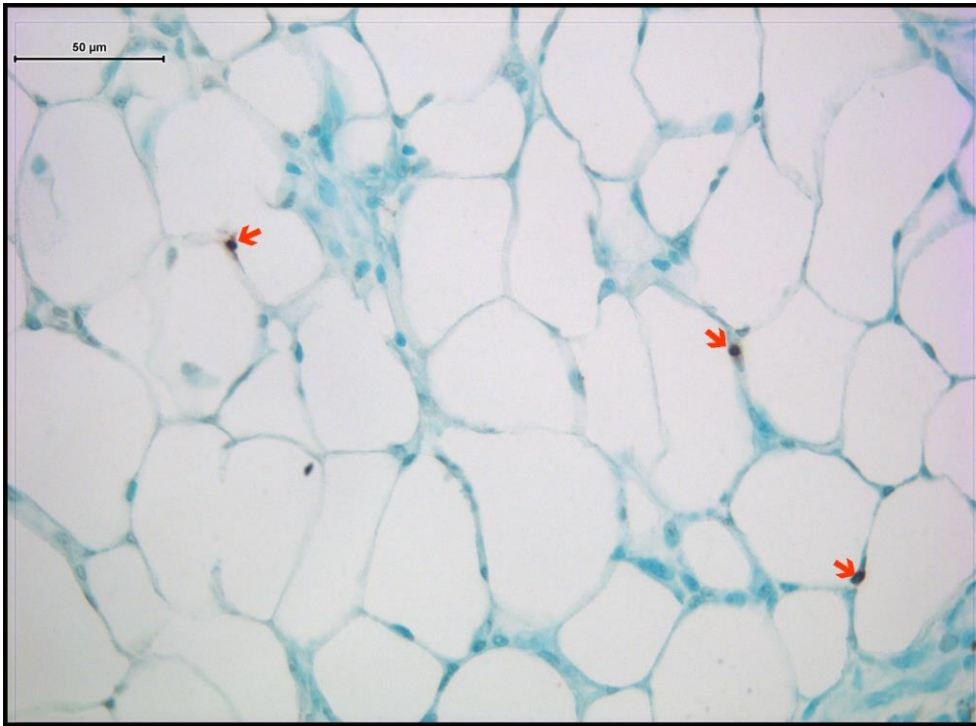
9. günde sakrifiye edilen gruplara uygulanan TUNEL yönteminde; dokuda apoptozise giden hücreler saptandı ve hücreler bir merkez, beş perifer bölgede olmak üzere tüm grup ve tüm hayvanlarda sayıldı. Bu veriler doğrultusunda tüm preparatlar içerisinde en az reaktif hücre sistemik ve lokal uygulamanın birlikte yapıldığı gruplarda görüldü (şekil-33). Bunu sırası ile; sistemik (şekil-32) ve sonrasında lokal uygulama grubunun (şekil-31) takip ettiği tespit edildi. En çok reaktif hücre de kontrol grubunda (şekil-30) izlendi. Sonuç olarak; Oil Red O boyaması ile paralel bir şekilde, sistemik ve lokal uygulamanın birlikte yapıldığı grubun apoptozis açısından da en fazla korunan grup olduğu anlaşıldı.



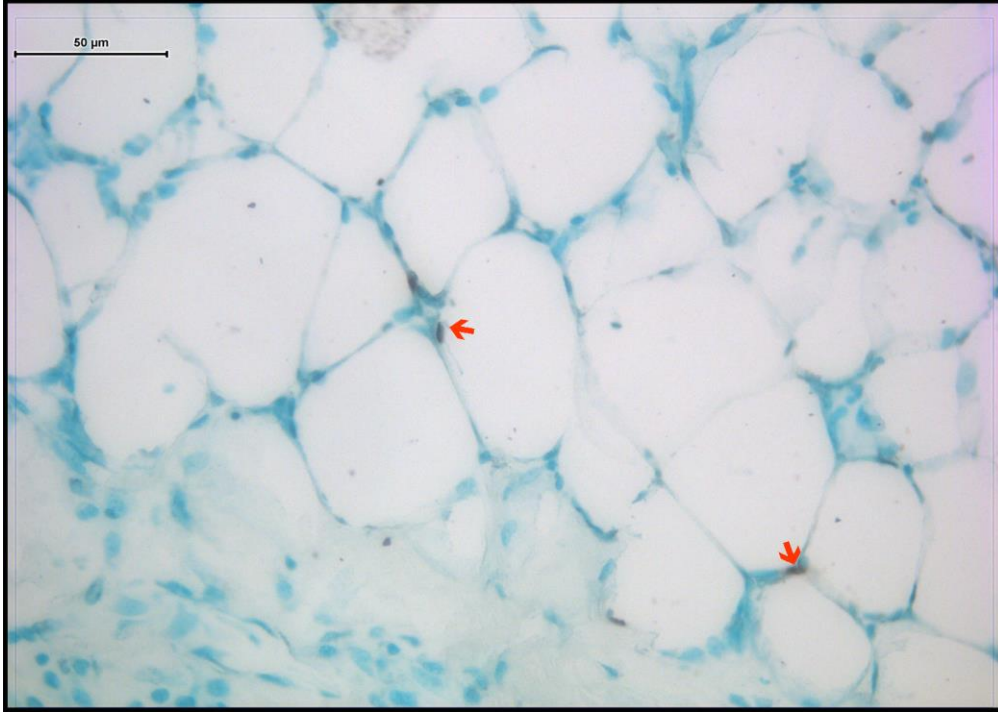
Şekil-30: Grup 5’de apoptotik hücre çekirdekleri (➔) görülüyor (30: TUNEL x400)



Şekil-31: Grup 7’de apoptotik hücre çekirdekleri (→) görülüyor (31: TUNEL x400)

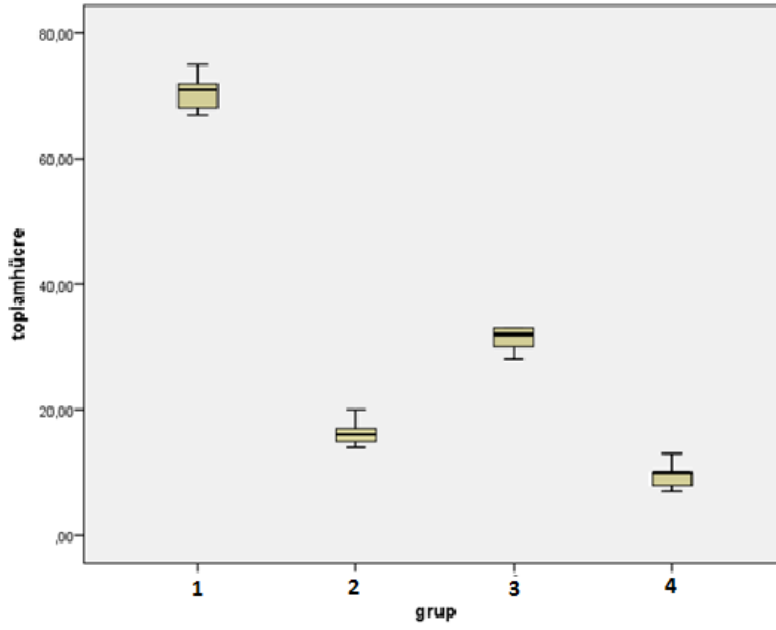


Şekil-32: Grup 6’da apoptotik hücre çekirdekleri (→) görülüyor (32: TUNEL x400)



Şekil-33: Grup 8’de apoptotik hücre çekirdekleri (→) görülüyor (33: TUNEL x400)

Dokuda apoptozise giden hücreler saptandı. Bunlar toplam 6 alanda olmak koşulu ile veriler toplandı. Grup 5’ de apoptoza giden 6 alandaki toplam hücre sayıları $70,66 \pm 2,94$, Grup 6’ daki toplam sayı $16,33 \pm 2,16$, Grup 7’ deki toplam sayı $31,33 \pm 2,06$, Grup 8’ deki toplam sayı ise $9,66 \pm 2,06$ olarak saptandı. Grup 5 diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığı zaman anlamlı olarak apoptoza giden hücre sayısı fazla olarak hesaplandı ($p < 0,05$). Grup 8 ise diğer gruplarla karşılaştırıldığı zaman apoptoza giden hücre sayısı anlamlı ölçüde az olarak hesaplandı ($p < 0,05$). Grup 7’deki apoptoza giden hücre sayısı, grup 6’ye göre anlamlı olarak fazla olarak hesaplandı ($p < 0,05$).



Grafik-3: Gruplar arası Tünel yöntemi ile toplam 6 alanda apoptoza giden hücre sayıları

Sonuç olarak; 90. gün sakrifiye edilen grupların, 9. gün sakrifiye edilen gruplara oranla çok daha kötü histolojik bulgular sergilediği tespit edildi. Dokunun; anjiogenezis olaylanana kadar beslenemediği için, önce dejenere olduğu ve beslenememesine bağlı stres sonucunda dokuda kahverengi yağ hücrelerinde (Brite Adiposit) artış meydana geldiği tespit edildi. Gerçek anlamda yağ doku hücrelerinin viabilitesinin gözlemlenebilmesi için, 180. gün sakrifiye edilecek deney grubunun da oluşturulması öngörüldü. Bunun temel nedeninin, dokunun 90. günde iken henüz adaptasyon çalışmasına devam ettiği ve kendini toparlayamadığı olduğu düşünüldü.

Kahverengi yağ dokusu (Brite Adiposit) oluşumunun tüm gruplarda 90. günde, dokunun etken kaldığı stres nedeni ile meydana geldiği ancak bu dokunun en az sistemik minosiklin uygulaması yapılan ve 90. gün sakrifiye edilen grupta ve ayrıca sistemik ve lokal

minosiklin uygulamasının birlikte yapılarak yine 90. gün sakrifiye edilen grupta izlenmesi nedeni ile, bu uygulamalarda dokunun en iyi korunduğu kanısına varıldı.

Sistemik ve lokal minosiklin uygulamasının birlikte yapıldığı gruplarda en belirgin özellik, özellikle diğer gruplardan farklı olarak, 9. günde sakrifiye edilen gruplarda çok az olmakla birlikte, kahverengi yağ dokusunun (Brite Adiposit) izlenmesi olarak karşımıza çıktı. Bu durum, sistemik ve lokal minosiklin uygulamasının birlikte yapıldığı gruplarda yağ dokunun rejenerasyon açısından daha hızlı bir süreç yaşadığını düşündürdü.

Beyaz yağ dokusu hücrelerinin morfolojik özelliklerinin en iyi sistemik minosiklin uygulamasında korunduğu gözlemlendi.

Minosiklin uygulamasının antiinflamatuvar etkisi; lenfosit infiltrasyonuna bakılarak, bu bulgunun lokal veya sistemik minosiklin uygulaması yapılarak 9. gün sakrifiye edilen gruplarda aynı olmakla birlikte; uygulamanın kesilmesi ile 90. günde lenfosit infiltrasyonun devam ettiği tespit edildi. Bu nedenle, inflamasyonun önlenmesinde minosiklin uygulamasının göreceli olarak devam ettirilmesinin daha uygun olacağı görüşündeyiz.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yağ grefti uygulamaları plastik cerrahide ve daha birçok branşda son yıllarda oldukça popüler bir uygulama haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarla yağ grefti uygulaması ideal bir dolgu maddesi olarak literatüre ve klinik kullanıma girmiştir. En önemli nokta ise kalıcılığının belirlenememesi ve uzun dönem sonuçlarının öngörülememesidir⁴⁴.

Yağ grefti kalıcılığı bu kadar önemli noktaya geldiği için kalıcılığı artırma yöntemleri ve çalışmaları da son dönemde büyük hız kazanmıştır. Yağlar elde edilirken farklı vücut bölgelerinden alınması, alınırken künt uçlu ya da sivri kanüllerle elde edilmesi, kanüllerin çapları, elde edildikten sonra havasız ortamla aktarılması, makasla kıyılması, yıkanması, enzimlerle muamele edilmesi, santrifüj edilmesi, kök hücre ya da birçok büyüme faktörleri ile karıştırılması, alıcı saha vasküler yoğunluğu arttırıcı maddeler kullanılması gibi birçok yöntem hakkında çalışmalar bulunmaktadır. Bu yöntemlerden de hangisinin en çok kalıcılığı arttırdığına dair kesin bilgi yoktur^{8,62,63,64,65,66,67}.

Yağ grefti uygulamasında serbest olarak yağ hücreleri kanlanmasının kesilip başka bir vücut bölgesine aktarılmaktadır. Erken dönemde plazmatik imbibisyonla beslenirken daha sonraki günlerde neovaskülarizasyonla beslenmektedirler. En önemli kabul görmüş yağ grefti sağkalım teorisi *Peer*'in "hücre sağkalım" teoremidir⁵. Böylece aktarılan bölgede canlı kalan yağ hücre sayısı ileriki dönemde kalıcılığı belirleyen ana etken olarak görülmektedir. Hücreler elde edilirken travmaya, aktarıldıktan sonra da iskemiye ve alıcı alanda inflamasyona maruz kalmaktadırlar. Bu faktörler adipositlerin hücre membranlarının kırılmalarına yol açmaktadır ve böylece nekroz ve apoptoz ile hücre ölümlerine yol açmaktadır. Membran bütünlüğünün kaybı apoptotik yolaktaki kaskatları aktive eder, programlanmış hücre ölümü gerçekleşir. Ölümler sonucu lipid artıkları meydana gelir ve organizma tarafından bunlar rezorbe edilir. Böylece canlı yağ hücre sayısı azalmakta ve greft volüm kayıpları meydana gelmektedir¹⁴⁶.

Miguel A. Medina ve ark. tarafından yapılan çalışmada yağ grefti sağkalımını arttırmak üzere polimer terapisi denenmiştir. Bu maddeler hücre membranlarını stabilize etmektedir. Böylece hasarlara karşı yağ hücrelerini korumakta ve apoptozu engellemektedir. Çalışmada insandan elde edilen yağlar immün olarak aktivite göstermeyen fare modelinde greft olarak uygulanmış ve polimerler (P188) çalışılmıştır. Sonuç olarak apoptozu engelleyerek hücre canlılığı korunmuş ve kalıcılığı arttırmıştır¹⁴⁶.

Tetrasiklinler çok sık kullanılan, güvenli ve üzerinde birçok çalışma yapılmış bir antibiyotiktir. Minosiklin ise 2. kuşak semi-sentetik bir tetrasiklidir. Kimyasal özelliğinden dolayı çok daha lipofiliktir ve doku penetrasyonu daha fazladır. Antibiyotik olma özelliğinin yanında antiapoptotik, antiinflamatuvar, immünmodülatör, nöroprotektif özellikleri de bulunmaktadır. Bütün bu özelliklerinden dolayı dejeneratif ve travmatik santral sinir sistemi hastalıklarında, myokard iskemisinde, kolon kanserlerinde, bazı viral enfeksiyonlarda kullanılmasıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır^{14,137,144}. *Ewald A.W.J. Dumont* ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da parsiyel flep kaybı meydana getirilmiş fare modelinde minosiklin uygulaması yapılmış, minosiklinin antiapoptotik etkisiyle iskemi reperfüzyon hasarlarını azalttığı ve flep kaybında azalmaya yol açtığı ayrıca apoptotik hücre ölümüne de engel olduğu gösterilmiştir¹⁴⁷.

Yağ grefti uygulaması sonrası travmatik stres ve iskemik stres sonucu yağ hücrelerinin apoptozla gittiği belirtildi. Tetrasiklin grubu ilaçlardan minosiklinin yapılmış birçok çalışmada antiapoptotik etkisi ve membran stabilizasyon etkisi kanıtlanmıştır. Bu iki bilgiden yola çıkarak minosiklinin antiapoptotik etkisinden yararlanarak stres sonucu apoptozla adiposit kaybına uğrayarak volüm kaybeden yağ dokusunun kalıcılığını arttırmayı planladık.

Çalışmamızda yağ grefti sağkalımı için minosiklin uygulaması yapmak üzere hayvan modeli kullandık. Yağ greft uygulamasını yapmak üzere sıçan inguinal yağlarını elde edip,

ense bölgesine tek parça olarak greft şeklinde aktardık. İlaç uygulamasını ise 3 şekilde modelledik. Minosiklinin i.v. formunu sistemik, lokal ve ikisinin bir arada olduğu şekilde uyguladık. Sistemik minosiklin uygulamasının ilk dozunu yağ grefti uygulaması yapmadan 2 saat önce uyguladık, böylece oldukça lipofilik olan minosiklinin tüm dokulara ve özellikle aktarılabilecek olan yağ dokusuna ulaşmasını hedefledik. Daha sonra greft uygulamasının ardından 4 gün boyunca günde bir kez olacak şekilde aynı dozda sistemik minosiklin uyguladık. Literatürde yapılmış çalışmada hücre ölümleri en çok ilk 4 gün olduğunu belirttikleri için bu modeli kullandık¹⁴⁷. Lokal uygulamasını ise doz hesaplaması yaparak elde edilen yağ dokusu ağırlığına göre direkt yağ içine enjeksiyon yöntemi ile yapıldı. Kontrol grubuna ise hem yağ içine hem de sistemik olarak aynı enjeksiyon sayılarında serum fizyolojik (SF) uygulaması yapıldı. Böylece 4 grup oluşturulmuş oldu. Sağkalımı değerlendirmek için daha önce yapılmış çalışmalar değerlendirildi. Graft sağkalımı için yapılmış çalışmalarda standart bir değerlendirme günü belirlenmemiştir. Yağ grefti sağkalımı için en az 6 hafta olmak koşulu ile 12, 15, 16 hafta gibi sürelerde değerlendirmeler yapılmıştır^{13,62,75,80}. Biz de çalışmamızda sağkalımı değerlendirmek üzere 12 hafta yani 3 aylık bir süre belirledik. Apoptoza etkisini değerlendirmek için yeterli gün sayısını 9 olarak belirledik. Daha önce yapılmış çalışmalarda herhangi bir tetiklenme sonrası oluşan apoptozun ilk 10 günde en sık olduğunu ve pik düzeylerinin ise 6-9 gün arası olduğu belirtilmiştir⁸⁶.

Belirtilen sürelerin sonunda yağlar elde edildikten sonra hacim ölçümlerinin ardından makroskopik olarak incelendi. Makroskopik olarak boyutlarının ve kanlanma miktarlarının en az kontrol grubunda olduğu, en fazla ise sistemik ve lokal minosiklin uygulamasının beraber olduğu grupta görüldü. Üç aylık sağkalım sürecinden sonra elde edilen yağların işlem öncesi hacimleri ile farkları alındı ve bu farkların en fazla kontrol grubunda olduğu saptandı. Sistemik uygulama ile lokal ilaç uygulanan gruplarda hacim farkları istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı. Bütün gruplarla karşılaştırıldığında en anlamlı sonuç, sistemik ve lokal ilaç

uygulamasının beraber uygulanan grupta olduğu saptandı. Böylece erime miktarı en fazla hiçbir ilaç uygulaması yapılmayan grupta iken, en az erime ikili ilaç uygulanan grupta bulundu. Sistemik ilaç uygulaması ile lokal ilaç uygulaması, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde hacim farkı azalmasına yol açarken birbirleri ile arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Bunun üzerine denebilir ki lokal uygulanan minosiklin yağ grefti sağkalımına etkisi olmaktadır, aynı şekilde sistemik uygulanan minosiklinin de yağ grefti sağkalımına etkisi olmaktadır ama birbirleri ile arasında anlamlı bir fark yoktur. Ancak iki uygulamanın beraber yapılması ile etkileri potansiyelize olmakta ve en iyi sonuçlar anlamlı şekilde bu grupta bulunmaktadır.

Yapılan hematoksil-eozin boyaması sonucu 9 günlük kontrol gruplarında adipositlerde deformasyon, lenfosit infiltrasyon artışı, dilate damarlar, adiposit füzyoları ve şekil bozuklukları saptandı. Bunlar erken hipoksik etkiler sonucu oluşmaktadır. Kontrol grubunun 3 aylık boyamalarında ise adiposit arası bağ doku azalmasına, lenfosit infiltrasyon azalmasına, normal yapılarında az miktarda beyaz yağ dokusunun bulunmasına ama bunun yanında doku genelinde yaygın kahverengi (brite) yağ dokularına rastlandı. Yağ hücrelerinin şekil bozukluğu büyük ölçüde azalsa da halen devam ettiği ve lipid içeriğinin bozulduğu saptanmıştır. Lokal ilaç uygulaması yapılan 9 günlük grupta lenfosit infiltrasyonu ve damar genişlemesi daha az olarak görülmektedir. Yine lokal uygulama yapılan 3 aylık grupta ise en dikkati çeken özellik yağ dokuları içine uzanan septalar ve bunların yoğun kapiller yapıları içermesidir. Sistemik ilaç uygulaması yapılan ve 9 günlük grupta damar genişlemelerine rastlanmadı. Kontrol grubuna göre daha az olmakla beraber yer yer yağ hücrelerinde şekil bozukluklarına rastlandı. Yine sistemik ilaç uygulaması yapılan 3 aylık grupta ise lokal gruplarında olduğu gibi septalar ve içerilerinde yoğun kapiller yapılar dikkati çekti. Beyaz yağ dokusunun yanında yine kahverengi (brite) yağ dokusu dikkati çeken bir diğer unsur olarak görüldü. Lokal ve sistemik ilaç uygulanan 9 günlük grupta daha az lenfosit infiltrasyonu,

erken dönemde bile diğer hiçbir grupta görülmeyen kahverengi (brite) yağ dokusu, bunların yanında kontürleri düzgün ve homojen lipid içerikli yağ dokusu ve minimal yağ hücre şekil bozuklukları saptandı. Aynı sistemik ve lokal ilaç uygulaması yapıp 3 ay sonra değerlendirilen gupta ise bağ dokusu füzyonu ve damar genişlemesine rastlanmadı. Diğer gruplara göre kahverengi (brite) yağ dokusunun belirgin derecede azaldığı görüldü ve minimal dejeneratif bulgulara rastlandı. Bu bulgular ışığında minosiklinin antiinflamatuvar etkisinden dolayı 9 günlük gruplarda lenfosit infiltrasyonunun ve damar genişlemesinin azaldığı söylenebilir. Ancak 3 aylık süreçte tekrar lenfosit infiltrasyonun bu gruplarda dahi olması ilacın daha uzun kronik sürelerde kullanılması ile azaltılabileceğini düşündürdü. Morfolojik olarak en iyi yağ hücreleri sistemik minosiklin uygulamalarında saptandı. Kahverengi yağ dokusu insanlarda fetal yaşamda bulunan ve zengin mitokondri içeriği ile daha çok termoregülasyonda rol oynayan yağ dokusudur. Lipid depolama özelliği beyaz yağ hücrelerininidir. Yapılmış olan çalışmalarda beyaz yağ hücreleri soğuk gibi maruz kaldığı bir takım stres faktörüne bağlı olarak kahverengi yağ dokusuna dönüşüm gösterirler ve isimleri brite adipoz doku olarak adlandırılır¹⁴⁵. *Himms-Hagen et ark.* tarafından yapılmış bir çalışmada ise hayvan modelinde adrenerjik etkisi olan bir ilaç uygulaması ile beyaz yağ dokusu hücrelerinin enerji metabolizmasında ve termoregülasyonda etkili olan kahverengi (brite) yağ dokusu hücrelerine dönüştüğünü göstermiştir¹⁴⁹. Bu hayvan modelinde de yağlarda uğradığı iskemik strese bağlı olarak ya da stres sonucu adrenerjik etki ile dönüşüm saptanmaktadır. Literatürdeki birçok çalışmada brite adipositlerin prekürsörlerinin adipoz-derive kök hücreler olduğu gösterilmiştir¹⁴⁸. Bizim sonuçlarımıza bakıldığında minosiklin uygulamasının hem sistemik hem de lokal uygulanan grupta erken, 9. günde bile brite adipositlerin görülmesi erken rejenerasyonu ve erken adaptasyonu göstermekte ve bu dönüşümü hızlandırdığı düşünülmektedir. Ama uzun dönem sonuçlarda ise brite adipositler en az bu grupta görülmektedir. Böylece süreci erken başlatıp en az düzeyde kalmasını

sağlamaktadır. Asıl görevi yağ depolama olan ve volüm sağlamada rol oynayan beyaz yağ dokusu hücreleri en çok bu grupta saptanabilmektedir. Preadipositlerin miktarlarının saptanması brite adipositlerin kaynağını göstermekte rol oynayabilir. İleriki çalışmalarda bize yol gösterici olacaktır.

Aynı boyamalarda yapılan her grup ve hayvan için 6 ayrı bölgeden tüm alan ölçüm sonuçlarına göre anlamlı olarak en büyük alan, yani en büyük yağ dokusu, sistemik ve lokal ilaç uygulanan grubu, daha sonra sırası ile sistemik ilaç grubu, lokal ilaç grubu ve son olarak da kontrol grubu olarak bulundu. Bu bulgular yağ dokusunun sağ kalımı verileri ile paralel olarak saptandı.

Yapılan oil-red boyama sonucunda, kontrol grubunda büyük vakuoller, daha az yağ içeriği korunmuş adiposite rastlandı. Sırası ile en çok yağ içeriğini koruyan, sistemik ve lokal ilaç uygulanan grup, sonra sistemik ilaç grubu daha sonra lokal ilaç grubu olarak belirlendi. Bu veriler, yağ içeriği fazla olan hücrelerin grup 4'de fazla olması ile hacim miktarının aynı grupta fazla olması arasındaki bağlantıyı desteklemektedir.

Apoptoz değerlendirmek için yapılan TUNEL yöntemi sonucunda apoptoza giden hücre sayısı toplam 6 alandan gerçekleştirildi. En fazla reaktif hücre kontrol grubunda saptandı. Daha sonra sırası ile lokal ilaç grubu, sistemik ilaç grubu, sistemik ve lokal ilaç grubu olarak belirlendi. Bu sonuçlar oil-red boyaması ile ve hacim değerlendirmeleri ile paralellik gösterdi. Sonuç olarak ayrı ayrı uygulamalarda minosiklinin antiapoptotik etkisi ile apoptozu engellemektedir. Sistemik ve lokal olarak beraber uygulamada da etkileri potansiyelize olup en iyi sonuçlar bu grupta alınmaktadır. Erken dönemde apoptozun engellenmesi ile de uzun dönemde sağ kalıma katkısı ile hacim miktarları fazla olarak bulunmaktadır.

Minosiklinin çok yaygın olarak kullanılan antibiyotik olması ile klinik uygulamalara girmesi kolay olacaktır. Yağ grefti işlem öncesi ilaç başlanarak, daha sonra alınan yağ

dokusunu lokal ilaçla karıştırıp greft uygulamasının ardından, ilaç 9-19 günlük apoptoz evresinde kullanılmaya devam ettirilip sağ kalıma katkısı gözlemlenebilir. İleriki önemde yapılacak olan klinik çalışmalar bize yol gösterecektir. Ancak uygulanacak olan doz ile ilgili kesin verilerimiz yoktur. Rutin kullanılan antibiyoterapi dozları etkili olabileceği düşünülmektedir. Hem antibiyotik etkisi ile enfeksiyon oranlarını düşürmesi hem de sağkalıma katkısı ile yağ grefti uygulamalarında yeni bir çağ başlatacaktır.

Çalışmanın kısıtlayıcı basamaklarından bir tanesi yağların travmaya maruz kalmadan alınıp aktarılmasıdır. İnsanlarda rutin uygulanan yağ grefti uygulamasında kanül yardımı ile yağlar alınır ve yine kanüllerle donör alana aktarılır. Bu aşamada yağlar travmaya maruz kalırlar. Buna benzer model immün olarak aktif olmayan nude micelerde yapılabilirdi. Böylece greft için insan yağı kullanılmış olurdu, greft alma ve aktarma aşamalarına benzer bir model oluşturulabilirdi.

Sonuç olarak yağ grefti uygulaması öncesi, işlem sırasında ve sonrasında minosiklin ya da tetrasiklin grubu antibiyotiklerle kombine edilmesi ile yağ grefti sağkalımına olumlu etkisi olacak, kliniğe uygulaması kolay, ucuz ve etkin bir alternatif olacaktır.

ÖZET

Yağ grefti uygulamaları son dönemde plastik cerrahide oldukça yaygınlaşmıştır. Bunun nedeni yağın iyi bir yumusak doku dolgusu olması, ucuz ve kolay elde edilebilir olması ve otolog olmasından dolayı herhangi yan etkisinin olmamasıdır. Yalnız yağ grefti sağkalım oranları net olarak bilinmemektedir. Literatürde yağ grefti sağkalımını arttırmaya yönelik birçok çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı antiapoptotik, antiinflatuar ve antibakteriyel ajan olan minosiklin uygulaması ile erken dönemde yağ hücrelerinin kaybına yol açan iskemi sonucu yağ hücre apoptozunu engellemek ve yağ sağ kalımını arttırmaktır.

Çalışmada 48 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar her bir grupta 6 adet olacak şekilde toplam 8 gruba ayrıldı. Grup 1 ve 5 kontrol grubu olup, hiçbir ilaç verilmeden sıçanların inguinal bölgelerinden yağ pakeleri eksize edilip, ense bölgesinde açılan ceplere nakledildi. Grup 2 ve 6 sistemik minosiklin uygulaması olup yağları aynı şekilde nakledildi. Grup 3 ve 7 lokal minosiklin uygulaması sonrası yağları nakledildi. Grup 4 ve 8 ise lokal ve sistemik minosiklin uygulaması sonrasında yağları nakledildi. Grup 1, 2, 3 ve 4, 90 gün sonra sakrifiye edildi ve yağ pakeleri ensesinden eksize edildi. Sağ kalımı değerlendirmek üzere histolojik yöntemlerle boyandı. Grup 5, 6, 7 ve 8 ise 9. gün sakrifiye edildi ve elde edilen yağlar erken apoptozu değerlendirmek için immünohistokimyasal yöntemlerle boyandı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Minosiklinin lokal ve sistemik olarak bir arada verildiği grupta hacim değişim değerlerinin en az, tüm alan boyut miktarlarının ve lipid içeriği sağlam olan yağ hücrelerinin en fazla olduğu görüldü ($p<0,05$). Bunu sırası ile sistemik ilaç uygulaması, lokal ilaç uygulaması ve kontrol grubu takip etti. Apoptoza giden hücre sayısı en fazla kontrol grubunda iken en az lokal ve sistemik ilacın beraber verilen grupta olduğu görüldü ($p<0,05$).

Sonuç olarak sistemik veya lokal minosiklin uygulaması ile erken dönemde apoptozu azaltmış olması ile ileri dönemde yaşayan ve lipid içeriği korunmuş yağ hücrelerinin elde edilmesini sağlandı. İki uygulamanın kombine edilmesi ile etkileri potansiyelize olup yağ grefti uygulaması sonrası kalıcılığa katkısı oldu.

SUMMARY

Recently use of fat grafting has been popularized in plastic Surgery. The main reasons for this are: use of fat grafting is a good soft tissue filler, cheap, easy and has no side effects. But the survival rate of fat grafts is unknown. There are lots of studies about methods to increase fat graft survival rate.

The purpose of this study is to increase fat graft survival rate and to inhibit early stage apoptosis that cause fat cell death after ischemia by using minocycline (antiapoptotic, antiinflammatory and antibacterial drug) .

Forty-eight Wistar Albino rats were used. We had 8 groups, and every group has 6 rats in each. Group 1 and 5 is control group, we did not use minocycline, we get inguinal fat pads and put them in interscapular area. Group 2 and 6 is systemic minocycline group. Group 3 and 7 is local minocycline group. Group 4 and 8 is local and systemic minocycline group. In every group we get their inguinal fat pads and after systemic, local or both minocycline application, their fat pads transplanted their back. Group 1, 2, 3 and 4 were sacrifice after 90 days later. We get their fat pads from back for analyse of fat graft survival by volume measure and histological procedures. Group 5, 6, 7 and 8 were sacrifice after 9 days later and we determined early stage apoptosis by histological procedures. Results analysed using statistical methods.

Grafts treated with local and systemic minocycline group, changes in volume values are very low, the amount of size in all areas and lipid contents in intact fat cells was very high ($p < 0.05$). It was followed by systemic drug administration, local drug administration and the control group. The maximum number of cells going into apoptosis were observed in control

group, the minimum numbers were observed in the systemic and local drug administration group ($p < 0.05$).

As a result of using systemic or local drug administration is prevent apoptosis in early stages and they increase the number of living fat cells with intact lipid contents. By combining using systemic and local minocycline are potentiated and they effects the retention of fat volume.

KAYNAKLAR

1. Toshiro Nishimura, MD; Harumi Hashimoto, MD; Isao Nakanishi, Microvascular Angiogenesis and Apoptosis in the Survival of Free Fat Grafts. *The Laryngoscope*. 2000; 110 (8): 1333-1338
2. Smith P, Adams Jr. WP, Lipschitz AH, et al Autologous human fat grafting: Effects of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(6): 1836-1844
3. Thanik VD, Chang CC, Lerman OZ et al. A murine model for studying diffusely injected human fat. *Plast Reconstr Surg* 2009;124 (7):74-81
4. Locke MB, de Chalain TM. Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Ann Plast Surg*. 2008 Jan; 60(1): 98-102
5. Peer LA, Cell survival theory versus replacement theory. *Plast Reconstr Surg*. 1955 Sep;16(3):161-8
6. Rieck B, Schlaak S. Measurement in Vivo of the Survival Rate in Autologous Adipocyte Transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111:2315-2323
7. Bartynski J, Marion MS, Wang TD. Histopathologic evaluation of adipose autografts in a rabbit ear model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990 Apr; 102(4): 314-21
8. Piasecki JH, Gutowski KA, Lahvis GP. An experimental model for improving fat graft viability and purity. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Apr 15;119(5):1571-83
9. Peer LA. The neglected free fat graft. *Plast Reconstr Surg* (1946). 1956 Oct;18(4):233-50
10. Peer LA. The neglected free fat graft, its behavior and clinical use. *Am J Surg*. 1956 Jul;92(1):40-7

- 11.** Sommer B, Sattler G. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg.* 2000 Dec;26(12):1159-66
- 12.** Guerrerosantos J, Gonzalez-Mendoza A, Masmela Y, et al. Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 1996 Sep-Oct;20(5):403-8
- 13.** Park B, Kong JS, Kang S, Kim YW. The effect of epidermal growth factor on autogenous fat graft. *Aesthetic Plast Surg.* 2011 Oct;35(5):738-44
- 14.** Yılmaz İ. Nöroprotektif tedavide yeni bir ilaç hedefi: ikinci jenerasyon tetrasiklinler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2007;14(1)/47-52
- 15.** Kunugi S, Shimizu A, Kuwahara N. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury. *Lab Invest.* 2011 Feb;91(2):170-80
- 16.** Minghua Chen, Victor O. Ona, Mingwei Li. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine* 6, 797 - 801 (2000)
- 17.** Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Jan-Feb;13(1):18-23
- 18.** Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jun;280(6):E827-47
- 19.** Young B, Heath JW. Wheater's functional histology a text and color atlas. 4th e. London: Churchill Livingstone; 2000. P. 73-4

- 20.** Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. 2000 Jun;49(6):883-8
- 21.** Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003 Aug;3(5):705-13
- 22.** Bulucu Altunkaynak BZ, Özbek E. Yağ dokusu endokrin bir organ mıdır?. *Dicle Tıp Dergisi*. 2005 ;32 (4):211-217
- 23.** Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4196-200
- 24.** Ling C, Kindblom J, Wennbo H. Increased resistin expression in the adipose tissue of male prolactin transgenic mice and in male mice with elevated androgen levels. *FEBS Lett*. 2001 Oct 26;507(2):147-50
- 25.** Haugen F, Jørgensen A, Drevon CA. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*. 2001 Oct 19;507(1):105-8
- 26.** Stumvoll M, Häring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2341-7
- 27.** Savage DB, Sewter CP, Klenk ES. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001 Oct;50(10):2199-202
- 28.** Juan CC, Au LC, Fang VS. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Dec 21;289(5):1328-33
- 29.** Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70

- 30.** Steppan CM, Bailey ST, Bhat S. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):307-12
- 31.** Ergün A. Yağ hücresinden salgılanan maddeler, resistin ve insülin direnci. *Ankara Üniversitesi tıp Fakültesi Mecmuası* 2003;56:25-30
- 32.** Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95
- 33.** Sadat S, Gehmert S, Song YH. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 23;363(3):674-9. Epub 2007 Sep 24
- 34.** Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C. Stem cells, mature adipocytes, and extracellular scaffold: what does each contribute to fat graft survival? *Aesthetic Plast Surg*. 2011 Dec;35(6):1061-72
- 35.** MC. Fare S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert Rev Med Devices*. September 2009, Vol. 6, No. 5, Pages 533-551
- 36.** Zhu M, Zhou Z, Chen Y. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg*. 2010 Feb;64(2):222-8
- 37.** Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Sep;118(3 Suppl):108S-120S
- 38.** Jackson IT, Simman R, Tholen R. A successful long-term method of fat grafting: recontouring of a large subcutaneous postradiation thigh defect with autologous fat transplantation. *Aesthetic Plast Surg*. 2001 May-Jun;25(3):165-9

- 39.** Rigotti G, Marchi A, Galiè M. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Apr 15;119(5):1409-22
- 40.** Cantarella G, Mazzola RF, Domenichini E. Vocal fold augmentation by autologous fat injection with lipostructure procedure. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Feb;132(2):239-43
- 41.** García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005 Jul;48(7):1416-23
- 42.** García-Olmo D, García-Arranz M, García LG. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis.* 2003 Sep;18(5):451-4
- 43.** Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004 Dec;32(6):370-3
- 44.** Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg.* 2001 Jan;28(1):111-9
- 45.** Neuber GA. Fettransplantation. *Verh Dtch Ges Chir.* 1893;22:66
- 46.** Lexer E. Free transplantation *Ann. Surg. Ann Surg.* 1914 Aug;60(2):166-94
- 47.** Bruning P. Contribution a l'étude des greffes adipeuses. *Bull Acad R Med Belgique* 1919;28:440
- 48.** Van Der Meulen. Considérations générales sur les greffes grasses et sérograsses épiploïques et leurs principales applications. Thèse Médecine; Paris: 1919

- 49.** Miller CC. Cannula Implants and Review of Implantation Techniques in Aesthetic Surgery Chicago: The Oak Press; 1926
- 50.** Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of a cell survival theory. *Plast. Reconstr. Surg.* 5:217, 1950
- 51.** Leaf N, Zarem HA. Corrections of contour defects of the face with dermal and dermal-fat grafts. *Arch Surg.* 1972 Nov;105(5):715-9
- 52.** Chajchir A. Liposuction fat grafts in face. Presented at the 11th Annual Symposium on Aesthetic Plastic Surgery, University of Guadalajara, November 7, 1983
- 53.** Illouz YG. The fat cell “grafts”: a new technique to fill depressions (letter to editor). *Plast Reconstr Surg.* 1986 Jul;78(1):122-3
- 54.** Chajchir A, Benzaquen I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg* 1989 Dec;84(6):921-34
- 55.** Coleman S. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 1995 Sep-Oct;19(5):421-5
- 56.** Fournier P. Popularization of the technique. In Hetter GP, ed. *Lipoplasty: The Theory and Practice of Blunt Suction Lipectomy*. 2nd ed. Boston: Little Brown; 1990: 35-38
- 57.** Fournier P, Otteni F. Lipodissection in body sculpturing: the dry technique. *Plast Reconstr Surg.* 1983; 72:598-609
- 58.** Fournier P. Why the syringe and not the suction machine? *J Dermatol Surg Oncol.* 1988; 14:1062-1070
- 59.** Klein J. The tumescent technique. Anesthesia and modified liposuction technique. *Dermatol Clin.* 1990 Jul;8(3):425-37
- 60.** Klein J. Tumescent technique for local anesthesia improves safety in large-volume liposuction. *Plast Reconstr Surg.* 1993 Nov;92(6):1085-98

- 61.** Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. Clin Plast Surg. 1997 Apr;24(2):347-67
- 62.** Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. Ann Plast Surg. 2010 Jul;65(1):101-6
- 63.** Pu LL, Coleman SR, Cui X. Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study. Plast Reconstr Surg. 2008 Sep;122(3):932-7
- 64.** Har-Shai Y, Lindenbaum ES, Gamliel-Lazarovich A. An integrated approach for increasing the survival of autologous fat grafts in the treatment of contour defects. Plast Reconstr Surg. 1999 Sep;104(4):945-54
- 65.** Pu LL, Cui X, Fink BF. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: a comprehensive study. Ann Plast Surg. 2005 Mar;54(3):288-92
- 66.** Chajchir A, Benzaquen I, Moretti E. Comparative experimental study of autologous adipose tissue processed by different techniques. Aesthetic Plast Surg. 1993 Spring;17(2):113-5
- 67.** Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. Plast Reconstr Surg. 2004 Jan;113(1):391-5
- 68.** Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. Plast Reconstr Surg. 1989 Feb;83(2):368-81
- 69.** Sommer B, Sattler G. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. Dermatol Surg. 2000 Dec;26(12):1159-66
- 70.** Guyuron B, Majzoub RK. Facial augmentation with core fat graft: a preliminary report. Plast Reconstr Surg. 2007 Jul;120(1):295-302

- 71.** Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1990 Mar;85(3):378-86
- 72.** Pinski KS, Roenigk HH Jr. Autologous fat transplantation. Long-term follow-up. *J Dermatol Surg Oncol.* 1992 Mar;18(3):179-84
- 73.** Tholpady SS, Aojanepong C, Llull R. The cellular plasticity of human adipocytes. *Ann Plast Surg.* 2005 Jun;54(6):651-6
- 74.** Oh DS, Cheon YW, Jeon YR. Activated platelet-rich plasma improves fat graft survival in nude mice: a pilot study. *Dermatol Surg.* 2011 May;37(5):619-25
- 75.** Shoshani O, Livne E, Armoni M. The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice. *Plast Reconstr Surg.* 2005 Mar;115(3):853-9
- 76.** Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R. 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 Apr;105(5):1712-20
- 77.** Prins JB, Walker NI, Winterford CM. Apoptosis of human adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jun 15;201(2):500-7
- 78.** Prins JB, Walker NI, Winterford CM. Human adipocyte apoptosis occurs in malignancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Nov 30;205(1):625-30
- 79.** Craft RO, Rophael J, Morrison WA. 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 Feb;62(2):235-43
- 80.** Hamed S, Egozi D, Kruchevsky D. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *PLoS One.* 2010 Nov 15;5(11):e13986
- 81.** Jin R, Zhang L, Zhang YG. Does platelet-rich plasma enhance the survival of grafted fat? An update review. *Int J Clin Exp Med.* 2013 Apr 12;6(4):252-8

- 82.** Hong SJ, Lee JH, Hong SM. Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and beta-fibroblast growth factor in autologous fat transplantation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010 Jul;63(7):1202-8
- 83.** Zhong X, Yan W, He X. Improved fat graft viability by delayed fat flap with ischaemic pretreatment. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009 Apr;62(4):526-31
- 84.** Baran CN, Celebioğlu S, Sensöz O. The behavior of fat grafts in recipient areas with enhanced vascularity. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Apr 15;109(5):1646-51; 1652
- 85.** Samdal F, Skolleborg KC, Berthelsen B. The effect of preoperative needle abrasion of the recipient site on survival of autologous free fat grafts in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1992;26(1):33-6
- 86.** M.A. Medina, J.H. Lee, J.C. Kirkham. Fat Grafting, Ischemia Repurfusion, Apoptosis, Antioxidants. *Journal of Surgical Research - J Surg Res* 01/2011; 165(2):323-32
- 87.** Hara MR, Snyder SH. Cell signaling and neuronal death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:117-41
- 88.** Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. Robbins Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002; 4-31
- 89.** Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57
- 90.** Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1317-22
- 91.** Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999 Nov;107(5):489-506

- 92.** Mountz JD, Zhou T, Su X. The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 Sep;80(3 Pt 2):S2-14
- 93.** Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000 Jul;301(1):5-17
- 94.** Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells.* 1998 Nov;3(11):697-707
- 95.** Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 1992 Apr 2;356(6368):397-400
- 96.** Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene.* 2001 Jan 11;20(2):167-77
- 97.** Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1456-62
- 98.** Beroud C, Soussi T. P53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 1998 Jan 1;26(1):200-4
- 99.** Kaelin WG Jr. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Apr 7;91(7):594-8
- 100.** Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1445-9
- 101.** Zhivotovsky B, Burgess DH, Orrenius S. Proteases in apoptosis. *Experientia.* 1996 Oct 31;52(10-11):968-78
- 102.** Tanaka Y, Yoshihara K, Itaya A. Mechanism of the inhibition of Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J Biol Chem.* 1984 May 25;259(10):6579-85
- 103.** Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):355-65

- 104.** Leach AP. Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death. Clin Lab Sci. 1998 Nov-Dec;11(6):346-9
- 105.** Shi YA. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. Nat Struct Biol. 2001; 8:394-401
- 106.** Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2002 Apr;2(4):277-88
- 107.** Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity. 2005 Mar;22(3):355-70
- 108.** Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell. 2001 Feb 23;104(4):487-501
- 109.** Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell. 1995 May 19;81(4):495-504
- 110.** Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science. 2002 May 31;296(5573):1635-6
- 111.** Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 1995 Nov 15;14(22):5579-88
- 112.** Du C, Fang M, Li Y. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000 Jul 7;102(1):33-42
- 113.** Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. Neoplasia. 1999 Apr;1(1):5-15
- 114.** Joza N, Susin SA, Daugas E. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature. 2001 Mar 29;410(6828):549-54

- 115.** Susin SA, Daugas E, Ravagnan L. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):571-80
- 116.** Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):735-47
- 117.** Goping IS, Barry M, Liston P. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity.* 2003 Mar;18(3):355-65.
- 118.** Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):553-9
- 119.** Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):7320-6
- 120.** Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516
- 121.** Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2008; 6 (2): 93-104
- 122.** Tasova Y. Tetrasiklinden Tigesikline. *Ankem Derg.* 2010; 24 (Ek2): 36-44
- 123.** Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis.* 2003 Feb 15;36(4):462-7
- 124.** Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol.* 1996 Jun;165(6):359-69
- 125.** Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Oct;5(4):387-99

- 126.** Stein GE, Craig WA. Tigecycline: a critical analysis. Clin Infect Dis. 2006 Aug 15;43(4):518-24. Epub 2006 Jun 26
- 127.** Saivin S, Houin G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. Clin Pharmacokinet. 1988 Dec;15(6):355-66
- 128.** MacGowan AP. Tigecycline pharmacokinetic/pharmacodynamic update. J Antimicrob Chemother. 2008 Sep;62 Suppl 1:i11-6
- 129.** Rahman Z, Lazova R, Antaya RJ. Minocycline hyperpigmentation isolated to the subcutaneous fat. J Cutan Pathol. 2005 Aug;32(7):516-9
- 130.** Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. Behav Brain Res. 2009 Jan 23;196(2):168-79
- 131.** Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15769-74
- 132.** Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 9;96(23):13496-500
- 133.** Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. Nature. 2002 May 2;417(6884):74-8
- 134.** He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res. 2001 Aug 3;909(1-2):187-93
- 135.** Popovic N, Schubart A, Goetz BD. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. Ann Neurol. 2002 Feb;51(2):215-23

136. Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery*. 2001 Jun;48(6):1393-9; discussion 1399-401
137. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Mar 3;43(5):865-74
138. Klein NC, Cunha BA. Tetracyclines. *Med Clin North Am*. 1995 Jul;79(4):789-801
139. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline? *Pharmacol Res*. 2013 Jan;67(1):18-30
140. Wang X, Zhu S, Drozda M. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10483-7
141. Tao R, Kim SH, Honbo N. Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia–reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Dec;56(6):659-68
142. Shahzad K, Thati M, Wang H. Minocycline reduces plaque size in diet induced atherosclerosis via p27(Kip1). *Atherosclerosis*. 2011 Nov;219(1):74-83. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.041. Epub 2011 Jun 13
143. Huang TY, Chu HC, Lin YL. Minocycline attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 27;389(4):634-9

- 144.** Michaelis M, Kleinschmidt MC, Doerr HW. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Nov;60(5):981-6. Epub 2007 Sep 14
- 145.** Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013 Jun;15(6):659-67
- 146.** Medina MA 3rd, Nguyen JT, Kirkham JC. Polymer therapy: a novel treatment to improve fat graft viability. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Jun;127(6):2270-82
- 147.** Dumont EA, Lutgens SP, Reutelingsperger CP. Minocycline inhibits apoptotic cell death in a murine model of partial flap loss. *J Reconstr Microsurg.* 2010 Oct;26(8):523-8
- 148.** Carobbio S, Rosen B, Vidal-Puig A. Adipogenesis: new insights into brown adipose tissue differentiation. *J Mol Endocrinol.* 2013 Nov 26;51(3):T75-85
- 149.** Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Sep;279(3):C670-81.