

T.C

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

BOTULİNUM TOKSİN İLE ÖN KOŞULLANDIRMANIN YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. SAMET ŞENDUR

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2018



T.C

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ PLASTİK, REKONSTRÜKTİF
VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

BOTULİNUM TOKSİN İLE ÖN KOŞULLANDIRMANIN YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. SAMET ŞENDUR

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. MEHMET NURİ BAYRAMİÇLİ

İSTANBUL 2018

ÖNSÖZ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi eğitimim başından itibaren üstün bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olarak sadece mesleki değil, kişisel becerilerimin de gelişmesinde çok büyük katkısı olan, eğitimim için hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan hocam ve anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Özhan Çelebiler'e, cerrahi sanatının inceliklerini her daim benimle paylaşarak mesleki açıdan gelişmemde büyük rolü olan, tez çalışma sürecinde desteğini hiç esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur ve gurur duyduğum hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Bayramiçli'ye teşekkürlerimi arz ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve becerilerinin yanı sıra tecrübelerinden büyük kazançlar sağladığım değerli hocalarım emekli öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Ayhan Numanoğlu'na ve Sn. Prof. Dr. Erdem Tezel'e; üstün beceri ve bilimselliği ile yetişmemde sonsuz emekleri olan ve beş yıl boyunca bana yol gösteren Sn. Doç. Dr. Bülent Saçak'a, Sn. Yard. Doç. Fatma Nihal Durmuş Kocaaslan'a, Sn. Yard. Doç. Zeynep Deniz Akdeniz Doğan'a, Sn. Yard. Doç. Melekber Çavuş Özkan'a teşekkürlerimi sunarım. Marmara Üniversitesi'ndeki eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, meslektaştan öte dostlarım Dr. Ömer Faruk Deveci'ye, Dr. Zafer Kaya'ya, Dr. Mehmet Cömert'e, Dr. Taygun Oluklu'ya, Dr. İlker Çiçek'e, Dr. Caner Kaya'ya, Dr. Nazım Ramazanov'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca plastik cerrahi kliniğinde görev yapan tüm hemşirelere, personellere ve çalışanlara teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanışı esnasında büyük özveri gösteren, bu süreçte bana her alanda destek olan çok değerli Dt. Elif Özçelik'e; tez çalışmasının deney ve yazım aşaması sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili dostum Dt. Emine Tuna Akdoğan'a, Dr. Conor Alakuş'a ve Dr. Rıza Berk Çimenoğlu'na; deney sonuçlarının değerlendirilmesindeki yardımları için Prof. Dr. Nural Bekiroğlu'na, Prof. Dr. Feriha Ercan ve öğrencisi İrem Hersek'e teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca bana destek olan, bugünlere gelmemde en çok emeği geçen ailem, annem Naime Şendur'a ve babam Recep Şendur'a, kardeşlerim Elif ve Harun Şendur'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dr. Samet Şendur

İmza

ÖZET

Giriş ve Amaç:

Son yıllarda otolog yağ grefti uygulamaları, rekonstrüktif ve estetik cerrahide sıkça kullanılmaktadır. Yağ grefti uygulamasının ana avantajları; kolay uygulanabilir olması, tekrarlanabilir olması, hastanın mevcut dokularının kullanılması ve uygulanan hastaya göre istenilen miktarda elde edilebilir olmasıdır. Yağ grefti sağ kalım oranlarının yüzde 20 ile 90 arasında değişim göstermesi ve bu sağ kalımın ön görülemez olması ise en önemli dezavantajıdır (Ersek, 1991) (Goldwyn, 1988).

Botulinium toksin enjeksiyonları, yüz germe efekti (Kashkouli, Amani, Jamshidian-Tehrani, Yousefi, & Jazayeri, 2014), skar dokusunu azaltma (Xiao, Zhang, Liu, & Ren, 2011) ve flep sağkalımını artırma (Chenwang et al., 2009) gibi geniş yelpazede klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Deri fleplerinde botulinium toksin-A'nın sempatik nöronları baskılaması sonucunda vazodilatasyon yapması ile flebin kan akımını ve yaşayabilirliğini arttırabileceğini, bunu da VEGF ve CD31 gibi mediyatörlerin salınımını artırması ile gerçekleştirdiğini belirten çalışmalar literatürde mevcuttur (Kim et al., 2009).

Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda botulinium toksin-A ile denerve edilmiş ve damarlanması artmış alanlardan 'alınan' veya böyle alanlara 'verilen' yağ greftinin sağ kalımına etkisinin hem alıcı hem de verici alan üzerinden değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem:

Bu çalışma çift kör randomize bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Araştırmamızda 40 adet Wistar cinsi sıçanlar randomize olarak 5 gruba ayrılmıştır. Tüm gruplarda yağ grefti verici alan olarak sağ inguinal yağ yastıkçığı ve alıcı alan olarak interskapular bölgedeki dorsal subkutan saha kullanılmıştır. Kontrol grubu dışındaki enjeksiyonlar, gruplara uygun olarak belirtilen bölgelere uygulanmıştır.

Kontrol grubunda (grup 1); yağ grefti, sağ inguinal bölgeye insizyon ile girilip yağ yastıkçığı şeklinde alınmıştır. Verici alanın primer sütüre edilmesinin ardından, alınan yağ grefti serum fizyolojik ile yıkanıp, dorsal subkutan bölgeye kesi ile girilmiş ve burada standart olarak açılan alana yerleştirilmiştir.

İkinci grupta; sağ inguinal bölgeye 1.5 Ü (0,75 cc serum fizyolojik içerisinde) botulinium toksin A (BTx- A) enjeksiyonu uygulanıp, 7 gün sonra aynı işlem ile alınan yağ grefti dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilmiştir. Üçüncü grupta; sağ inguinal bölgeye 0,75 cc serum fizyolojik enjeksiyonu uygulanıp, 7 gün sonra aynı işlem ile alınan yağ grefti dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilmiştir.

Dördüncü grupta; dorsal subkutan bölgeye 1.5 Ü BTx- A (0,75 cc serum fizyolojik içerisinde) uygulanıp; yedi gün sonra, sağ inguinal bölgeden alınan yağ grefti ön koşullandırılan dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilmiştir. Beşinci grupta ise; dorsal subkutan bölgeye 0.75 cc serum fizyolojik uygulanıp; 7 gün sonra, sağ inguinal bölgeden alınan yağ greftinin, daha önce enjeksiyon yapılan dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilmiştir.

Beş gruptaki dorsal bölgeye yerleştirilmiş olan yağ greftleri sekiz haftanın sonunda ağırlık ve hacim kaybı açısından, apoptotik hücre varlığı açısından ve histopatolojik olarak da beş kriter altında (kist oluşumu, inflamasyon, anjiyogenez, hasarlı uniloküler yağ doku varlığı ve multiloküler yağ doku oluşumu) incelenmiştir.

Her bir grubun kendi içerisindeki ağırlık ve hacim değişim verileri ‘Wilcoxon matched pairs signed rank test’ ile değerlendirilmiştir. Beş grubun biribiri ile histolojik parametrelerin değerlendirilmesinde ‘Kruskal-Wallis (non-parametrik ANOVA) testi’ kullanılmıştır. Bu testte değerlerin anlamlı bulunması durumunda ise ‘Dunn çoklu karşılaştırma testi’ ile gruplar ikili olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular:

Yağ greftlerindeki ağırlık ve hacim kaybı açısından gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Ancak dorsal alıcı alana botulinum toksin-A (BTx- A) enjeksiyonu uygulanan dördüncü gruptaki yağ grefti ağırlık kaybının en az olduğu, kontrol grubu olan birinci gruptaki yağ grefti ağırlık kaybının ise en fazla olduğu tespit edildi.

Beş grup arasında; kist oluşumu, inflamasyon derecesi, apoptotik hücre varlığı ve anjiyogenez açısından anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). İnguinal ve dorsal bölgenin BTx-A ile ön koşullandırıldığı iki gruptaki anjiogenez skorlamasının diğer gruplara göre göreceli olarak artmış olduğu saptandı.

Hasarlı uniloküler yağ doku varlığı açısından gruplar değerlendirildiğinde; verici alana (inguinal bölgeye) BTx-A enjeksiyonu yapılan grupta (grup 2), hasarlı doku oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi ($p: 0.0023$). Multiloküler yağ doku oluşumu açısından gruplar değerlendirildiğinde ise; alıcı alana BTx-A enjeksiyonu yapılan grupta (grup 4), yeni yağ doku oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi ($p: 0.0016$).

Tartışma ve Sonuç:

Botulinum toksin-A ile birlikte yağ grefti işlemi plastik ve rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu kombine kullanım halen tartışmalıdır. Baek ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, BTx-A ile karıştırılarak verilen yağ greftlerindeki hücresel bütünlüğün, yağ grefti ağırlığının ve hacminin istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu, bununda alıcı alandaki kas kasılmasının BTx-A ile azalmasına bağlı olabileceği savunulmuştur (Baek et al., 2012). Bizim çalışmamızda, alıcı alandaki kas kasılmasına BTx-A ile müdahale edilmeksizin verici alana uygulanan BTx-A grubunda hasarlı yağ dokularının anlamlı derecede daha az olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen bu sonuç ise, BTx-A'nın yağ grefti üzerine etkisinin sadece kas kasılmasını engelleyerek etki etmediği şeklinde yorumlanabilir.

Tang ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel bir çalışmada ise botulinum toksin-A ile karıştırılarak verilen yağ greftlerinde CD31 ve VEGF ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır (Tang et al., 2017). Bizim çalışmamızda ise BTx-A'nın etkinliği dokular üzerine ön koşullandırma yapılarak ve verici alan üzerindeki etkisi de araştırmaya alınarak yağ grefti sağ kalıma etkisi incelenmiştir.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda alıcı ve verici saha BTx-A ile ön koşullandırılmasının ardından yağ grefti sağ kalımı araştırılmıştır. Verici alanın BTx-A ile ön koşullandırıldığı yağ greftlerinde hasarlı yağ doku oranın istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu, alıcı alanın BTx-A ile ön koşullandırıldığı yağ greftlerinde ise yağ greftindeki yeni multiloküler yağ oranın istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Alıcı alanda BTx-A ile kas kasılması engellenmeksizin sadece verici alana BTx-A uygulanan grupta hasarlı yağ dokuların daha az olması, BTx-A'nın yağ grefti üzerinde sağ kalım artırıcı etkisinin sadece kas kasılmasını engelleyerek yapmadığını göstermektedir. Alıcı veya verici sahanın botulinum toksin-A ile ön koşullandırılan dokulardaki yağ grefti sağ kalım artışının net mekanizması ve bunun adipoz kökenli kök hücre ile ilişkisi ilerleyen çalışmaların konusu olabilir.

Anahtar Sözcükler: yağ grefti, yağ grefti sağ kalımı, botulinium toksin

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Introduction and Purpose:

In recent years, autologous fat graft applications have been frequently used in reconstructive and aesthetic surgery. The main advantages of fat graft procedures are; ease of application, harvesting from patients' tissues and the availability of desired amount. The most important disadvantage is the survival rate of fat grafts varies between 20 and 90 percent and this survival rate is unpredictable (Ersek, 1991; Goldwyn, 1988).

The botulinium toxin injection is used for wide range of clinical applications such as face lift effect (Kashkouli et al., 2014), scar tissue reduction (Xiao et al., 2011), and increasing the flap survival rate (Chenwang et al., 2009). Studies have shown that, the usage of botulinium toxin A for skin flaps could cause vasodilatation as a result of suppression of sympathetic neurons, thereby increasing the flaps' blood flow and viability. In the literature; this have been related to increased amount of the released mediators, such as VEGF, CD31 (Kim et al., 2009).

The purpose of this study is to assess the survival rate of the fat graft after preconditioning the recipient and the donor site which is vascularised and denervated by botulinum toxin-A.

Material and Methods:

This research was designed as a double blind randomized study. In this study, 40 Wistar rats were randomly divided into 5 groups. In all groups, right inguinal fat pad was used for the fat graft donor area and the interscapular subcutaneous region of the rat was used for the recipient area.

In the control group (Group 1); the fat graft was harvested from the right inguinal area as an inguinal fat pad. After suturing the donor site primarily, the fat graft irrigated with saline and adapted into the dorsal subcutaneous region of the rat and the recipient incision was sutured primarily.

In the second group; 1.5 U (in 0.75 cc saline) botulinum toxin (BTx-A) was injected on the right inguinal region. Seven days later, the fat graft was harvested from right inguinal area and adapted into the dorsal subcutaneous region with the same procedure. In the third group; 0.75 cc saline was injected on the right inguinal region. Seven days later, the fat graft was harvested from right inguinal area and adapted into the dorsal subcutaneous region with the same procedure.

In the fourth group; 1.5 U (in 0.75 cc saline) botulinum toxin (BTx-A) was injected on the dorsal subcutaneous region. Seven days later the fat graft was harvested from right inguinal area and adapted into the dorsal subcutaneous region with the same procedure. In the fifth group; 0.75 cc saline was injected on the dorsal subcutaneous region. Seven days later, the fat graft was harvested from right inguinal area and adapted into the dorsal subcutaneous region with the same procedure.

After eight weeks of follow up, fat grafts that were placed in the dorsal region of all rats were examined in terms of weight and volume loss, apoptotic cell entity and then they were evaluated by five histopathological criteria (cyst formation, inflammation, angiogenesis, damaged unilocular fat tissue and new multilocular fat tissue formation).

The data of weight and volume differentiation for each group were evaluated by 'Wilcoxon matched pairs signed rank test'. The 'Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) test' was used to assess histologic parameters to compare the values for five groups. If the values found to be significant in this test, the groups were compared by two groups with 'Dunn multiple comparison test'.

Results:

In terms of weight and volume reduction in fat grafts, there was no statistically significant difference between the groups ($p > 0,05$). However, it was observed that the weight loss in the fourth group which BTx- A injection was applied to the dorsal recipient area had the lowest figure whereas the fat graft weight loss in the the control group had the highest figure.

There was no significant difference between the groups in terms of apoptotic cell entity, cyst formation, degree of inflammation and angiogenesis ($p > 0.05$). Although, the angiogenesis was relatively increased in both pre-conditioned donor and recepient areas with BTx-A groups (group 2 and 4).

When groups were evaluated in terms of damaged unilocular fat tissue, the ratio of damaged fat tissue was significantly lower (p: 0.0023) in the donor area BTx-A injected group (group 2). In addition to that, the groups were evaluated in terms of new formed multilocular fat tissue and this category was significantly higher (p: 0.0016) in pre-conditioned recipient area with BTx-A group (group 4).

Discussion and Conclusion:

Fat grafting with botulinum toxin-A is widely used in plastic and reconstructive surgery. However, this combined use is still controversial. In a study conducted by Baek et al., it was demonstrated that cell integrity, fat graft weight and volume increased significantly with the mixture of fat graft and BTx-A. It was concluded that the reason for this significant increase could be related to the inhibition of muscle contractions in the recipient area (Baek et al., 2012). In our study, it was found that the score of damaged fat tissue was significantly lower in pre-conditioned donor area with BTx-A group (without interfering with BTx-A for muscle contraction on the recipient area). This result suggests that the positive effect of the botulinum toxin on fat graft survival is not only caused by inhibition of muscle contraction at recipient area.

In an experimental study conducted by Tang et al., it was reported that CD31 and VEGF expression levels increased significantly in the mixture of fat graft and BTx-A group (Tang et al., 2017). However, in our study the survival of the fat graft was examined by preconditioning with BTx-A both on donor and recipient area rather than mixing the fat graft with BTx-A.

In conclusion, the fat graft survival rate was investigated after preconditioning the recipient and donor site with BTx-A in our research. We found that the proportion of damaged fat tissue in the fat grafts pre-conditioned with BTx-A at the donor area decreased significantly while the ratio of new fat cells increased significantly in the fat grafts preconditioned with BTx-A at the recipient area. Nevertheless, the net mechanism of fat graft survival in pre-conditioned recipient and donor tissues with botulinum toxin-A and its relation to the adipose-derived stem cells, is still not clear and it could be the subject for further studies.

Key words: fat graft, survival of the fat graft, botulinium toxin

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... *iv*

ÖZET ..... *vi*

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT) ..... *x*

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... *xv*

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ ..... *xvii*

1. GİRİŞ VE AMAÇ *1*

2. GENEL BİLGİLER *3*

2.1. Yağ Dokusu **3**

2.2. Yağ Grefti **6**

2.2.1. Yağ grefti tarihçesi 7

2.2.2. Yağ grefti elde edilme, hazırlanma ve uygulama yöntemleri 9

2.2.3. Yağ greftinde meydana gelen fizyolojik süreçler 11

2.2.4. Yağ grefti ve hayvan modelleri 14

2.2.5. Yağ greftinin klinik uygulamaları 16

2.2.6. Yağ grefti sağ kalımını artırmaya yönelik işlemler 17

2.3. Botulinum Toksin **19**

2.3.1. Botulinum toksinin farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri 19

2.3.2. Botulinum toksinin kullanım alanları ve yan etkileri 23

2.3.3. Botulinum toksinin yağ grefti sağ kalımı üzerine etki mekanizması 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM *26*

3.1. Deney Protokolü ve Deney Grupları **26**

3.2. Cerrahi Yöntem **27**

3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi **32**

3.3.1. Makroskopik değerlendirme 32

3.3.2. Histolojik değerlendirme 33

3.3.3. İstatistiksel değerlendirme 34

4. BULGULAR *35*

4.1. Makroskopik Bulgular **35**

4.2. Histolojik Bulgular **43**

5. TARTIŞMA *51*

6. SONUÇ *58*

7. KAYNAKLAR *59*

8. EKLER *64*

8.1. Etik Kurul Onayı **64**

8.2. BAPKO Proje Onayı **65**

9. ÖZGEÇMİŞ *67*

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- **°C** **:** Santigrat derece
- **A. B. D** : Amerika Birleşik Devletleri
- **ADSC** : Adipoz kökenli kök hücre *(adipose-derived stem cells)*
- **ark.** : Arkadaşları
- **bFGF** **:** Temel fibroblast büyüme faktörü
- **bkz.** : Bakınız
- **BTx** : Botulinum toksin
- **BTx- A** : Botulinum toksin tip A
- **Ca** : Kalsiyum
- **CD31** : Yüzey farklılaşma molekülü 31
- **cm** : Santimetre
- **FDA** : Gıda ve İlaç Dairesi
- **G** : Gauge
- **gr** : Gram
- **H-E** : Hematoksilen eozin
- **HSP** : Isı şok proteini
- **IL- 6** : Interlökin 6
- **k-Da** : Kilo dalton
- **kg** : Kilogram
- **L** : Litre
- **mgr** : Miligram

- **ml** : Mililitre
- **mm** : Milimetre
- **NE** : Noradrenalin
- **NM** : Nöromüsküler
- **NO** : Nitrik oksit
- **NPY** : Nöropeptid y
- **PAI-1** : Plazminojen aktövatör inhibitör
- **PKC** : Protein kinaz C
- **SNAP** : Sinaptozom ilişkili protein
- **TGFβ1** : Transforme edici büyüme faktörü beta 1
- **TNF** : Tümör nekroz faktörü
- **TUNEL** **:** Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılı dUTP-digoksijenin nick uçlu etiketleme analizi
- **TXA_2** : Tromboksan A_2
- **U veya Ü** : Ünite
- **U.K.** : Birleşmiş Krallık
- **VAMP** : Vezikül ilişkili membran proteini
- **VEGF** : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1. Beyaz veya uniloküler adipoz doku histolojisi.

Şekil 2. Yağ hücrelerinin gelişim basamakları.

Şekil 3. Greft sağ kalım teorisinin şematik açıklaması.

Şekil 4. Greft sağ kalım teorisi ve greft replasman teorisinin birlikte olarak şematik açıklaması.

Şekil 5. Botulinum toksinin şematik yapısı.

Şekil 6. Botulinum toksinin etki mekanizması.

Şekil 7. Botulinum toksinin her bir alt tipi farklı proteinler üzerinden etki göstermesi.

Şekil 8. (a) Sağ inguinal bölgede inguinal yağ yastıkçığına ulaşmak için yapılan işlem öncesi çizim **(b)** sağ inguinal yağ yastıkçığı.

Şekil 9. (a) Yağ grefti hacminin ölçülmesi için Arşimed prensibine dayanan düzenek **(b)** alıcı alana yerleştirilmeden önceki yağ grefti **(c)** yağ grefti hacminin bu düzenekte ölçülmesi.

Şekil 10. (a) Yağ grefti alıcı alan interskapular bölge çizimi **(b)** yağ greftinin alıcı alana yerleştirilmesi.

Şekil 11. İkinci grupta (botulinum toksin A) ve üçüncü grupta (serum fizyolojik) 26 G iğne ile yapılan enjeksiyon yöntemi.

Şekil 12. (a) Sekizinci haftanın sonunda alıcı alandaki yağ greftinin görünümü ve **(b)** yağ greftinin ileri inceleme için cerrahi olarak çıkarılması.

Şekil 13. (a) Laboratuvar Analitik Hassas Terazi, Radwag 220 AS ile greft ağırlıklarının ölçümü **(b)** greft hacminin ölçülmesi.

Şekil 14. Grup 1'e ait temsili fotomikrograflarda, yoğun kist oluşumu **(*)**, enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları **(ok başı)**, hasarlı uniloküler adipositler **(A ve B - ok)** ve TUNEL pozitif hücreler **(C, ok)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Şekil 15. Grup 2'ye ait temsili fotomikrograflarda, orta düzeyde kist oluşumu **(*)**, hafif düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları (ok başı) ve orta düzeyde hasarlı uniloküler adipositler **(ok, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Şekil 16. Grup 3'e ait temsili fotomikrograflarda, yoğun kist oluşumu **(*)**, orta düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları **(ok başı)**, orta düzeyde hasarlı uniloküler adipositler **(ok, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. Periferik sinir kesiti **(n, B)**. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Şekil 17. Grup 4'e ait temsili fotomikrograflarda, hafif düzeyde kist oluşumu **(*)**, enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları **(ok başı)**, az sayıda hasarlı uniloküler adipositler **(ok)**, multiloküler adipositler **(m, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Şekil 18. Grup 5'e ait temsili fotomikrograflarda, orta düzeyde kist oluşumu **(*)**, enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, küçük damar oluşumları **(ok başı)**, hasarlı uniloküler adipositler **(ok, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Şekil 19. TUNEL boyamanın pozitif kontrolü preparatında TUNEL pozitif **(ok)** hücreler görülmektedir. Orijinal büyütme: x200.

Şekil 20. Hasarlı uniloküler yağ doku varlığı ve multiloküler yağ doku oluşum ortalamalarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Tablo 1. Grup 1- Kontrol grubunda ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

Tablo 2. Grup 1- Kontrol grubunda ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc).

Tablo 3. Grup 2- Sağ inguinal bölgeye BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

Tablo 4. Grup 2- Sağ inguinal bölgeye BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc).

Tablo 5. Grup 3- Sağ inguinal bölgeye salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

Tablo 6. Grup 3- Sağ inguinal bölgeye salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc).

Tablo 7. Grup 4- Dorsal alıcı alana BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

Tablo 8. Grup 4 – Dorsal alıcı alana BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc).

Tablo 9. Grup 5 – Dorsal alıcı alana salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

Tablo 10. Grup 5 – Dorsal alıcı alana salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc).

Tablo 11. Beş grubun ilk işlem sırasındaki ve sekizinci hafta sonundaki ortalama yağ greft ağırlık ve hacim açısından sağ kalım yüzdeleri.

Tablo 12. Histopatolojik değerlendirmelerin gruplara göre ortalama değerleri.

Tablo 13. Hasarlı uniloküler yağ doku açısından grupların 'Kruskal-Wallis (non-parametrik ANOVA) testi ile değerlendirilmesi.

Tablo 14. Multiloküler yağ doku oluşum açısından grupların 'Kruskal-Wallis (non-parametrik ANOVA) testi ile değerlendirilmesi.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda otolog yağ grefti uygulamaları, rekonstrüktif ve estetik cerrahide sıkça kullanılmaktadır. Bu uygulamaların temel amacı; skar dokusunu iyileştirmek ve uygulandığı bölgeye hacim kazandırmaktır (Coleman & Katzel, 2015; Klinger et al., 2013). Yağ grefti uygulamasının ana avantajları; kolay uygulanabilir olması, tekrarlanabilir olması, hastanın mevcut dokularının kullanılması ve istenilen miktarda elde edilebilir olmasıdır. Yağ grefti sağ kalım oranlarının yüzde 20 ile 90 arasında değişim göstermesi ve bu sağ kalımın ön görülemez olması ise en önemli dezavantajıdır (Ersek, 1991; Goldwyn, 1988).

Yağ greftinin alınma, hazırlanma ve alıcı sahaya enjeksiyon tekniklerinin yağ hücrelerinin sağ kalımı üzerine önemli etkileri mevcuttur (Strong, Cederna, Rubin, Coleman, & Levi, 2015). Bu teknikler üzerinden en ideal şekilde uygulanan yağ greftlerinde bile sağ kalım net olarak öngörülememektedir. Literatürde sağ kalımı artırmaya yönelik olarak yağ greftleri; epidermal büyüme faktörü (EGF) (Park, Kong, Kang, & Kim, 2011), trombositten zenginleştirilmiş plazma (K. Li et al., 2017; Serra-Mestre, Serra-Renom, Martinez, Almadori, & D'Andrea, 2014), fibrin yapıştırıcı (Karaçal, Çobanoğlu, Ambarcioğlu, & Kutlu, 2007), alıcı alandaki vaskülarizasyonu da artırmak amacı ile vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) (L. Li, Pan, Ni, & Lin, 2014), adipoz kökenli kök hücre (Xiong et al., 2018) ve botulinum toksin (Baek et al., 2012) ile birlikte verilmiştir. Bu çalışmalarda anlamlı sonuçlar bulunsa da, pratik uygulamalarda genel olarak kabul görmüş bir yaklaşım bulunmamaktadır.

Yağ grefti sağ kalımında, alıcı alandaki damarlanmanın iyi olması gerekmektedir. Kanlanması artırılmış alıcı alan ve kas içi uygulamalarda yağ grefti yaşayabilirliğin daha yüksek olduğu çalışmalarda ortaya konulmuştur (Sezgin et al., 2014; Shi, Yuan, Dong, Gao, & Lu, 2016).

Botulinium toksin, kolinerjik nöronların kas-sinir bileşkesinde asetilkolin salınımı inhibe ederken aynı zamanda norepinefrinin salınımını da inhibe etmektedir.

Botulinium toksin enjeksiyonları, yüz germe efekti (Kashkouli et al., 2014), skar dokusunu azaltma (Xiao et al., 2011) ve flep sağkalımını artırma (Chenwang et al., 2009) gibi geniş yelpazede klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Deri fleplerinde botulinium toksin A'nın sempatik nöronları baskılaması sonucunda vazodilatasyon yapacağını, böylece flebin kan akımını ve yaşayabilirliğini arttırabileceğini, bunu da VEGF, CD31 gibi mediyatörlerin salınımını artırmaya bağlayan çalışmalar literatürde mevcuttur (Kim et al., 2009).

Ön koşullandırma olmadan; alıcı alana verilmeden önce, botulinium toksin ile karıştırılmış şekilde yağ greftinin alıcı alana uygulanmasının VEGF ve CD31 gibi mediyatörlerin salınımı artırmasıyla yağ grefti sağ kalımını arttırdığı literatürde bahsedilmiştir (Tang et al., 2017). Ancak alıcı veya verici alanın botulinum toksin ile ön koşullandırma uygulanması durumunda yağ grefti sağ kalım etkisini değerlendiren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; botulinium toksin ile denerve edilmiş ve damarlanması artmış alanlardan 'alınan' veya böyle alanlara 'verilen' yağ greftinin sağ kalımına etkisinin hem alıcı hem de verici alan üzerinden değerlendirmektir. Bu açıdan bu çalışmanın literatüre katkı sağlayacağını ve klinik pratikte, özellikle girişimsel olmayan yüz gençleştirme hastalarında, öncesinde botulinium toksin uygulanmış olan kişilerde uygulanacak yağ greftinin sağ kalımı etkisine de ışık tutabileceğini düşünülmektedir.

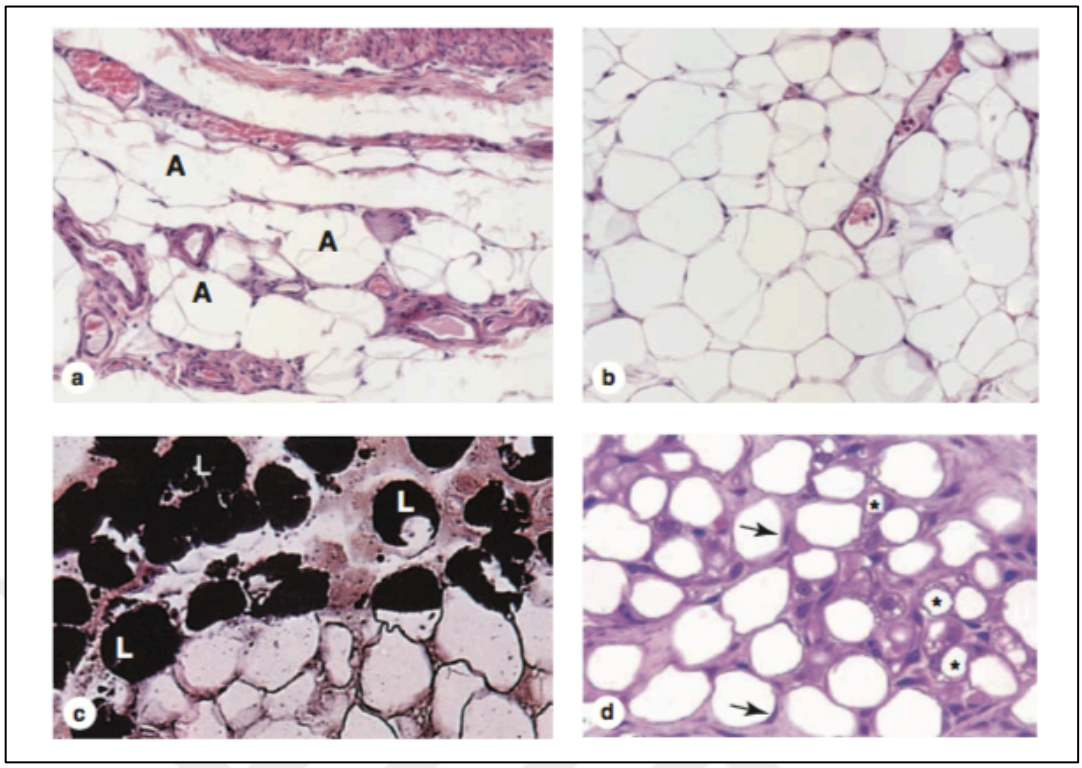
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Dokusu

Yetişkin memelilerde yağ doku kitlesi büyük oranda adiposit olarak adlandırılan lipid dolu hücrelerin birbiri ile gevşek olarak bağlanmasıyla oluşur. Yağ dokusu ayrıca fibroblast, lökosit, makrofaj ve pre-adiposit gibi bazı yapısal hücreler de içerebilir. Yağ dokusu, içerdiği lipid damlacıklarına göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak sınıflandırılır. Beyaz yağ dokusundaki adipositlerde çekirdek kenara itilmiş olup, çekirdeğin yakınında organelleri de içeren ince bir sitoplazmik bölüm bulunur (Şekil 1). Bu hücreler tek ve büyük bir lipid damlacığı taşıdıklarından 'taşlı yüzük' manzarası oluştururlar. Lipid damlacığı herhangi bir hücre içi organel içermez. Kahverengi yağ dokusunu oluşturan multiloküler hücreler ise tipik olarak birçok küçük lipid damlacığı içerir. Bu dokunun hücreleri mikroskobik olarak bol miktarda küresel, oval ya da ipliksi formda ve sıkı paketlenmiş mitokondri taşıdığından, çıplak gözle bakıldığında kahverengi olarak görünür.

Kahverengi yağ dokusu küçük memelilerde ve neonatal dönemdeki insanlarda bulunup temel görevi, enerji harcanması ve termogenezi sağlamaktır. Kahverengi yağ dokusu özellikle; karında, böbrek üstü bezi çevresinde, periton içi alanda, göğüs kafesi içerisinde ve perikard çevresinde bulunur. Beyaz yağ dokusu ise vücut ağırlığının yüzde 10-20'sini oluşturup, cilt altı ve periton içi alanda bulunmaktadır. Beyaz yağ dokusunun ana işlevi, trigliserid yapısı üzerinden enerji depolamaktır. Ayrıca beyaz yağ dokusu, adipokin adı verilen peptid ve hormonları da sentezleme görevini üstlenmiştir (Sorisky & Gagnon, 2002).

Beyaz ve kahverengi yağ dokusunun çevresel faktörlere ve anatomik bölgelere bağlı olarak değişik oranlarda bulunabilceğini ortaya konmuştur. Sıçan ve farelerdeki beyaz yağ dokusunun, kahverengi yağ dokusuna güçlü oranda dönüşebileceği, bununda yağ dokusundaki hücre plastisitesine bağlı olarak gerçekleştirebileceği ortaya konulmuştur. Hem kemirgenlerde hem de insanlarda kahverengi yağ dokusunun da beyaz yağ dokusuna daha düşük oranda da olsa dönüşebileceği saptanmıştır (Casteilla, Pénicaud, Cousin, & Calise, 2008).



Şekil 1. Beyaz veya uniloküler adipoz doku histolojisi.

(a) Küçük kan damarlarıyla ilişkili bağ dokusunda büyük beyaz adipositler (A) görülür. Yağ hücrelerinin iç kısmı boş olarak gözükmektedir çünkü lipid dokusu, doku hazırlanması sırasında çözünmüştür. Hücre zarlarındaki çekirdekler, bazı yağ hücrelerinde görülebilir. X 100. H & E.

(b) Büyük (boş) adipositler, bu tipik beyaz yağ dokusunda baskın olarak gözlenmektedir. Tek bir histolojik kesitte, çok büyük adipositlerin çekirdekleri genellikle görüntüye dahil olmaz. X 100. H & E.

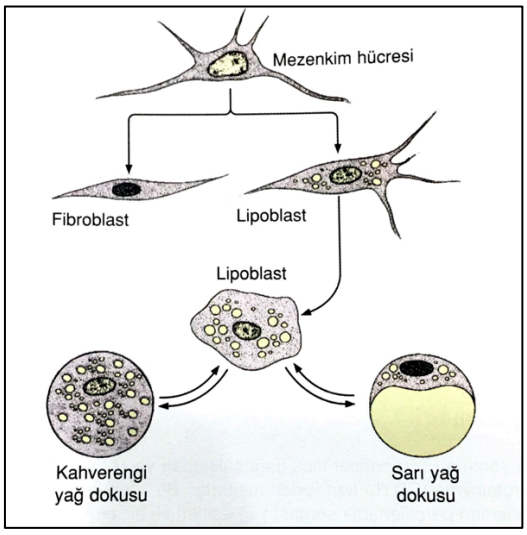
(c) Doku, bu kesitte lipit (L)' in çözünmesini önleyen ve siyah renk ile işaretleyen osmium tetroksit ile fikse edilmiştir. X 440. Osmiyum tetroksit.

(d) Bu kesit genç bir memeliden alınmıştır, yıldız ile işaretlenen adipositler henüz sitoplazmalarında çok küçük lipit damlacıkları olduğundan uniloküler yapıda olmadığını ve farklılaşmasını henüz tamamlanmamış olduğunu gösterir. Uniloküler hücrelerin eksantrik nukleusları ok başı ile gösterilmiştir. X 200. (Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (2003). *Basic histology: text & atlas*. Değiştirilerek kullanılmıştır.).

Yağ dokusu ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda yağ dokusunun sadece trigliserid depoladığı ve termogenezde rol oynadığı düşünülmesine rağmen, son yıllarda artan obezite kaynaklı çalışmalar ışığında, yağ dokusunun bu işlevlerine ek olarak aktif bir endokrin organ fonksiyonuna da sahip olduğu, bir takım biyoaktif peptid ve hormon da salgıladığı ortaya konmuştur. Salgılanan bu ürünler diğer hücreler ile otokrin, parakrin ve endokrin yollar ile haberleşip, metabolizma ve immünite üzerine etkiler oluşturur (Sorisky & Gagnon, 2002).

Metabolizma üzerine etkileri; insulin aktivasyonu, enerji dengesinin düzenlenmesi, besin alımı, lipid ve glukoz metabolizması, kan basıncının düzenlenmesi ve koagülasyondur. İmmünite üzerine etkiler ise salgılanan inflamatuar ve pro-inflamatuar maddeler ile oluşmaktadır.

Yağ dokusunun embriyolojik kökenleri mezenkimal hücrelerdir (Şekil 2). Multipotent olan mezenkimal kök hücre, gestasyonun ilerleyen aşamalarında moleküler sinyallerin etkisi altında osteoblast, kondroblast ve adipoblast gibi mezenkimal dokuların öncül hücrelerine farklılaşırlar. Yağ dokusunun farklılaşan bu öncül hücreleri, diğer adıyla adipoblastlar, moleküler ve çevresel uyaranların etkisi altında pre-adiposite dönüşür. Pre-adipositler ise farklılaşma kaskadının son basamağı olan adipositlere dönüşmektedir (Tholpady et al., 2006).



Şekil 2. Yağ hücrelerinin gelişim basamakları. Farklılaşmamış mezenkim hücreleri yağ depolayan lipoblastlara dönüşerek gelişmiş yağ doku hücrelerini açığa çıkarır (Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (2003). *Basic histology: text & atlas*. Değiştirilerek kullanılmıştır.).

2.2. Yağ Grefti

Yağ grefti diğer greftlere benzer olarak; kendisini besleyen damar yapısına bağlı olmaksızın elde edilen, vücudun bir alanından alınan ve bir başka alınına aktarılan yağ dokusudur. Otolog yağ greftleri plastik, estetik ve rekonstrüktif cerrahide özellikle kontür deformitelerinin düzeltilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Otolog yağ greftinin ana avantajları aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Kişinin kendi dokusunu kullanmak,
- Kolay ve istenilen miktarda elde edilebilmesi,
- Allerjik olmaması,
- Aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açmaması,
- Yabancı cisim reaksiyonuna yol açmaması,
- Hacim artışı sağlaması,
- Deri kalitesinde düzelme sağlayabilmesi,
- Doğal görünüm sağlaması,
- Doku yapısına yüksek uyum kapasitesine sahip olmasıdır.

Kişinin kendi dokusundan uygulanan yağ grefleri, bu özellikleri sebebi ile ideal dolgu maddesi olarak kabul edilir (Coleman, 2001). Bu avantajlarının yanında en sık karşılaşılan dezavantajı rezorbsiyon oranlarının belirlenememesidir ve bu sorun uygulamada kısıtlılıklara yol açabilmektedir. Yağ greftlerinin diğer dezavantajları ise aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Cerrahi bir işleme gerek duyulması,
- Verici alan ile ilgili sorunlar,
- Bazı hastalarda yeterli verici alan olmaması,
- Yağ nekrozu gelişimi riskine sahip olmasıdır.

2.2.1. Yağ grefti tarihçesi

Tarihsel olarak plastik cerrahinin altın çağının 19. yüzyılın başlarında olduğu belirtilmektedir. Bunun ana nedeni olarak, pediküllü cilt fleplerinin kendi yerinden ayrılarak başka yere aktarımında kullanılmaya bu yüzyılda başlamış olması gösterilmektedir. İlerleyen yıllarda ise sadece cilt dokusunun değil diğer dokularının da aynı şekilde kullanımı ile yağ greftlerinin temeli atılmıştır.

Yağ grefti kullanımının ilk uygulaması, 1893 yılında Alman cerrah Dr. Gustav Neuber tarafından orbital bölgedeki skar dokusuna yağ dokusu uygulaması olarak bildirilmiştir (Niemelä, Miettinen, Sarkanen, & Ashammakhi, 2008). İki yıl sonra ise diğer bir Alman cerrah olan Dr. Victor Czerny, tek taraflı kısmi mastektomi uygulanmış bir hastaya lipom dokusunu transfer ettiği bildirilmiştir. Bu dönemlerde yağ greftleri, dermis ile beraber olarak elde edilip, aktarılacak bölgeye bir bütün halde uygulanmakta ve bu işlem 'dermal yağ grefti' olarak isimlendirilmekteydi. 1909 yılında Dr. Hollander, bir bütün olarak aktarılan yağ dokusu yerine kanül ile yağ enjeksiyonunu ilk tanımlayan kişi olarak literatüre geçmiştir. Ancak bu uygulama bulunduğu dönemde pek fazla tercih edilmemiştir (Pu, Yoshimura, & Coleman, 2015).

Birinci Dünya Savaşı döneminde bir maksillofasyal cerrah olan Dr. Lexer'in ise savaşta yaralanan hastaların tedavisinde yağ greftlerinin lokal flepler ile birlikte kullandığı bildirilmiştir. Modern kozmetik cerrahinin temellerini oluşturan isimler arasında adı geçen Amerikalı cerrah Dr. Miller, 1926 yılında 'Cannula Implants' adlı kitabında yağ greftinin enjektör yardımı ile deprese alanlarda cilt altı uygulamayı tariflemiştir fakat yağ enjeksiyonu uygulamaları yine bu dönemde pek fazla tercih edilen bir yöntem olmamıştır (Kakagia & Pallua, 2014).

Yağ grefti ile ilgili deneyimler arttıkça hastaların takiplerinde aktarılan yağ dokusunun azaldığı, yağ kistlerinin oluştuğu, yumuşak kıvamdaki yağ greftinin ilerleyen dönemlerde sert bir yapıya dönüştüğü farkedilmiştir. 1950'li yıllarda plastik cerrahinin öncülerinden olan Amerikallı cerrah Dr. Lydon Peer, yağ grefti işleminden

bir yıl sonra aktarılan dokunun yarısının sağ kaldığını diğer yapıların fibrotik bir yapıya dönüştüğünü ortaya koymuştur (Pu et al., 2015).

1980'li yıllarda '*liposuction'* olarak bilinen yağ aldırma işlemi birbirinden bağımsız iki cerrah (Dr. Pierre Fournier ve Dr. Yves-Gerard Illouz) tarafından tanımlanmıştır. Tüm dünyada büyük ses getiren bu teknik '*lipofilling*' ismi ile alınan yağ dokusunun deprese alanlarda kontur düzeltilmesi için kullanılmaya başlanmıştır. Aynı dönemde Arjantinli Plastik cerrah Dr. Abel Chajchir; rezorbsiyon oranlarını düşürmek adına yağın dikkatli manipülasyonunu ve yağ greftlerinde ölü hücrelerin ayrıştırılması için serum fizyolojik ile aspiratın yıkanmasını, bu sayede vaskülerizasyonu artmış, rezorbsiyon oranı azalmış dokuların elde edilebileceğini savunmuştur (Pu et al., 2015).

1990'lı yılların sonlarında ise Amerikalı Cerrah Dr. Sydney Coleman, yağ grefti alınması ve uygulanması işlemini, sistemize hale getirmiştir. Yağ greftinin, 10 ml'lik enjektöre bağlı 3 mm'lik künt kanüller ile, travmayı en aza indirmek için düşük basınç altında alınması gerektiğini, santrifüj edildikten sonra da 18 G'lık kanüller ile tünelize edilerek verilmesi gerektiğini tariflemiş ve bu teknik "*Lipostructure*" ismi ile literatürde yer edinmiştir (Coleman, 1997).

21. yüzyılın başlarında ise; yağ dokusu ile ilgili yapılan ileri araştırmalarda yağ dokusunda, mezanşimal kök hücrelerin mevcut olduğu ve bu hücrelerin diğer dokulara dönüşme potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu hücrelere 'adipoz kökenli kök hücreler *(adipose-derived stem cells)*' ismi verilmiştir. Ayrıca "stromal vasküler fraksiyon (SVF)" olarak adlandırılan; preadipositler, perisitler, endotelyal progenitör hücreler, T hücreleri, B hücreleri, nötrofil hücreleri, mast hücreleri ile tamir ve rejenerasyon potansiyeli olan lipoaspirat içeriği yine bu dönemde tariflenmiştir. SVF'nin yara iyileşmesini hızlandıran, cilt kalitesini arttıran, zarar gören ya da ölen dokunun yerini alan hücreler olduğu düşünülmektedir (Pu et al., 2015).

Yağ grefti keşfinden sonra gerçekleşen tarihsel evrimi özetlemek gerekirse, çalışmalardaki ana amacın yağ grefti rezorbsiyon sorununu azaltmak ve uygulanan yağ dokusunun daha kalıcı hale gelmesini sağlamak olduğu söylenebilir.

2.2.2. Yağ grefti elde edilme, hazırlanma ve uygulama yöntemleri

Yağ greftinin elde edilmesi için kullanılacak birçok verici alan mevcuttur. Bunların başında; karın ön duvarı, uyluklar, kalça, diz içleri ve flank bölgesi gelmektedir. Femoral ve gluteal alandan alınan yağ dokusunda, karın ön duvarından alınan yağa göre, daha büyük hücre hacimleri ve daha fazla adipogenik aktivite görülmüştür. Yüz bölgesinde bulunan küçük hacimli yağ hücrelerinde, neredeyse hiç adipogenik aktivite olmadığı tespit edilmiştir. (Hudson, Lambert, & Bloch, 1990). Verici saha seçiminde, uygulanılacak olan alıcı alan da belirleyici olabilir. Örneğin alt göz kapağı bölgesine yağ enjeksiyonu yapılması durumunda; daha az fibrotik, daha esnek ve daha küçük hücre grupları içeren bir alan olarak diz içi bölgesi daha uygun bir tercih olacaktır (Trepsat, 2003). Ancak verici alanların yağ grefti sağ kalımı açısından birbirine bir üstünlüklerinin olmadığı da ayrıca literatürde bildirilmiştir (Rohrich, Sorokin, & Brown, 2004). Bir çok uygulayıcı, yağ grefti işleminde ulaşım kolaylığı nedeni ile, karın ve uyluk iç bölgesini alıcı alan olarak tercih etmektedir.

Yağ greftinin sağ kalımı; greftin elde edilmesi, alınan yağ grefti üzerinde yapılan işlemler ve enjeksiyon sırasındaki tekniklere göre değişkenlik gösterir. Daha az travmatik bir metodla uygulanan yağ greftinin sağ kalımının daha fazla olduğu literatürde bildirilmiştir (Pu, Coleman, Cui, Ferguson Jr, & Vasconez, 2008).

Yağ grefti elde edilmesinde kullanılan ana teknikler olarak; vakum veya şırınga ile aspirasyon ve yağ dokusunun bütünü ile cerrahi eksizyonu sayılabilir (Kakagia & Pallua, 2014). Coleman, 3 mm'lik künt uçlu ve 2 delikli kanülü 10 cc'lik enjektöre bağlayarak elle yağ alma yöntemini, adipositlerde minimal travma yaratacağını savunarak önermiştir (Coleman, 1997). Coleman'dan sonra çeşitli modifikasyonlar tariflense de tekniğin ana hatları aynı kalmış ve bu nedenle "Coleman tekniği" olarak literatüre geçmiştir. Almanya'da yapılan Ulusal Konsensus Toplantısı'nda yağ toplama işleminin düşük basınçta yapılması önerilmiştir (Rennekampff et al., 2010). Kanül çapı, kanüldeki delik sayısı, ve delik çapı, kanülün ucunun künt veya keskin oluşu ve uygulanan negatif basıncın şiddeti alınan yağ greftinin yaşayabilirliğini etkilemektedir. Hayvan modeli üzerinde yapılan bir çalışmada 6 mm'lik kanüller ile

alınan yağ greftlerindeki sağ kalımın daha küçük çaptaki kanüllere oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Erdim, Tezel, Numanoglu, & Sav, 2009).

Verici alanın hazırlık biçimleri ile ilgili ortak bir görüş bulunmamaktadır. Fournier ve Otteni tarafından tariflenen "kuru teknik" ile işlemin daha hızlı olması ve daha az doku harabiyeti amaçlanmışsa da büyük hacimli yağ alma işlemlerinde sıvı replasmanı yapılamaması önemli bir dezavantajdır (Fournier & Otteni, 1983). 1993 yılında Klein tarafından tanımlanan "tümesan" ya da "ıslak" teknikte, genel anestezi ihtiyacının azaldığı ve işlem sırasındaki kanama miktarının daha az olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu yöntem sayesinde hidro-diseksiyon sağlanmakta ve hedef yağ tabakası genişlediği için ağrı ve ekimoz azalmaktadır (J. A. Klein, 1993). Bu iki tekniğin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise yağ hücre sağkalımı üzerine birbirlerine anlamlı bir farkın bulunmadığı saptanmıştır (Agostini et al., 2012). Tümesan solüsyona eklenen lokal anesteziklerin adiposit yaşayabilirliği üzerine etkileri araştırılmış farklı çalışmalarda, farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada; yağ elde edilmesinden önce sadece lidokain içeren çözeltiler ile ön hazırlığın, herhangi bir ön hazırlık yapılmadan alınan yağ grefti ile aynı sağ kalım oranlarına sahip olduğu, lidokain içeren veya içermeyen adrenalinli solüsyonlar ile ön hazırlığın uzun dönemde yağ grefti sağ kalımını azaltabileceği ortaya konulmuştur (Sirinoglu, Yesiloglu, Kaya, Ercan, & Filinte, 2017). Dr. Coleman ise % 0.5'lik lidokain ve 1:80.000'lik epinefrin içeren solüsyon önermiş olup bu konuda da ortak bir karar bulunmamaktadır (Coleman, 1997).

Verici sahadan yağ grefti elde edilmesinin ardından, alıcı sahaya verilmeden önce yapılacak işlemler konusunda çeşitli görüşler mevcuttur. Toplanan yağ grefti materyalindeki kan, sıvılaşmış yağ ve lokal anestezik gibi sıvıların ayrıştırılması gerekmektedir. Alıcı alana verilmeden önce yağ dokularının serum fizyolojik veya ringer laktat solüsyonları ile yıkanmasının yağ hücrelerinin sağ kalımını artırdığına dair çalışmalar mevcuttur (Piasecki, Gutowski, Lahvis, & Moreno, 2007). Rose ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da santrifüj ve yıkamaya oranla, sedimantasyon yönteminde daha fazla yaşayabilir adiposit olduğu histolojik olarak gösterilmiştir. Diğer taraftan yıkama yönteminde inflamatuar hücreler de elimine edildiği için,

immün yanıt daha az olmaktadır ve greft yaşayabilirliği artmaktadır (Rose Jr et al., 2006). Dr. Coleman yaptığı çalışmalar sonucunda; yağ greftinin, 10 ml'lik steril enjektörler ile 3 dakika boyunca 3000 devir/ dakika santrifüj hızında santrifüj edilmesini ve orta katmanda (orta yoğunlukta olan kısım) oluşan canlı yağ hücrelerininin alıcı alana uygulanmasını önermektedir (Coleman, 1997; Coleman & Katzel, 2015).

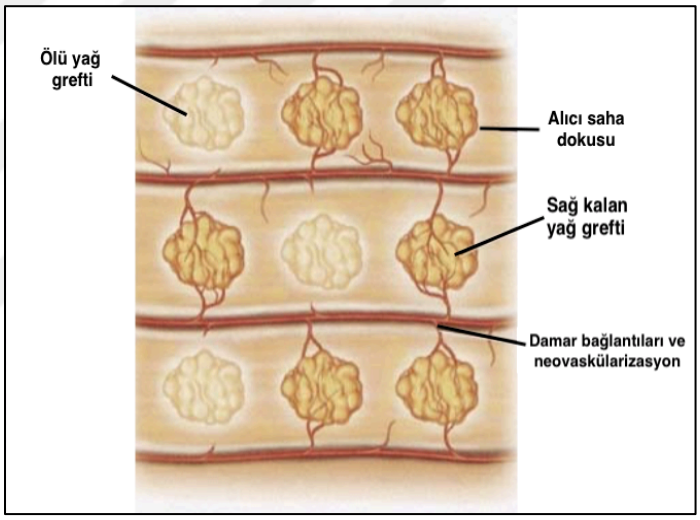
Alınan yağ greftinin alıcı sahaya enjeksiyon teknikleri açısından da literatürde bir takım öneriler mevcuttur. Enjeksiyonda kullanılan kanülün delik genişliği ile alımı sırasında kullanılanın delik genişliğinin aynı olmasının, toplanan yağ lobüllerinin dirençle karşılaşmadan geçebileceği vurgulanmaktadır (Del Vecchio & Rohrich, 2012). Dr. Coleman ise 17 G'lık künt kanülü 1 cc'lik enjektörlere bağlayarak kullanmayı önermektedir (Coleman, 2001).

2.2.3. Yağ greftinde meydana gelen fizyolojik süreçler

Plastik cerrahlar tarafından yağ grefti uygulanım sıklığı artmış olsa da aktarılan yağ dokusunun sağ kalım mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. Sağ kalım üzerine 1950'li yılların başında Dr. Peer tarafından ortaya konulan 'hücre sağ kalım teorisi' halen geçerliliğini korumaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda yağ greftinde meydana gelen süreçler üzerine yeni konseptler ortaya konulmuştur. Bunlardan biri, Dr. Peer tarafından oluşturulan hücre sağ kalım teorisi üzerinde gelişme sağlayan çalışmalar iken diğeri adipoz kökenli kök hücrelerin yeni keşfine ve anlaşılmasına dayanmaktadır (Pu, 2016).

Peer'in hücre sağ kalım teorisi, *in vivo* transplantasyon sonrası yağ greftinin nasıl hayatta kaldığı konusunda temel anlayışı oluşturmuştur. Carpaneda ve Ribeiro' nun çalışmasında; yağ grefti uygulanmasından sonra alıcı bölgedeki vaskülarize doku etrafında sadece 2 mm'lik alandaki yağ dokusunun, plasmatik imbibisyon yoluyla hayatta kalabildiği ortaya konulmuştur (Carpaneda & Ribeiro, 1994). Bu nedenle, yağ greft enjeksiyon tekniği, daha az travmatik olmalı ve her enjeksiyon sırasında sadece

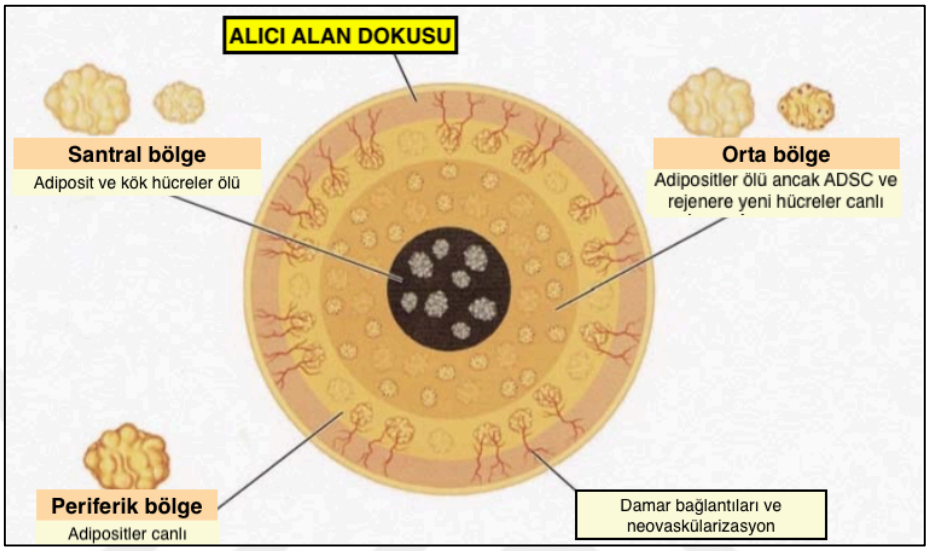
az miktarda yağ grefti yerleştirilmelidir. Ayrıca yağ dokusu değişik planlarda ve çoklu enjeksiyonlar ile yapılmalıdır. Bu sayede, yağ greftlerinin alıcı sahada daha fazla temas alanına sahip olabileceği ve yeniden damar oluşum olanağının artacağı savunulmuştur. Yazarlar, aktarılan yağ dokusunun alıcı sahadaki yeni oluşan damarlar sonucu ile hayatta kalabileceği sonucuna varmışlardır (Carpaneda & Ribeiro, 1994). Çalışmanın kendisi, transplantasyondan sonra yağ greftlerinin alıcı alandaki revaskülarizasyon sonrası hayatta kalabildiğine dair ikna edici kanıtlar sunmaktadır (Şekil 3). Greft sağ kalım teorisi, bu deneysel çalışmaya dayanarak daha da ileriye taşınmıştır. Ancak bu teori, klinik olarak gözlemlenen yağ greftinin tüm etkilerini açıklamakta yeterli olamamıştır ve sağ kalımda farklı mekanizmaların da olası olduğu düşünülmüştür.



Şekil 3. Greft sağ kalım teorisinin şematik açıklaması. *(Mechanisms of fat graft survival. Annals of plastic surgery,2016, Pu. Değiştirilerek kullanılmıştır.).*

Nonvaskülarize yağ grefti sonrası adipositlerde gerçeklen değişiklikler, Tokyo Üniversitesi' nde Dr. Yoshimura ve arkadaşları tarafından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Yazarlar, aktarılan canlı adiposit dokuların uzun süre hayatta kalacağı fikrine karşı olarak bir hayvan modeli üzerine çalışmalar yapmıştır. Farelerde yapılan bir çalışmada inguinal yağ yastıkçıkları üzerine iskemi modeli oluşturarak adiposit sağ kalımı incelenmiştir. Ağır iskemi altında tüm adipositlerin dejeneratif değişikliklere ve daha sonra adaptif olarak yeniden şekillenmeye uğradığı saptanmıştır. Yağ yastıkçığı içindeki adipositlerin iskemik koşullar altında kolaylıkla öldüğü, adipoz kökenli kök veya progenitör hücrelerin iskemik koşullar altında yaşayabildiği ve bu

hücrelerin aktive olup doku onarımına katkı sağladığı belirtilmiştir. Sonuç olarak yazarlar; yağ greftlemesinin adipoz kökenli kök veya progenitör hücreler ile karışımının, iskemi altındaki adipoz dokudaki onarım sürecini hızlandırdığı savunulan 'greft replasman teorisini' ortaya koymuşlardır (Suga et al., 2010).



Şekil 4. Greft sağ kalım teorisi ve greft replasman teorisinin birlikte olarak şematik açıklaması *(Mechanisms of fat graft survival. Annals of plastic surgery,2016, Pu. Değiştirilerek kullanılmıştır.)*.

Bir başka çalışmada yine aynı yazarlar, adipositlerin erken ölümüne ve adipositlerin, adipoz türevi kök hücreler ile (aktivasyon ve rejenerasyonu yoluyla) replasmanına dair kanıtlar göstermiştir (Eto et al., 2012). Bu örnek çalışmada, greft içindeki adipositlerin çoğunun birinci günde ölmeye başladığı ve doku kenarı 300 μm çevresinde bulunan adipositlerin hayatta kaldığı gösterilmiştir. Prolifere olan hücrelerin sayısının 3. günden sonra arttığı, canlı adiposit sayısındaki artışın ise 7. günde olduğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak, ölü adipositlerin onarım ve rejenerasyon sürecinin 3. ve 7. gün arasında olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada yağ greftleri, periferden merkeze doğru üç alanda değerlendirilmiştir; sağ kalım alanı (adipositlerin hayatta kaldığı alan), rejenerasyon alanı (adipositlerin ölüp kök hücrelerin hayatta kaldığı alan) ve nekroz alanı (hem adipositlerin hem kök hücrelerin öldüğü alan). Bu çalışma, yağ greftlemesinden sonra yağ dokusunun dinamik yeniden modellenmesi hakkında ikna edici kanıtlar sunmuştur. Kısmi iskemik

koşullarda adipositlerin sadece küçük bir kısmının hayatta kaldığı, rejeneratif alandaki çoğu adipositlerin ise, ADSC' lerin aktivasyonu ile hayatta kaldığı belirtilmiştir (Şekil 4).

Adipojenez; adipoz kökenli kök ve progenitör hücrelerin aktiflenmesi ile başlar ve 3 ay sonra biter. Kalan lipid damlacıkları (ölü adipositler) ise sonraki 9 ay boyunca absorbe edilir. Ölü adipositlerin bir kısmı, ilk 3 ay içinde yeni nesil adipositler ile yer değiştirirken, diğerleri ise nekroza gitmektedir. Lipit damlacıkları, makrofajlar tarafından fagosite edilip absorbe edilir ancak bu süreç çok yavaş ilerler ve lipid damlacıklarının çapına bağlıdır. Lipit damlacık çapı büyük olduğunda, absorbsiyon öncesinde lipid damlacığında kist duvarı oluşur, zamanla bu kist duvarı kalsifiye olur. Greftin merkez zonunda, adipoz türevi kök veya progenitör hücreler bile ölmektedir ve burada yeni adipositler üretilmez, bu da skar dokusu veya kist oluşumu ile sonuçlanır. Yağ grefti işleminde son hacim retansiyonu, başarılı bir şekilde yer değiştirilen adipositlerin oranına göre belirlenmektedir.

Özetlemek gerekirse; aktarım sonrası yağ greftlerin sağ kalımı, 'greft replasman teorisi' ve 'greft sağkalım teorisi' ile açıklanabilir. Ancak greft replasman ve sağkalım teorisinin hayvan modeli veya klinik çalışmalar ile daha ileri düzeyde araştırılması gerektiği savunulmaktadır (Pu, 2016).

2.2.4. Yağ grefti ve hayvan modelleri

Genel kural olarak insanlar üzerinde klinik araştırmalara başlamadan önce, klinik öncesi hayvan modeli çalışmaları tamamlanmalıdır. İdeal olarak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan yöntemler tutarlı ve karşılaştırmalı olmalıdır. Yağ grefti hayvan modellerindeki değişkenlikler sebebi ile sonuçların insanlarda karşılaştırması, ilişkilendirmesi ve değerlendirmesi zorlaşır. Yağ grefti ile ilgili olarak, standartlaştırılmış evrensel modeller tam olarak oluşturulamamıştır.

Kemirgenler; yaygın soy yapısı, geniş hastalık modelleri ve takip kolaylığı nedeniyle büyük ölçüde yağ greftleri araştırmalarında en çok kullanılan modeldir.

Kemirgen cildinin, insanlarla bazı fizyolojik benzerlikler gözlenmesine rağmen; epidermis ve dermis kalınlığındaki farklılık, hipodermis ile subkutan bölge arasındaki pannikulosus karinosus kasının varlığı ile temel histolojik farklılıklar bulunmaktadır (Benavides, Oberyszyn, VanBuskirk, Reeve, & Kusewitt, 2009). Kemirgenlerin ince deri tabakaları nedeniyle, greftler kaçınılmaz olarak pannikulus karnosus kası ile iskelet kası arasındaki derin bir düzlemde depolanır. Bu düzlemin tek bir ünite haline gelmesine neden olur ve greftler depolandıktan sonra kastan ayrılması ile greftin uygun yerde kalması veya şeklini koruması zorlaşır.

Sıçanlar, anterior ve posterior olarak yerleştirilmiş iki ana cilt altı yağ yastıkçığına sahiptir. Skapulalar alt çizgi arasından aksillaya inen 'anterior yağ yastıkçığı' bulunurken, 'posterior yağ yastıkçığı (inguinal yağ yastıkçığı)' dorsolumbar bölgeden gluteal bölgeye doğru yayılır. İnguinal yağ yastıkçığının damarlanması, femoral damarlardan köken alan epigastrik arter ve ven ile olmaktadır (Chusyd, Wang, Huffman, & Nagy, 2016).

Dr. Lujan-Hernandez ve arkadaşlarının yaptığı yağ greftleri üzerindeki hayvan modelleri meta-analiz çalışmasında, en sık kullanılan hayvanın fare (%56) ve sıçan (%20) olduğu, ayrıca tavşan, domuz ve köpek gibi hayvan modellerinin de çalışmalarda kullanıldığı belirtilmiştir. (Lujan-Hernandez, Appasani, Sullivan, Siegel-Reamer, & Lalikos, 2017)

Lujan-Hernandez ve ark.'larının yaptığı bu çalışmada, yağ greftlerinde en sık kullanılan alıcı alanın subkutan dorsal sahanın (%51) olduğu, ikinci en sık ise %28 oranı ile skalp bölgesi olduğu saptanmıştır. Literatürde diğer kullanılan alıcı alanların ise; intraabdominal ve baş-boyun bölgesi (yanak, kulak, boyun) olduğu belirtilmiştir. Yağ grefti uygulanımı sonrası hayvan modellerindeki takip süresinin ise 1 ile 52 hafta arasında değiştiği gözlenmiştir. Çalışmalarda en sık takip süresinin %15 oranı ile 4 hafta olduğu, ikinci en sık olarak %11 oranı ile 8 haftanın olduğu saptanmıştır (Lujan-Hernandez et al., 2017).

2.2.5. Yağ greftinin klinik uygulamaları

Yağ grefti transferinde kullanılan yağ enjeksiyon tekniği, '*liposuction*' adı verilen yağ alma işleminin tanımlanmasından hemen sonra uygulanmaya başlanmıştır. Yağ greftleri birçok doku onarımında yaygın olarak kullanılmakta olup estetik ve rekonstrüktif amaçlı meme ameliyatları en önemli uygulama alanıdır (Gutowski & Force, 2009). Endikasyonlar arasında; meme küçüklüğü, meme büyütme operasyonu sonrasında implantın çıkarıldığı veya çıkarılmadığı durumlarda oluşan deformiteler, tüberöz meme hastaları, Poland sendromlu hastalar, lumpektomi veya mastektomi sonrası oluşan deformiteler, radyoterapi sonrası oluşan cilt bozuklukları ve meme ucu deformiteleri sayılabilir (Bernard & Beran, 2003; Hang-Fu, Marmolya, & Feiglin, 1995; Yoshimura et al., 2008).

Yüzde dolgunluğunu sağlama ve yüzdeki deformitelerin düzeltilmesi, yağ greftlerinin bir başka kullanım alanıdır. Bu bölgede; rinoplasti operasyonuna ek olarak (Cárdenas & Carvajal, 2007), yüz kontürünün sağlanması (Hu et al., 2007) ve yüzdeki dokulara hacim kazandırmak için (Cortese, Savastano, & Felicetta, 2000), ayrıca malar bukkal ve dudak dolgunluğunu artırmak için (Guyuron & Majzoub, 2007) yağ enjeksiyonu kullanılmaktadır. Tüm bunlara ek olarak yağ greftleri; gluteal augmentasyonda (Roberts III, Toledo, & Badin, 2001), kontür deformitelerinin düzeltilmesinde (Restrepo & Ahmed, 2002) ve el rejuvenasyonu amacı ile (Coleman & Carraway, 2002) geniş bir klinik yelpazede kullanımı bildirilmiştir.

Yağ dokusunun sadece adiposit içermediği aynı zamanda adipoz türevi kök hücreleri (ADSC), endotelyal hücreleri ve progenitör hücre dizilerini içerdiğinin keşfi ile yağ greftleri, yeni potasiyel kullanım alanı olarak rejeneratif tıpta da kullanım potansiyeli olduğu belirtilmektedir (Neligan & Warren, 2012).

2.2.6. Yağ grefti sağ kalımını artırmaya yönelik işlemler

Literatürde sağ kalımı artırmaya yönelik olarak yağ greftleri; epidermal büyüme faktörü (EGF) (Park et al., 2011), trombositten zenginleştirilmiş plazma (K. Li et al., 2017; Serra-Mestre et al., 2014), fibrin yapıştırıcı (Karaçal et al., 2007), alıcı alandaki vaskülarizasyonu da artırmak amacı ile vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) (L. Li et al., 2014), adipoz kökenli kök hücre (Xiong et al., 2018) ve botulinum toksin (Baek et al., 2012) ile birlikte verilmiştir. Bu çalışmalarda anlamlı sonuçlar bulunsa da pratik uygulamalarda genel olarak kabul görmüş bir yaklaşım bulunmamaktadır.

Aktarılan alandaki damarlanmayı ve yağ hücresi sağ kalımını artırma amacı ile vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile işlenmiş adipoz kök hücrelerin yağ greftlerinde kullanımı ile ilgili literatürde yayınlar mevcuttur (Lu et al., 2009). *In vivo* anjiyogenezi artırmak amacı ile diğer anjiyogenetik büyüme faktörlerin (bFGF,bazik fibroblast büyüme faktör ve PDGF,trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi) kullanımının yağ grefti sağ kalımını artırmada anlamlı olduğu saptanmıştır (Lu et al., 2009). İskemik dokularda lokal olarak salgılanan faktörlerin uyarılmasında ve doku damarlanmasını artırmada önemli bir rolü olduğu düşünülen endotelyal progenitör hücrelerin (EPC), yağ grefti ile birlikte kullanımı yine sağ kalımı ve damarlanmayı artırdığı tespit edilmiştir (Hunting, Noort, & Zwaginga, 2005).

Yoshimura ve arkadaşlarının kök hücre çalışmalarından köken alarak yaptıkları bir çalışmada, hücre destekli lipotransfer (cell-assisted lipotransfer (CAL)) adı verilen kozmetik meme büyütme işlemi için pratik bir yaklaşım sunmuştur. Bildirilen bu çalışmada; adipoz kökenli kök ve stromal hücreler (ASC'ler), stromal vasküler fraksiyondan izole edilip lipoaspirat ile alınan yağ ile karıştırılmıştır. ASC'ler olgun adipositlerden çok daha anjiyogenik ve potent olduğundan, lipoaspirat ile elde edilen yağ dokusu ASC'lerin çoğalmaları için bir iskele *(skafold)* konumunu aldığı ve yağ grefti sağ kalımını anjiogenez üzerinden artırdığı klinik olarak da bu çalışmada gösterilmiştir (Yoshimura et al., 2008).

Diğer bir önemli yaklaşım olan ‘doku mühendisliği’ *de novo* adipogenez yoluyla adipoz doku rejenerasyonu için daha uygun bir alternatif olabilir. Özellikle, büyük bir adipoz defekti onarma amacı ile, ASC'ler veya adipoz progenitör hücreler gibi kök hücreler üç boyutlu bir iskele *(skafold)* üzerine ekilebilir ve adipogenez için in vivo olarak bu alana implante edilebilir. Bu yaklaşımın avantajı; VEGF veya bFGF gibi anjiyojenik büyüme faktörlerinin ekimi ile endotelyal progenitör hücrelerin ya da endotel hücrelerinin stromal hücreler ile karıştırılmasıdır. Bunlara ek olarak; kök hücrelerinin implantasyonu, de novo adipojenik süreç sırasında anjiyogenez ve vaskülarizasyon için indüklenmiş olan, tam doku hacmini ve işlevini sağlayan tamamen vaskülarize bir yağ dokusu geliştirecektir. Ayrıca implante edilmiş stromal hücreler veya adipoz progenitör hücreler, kendi kendini yenileme işlevleriyle, kendi kendini onarma veya rejenerasyon olanağı da sağlar (Tanzi & Farè, 2009).

2.3. Botulinum Toksin

Botulinum toksinin tarihçesi 19. yüzyıla kadar uzanmaktadır. Botulizm ilk olarak 1820 yılında J. Kerner'in, sosis zehirlenmesine bağlı olabileceğini düşündüğü 76 hastanın semptomlarına dayanarak yaptığı bir çalışmada ortaya konulmuştur. İki yıl sonrasında yaptığı bir başka çalışmada ise toksinin otonom sinir sistemi üzerinden etki ederek paralizi durumunun oluştuğunu fark edip toksinin tedavi amacı ile kullanabileceğini öne sürmüştür (Scott, 2004).

Etken mikroorganizmanın keşfi ve toksinin izole edilmesi ise 75 yıl sonra Emile Pierrevan tarafından yapılmış olup latincede sosis anlamına gelen 'botulus' kelimesininden yol alarak etken bakteriye 'Bacillus botulinus' adı verilmiştir (Erbguth, 2008).

Dr. Herman Sommer, 1920 yılında botulinum toksin A (BTx-A)' yı izole etmiştir (Snipe & Sommer, 1928). Dr. V. Brooks ise BTx-A'nın kas-sinir bileşkesinde asetilkolin salınımını engelleyip hedef kasta felç etkisi yarattığını göstermiştir (Brooks, 1964).

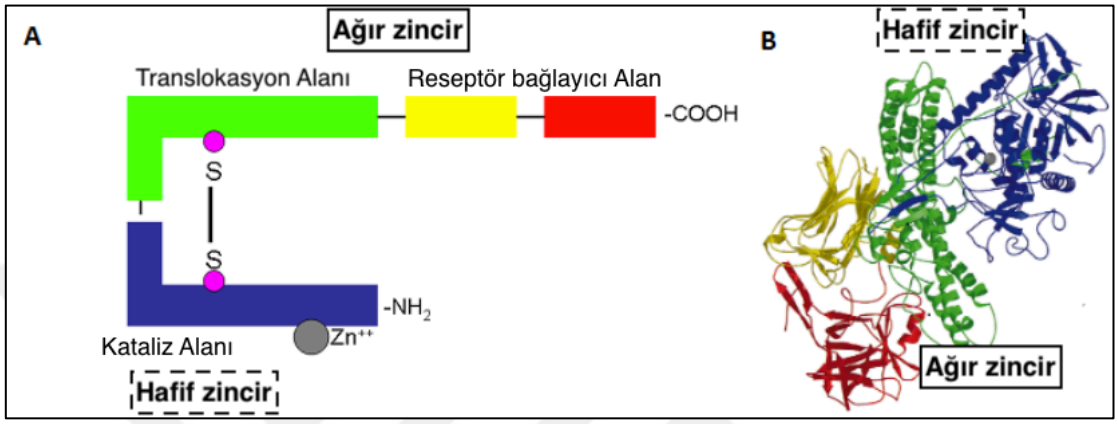
Yirminci yüzyılın sonlarına doğru ise Dr.Scott, toksini strabismus tedavisi için hayvan deneylerinde kullanıp, gönüllü insan deneklerine kullanım açısından A.B.D'de FDA *(Food and Drug Administration)* onayını almıştır (Scott, 2004). Bu kurum; botulinum toksinin, 2000 yılında servikal distoni ve 2002 yılında alın bölgesine kozmetik amaçlı kullanıma izin vermiştir.

2.3.1. Botulinum toksinin farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri

Clostridium botulinum; spor üreten, gram-pozitif, zorunlu anaerob bir bakteridir. Bu bakterinin ürettiği botulinum toksininin; A, B, C_1, D, E, F ve G olarak isimlendirilen 7 farklı serotipi bulunmaktadır.

Bu toksin 150 kDa ağırlığında olup tek zincir yapıda bir protein olarak sentezlenir ve yapısını korumak için toksik olmayan proteinlerle bileşik şekilde

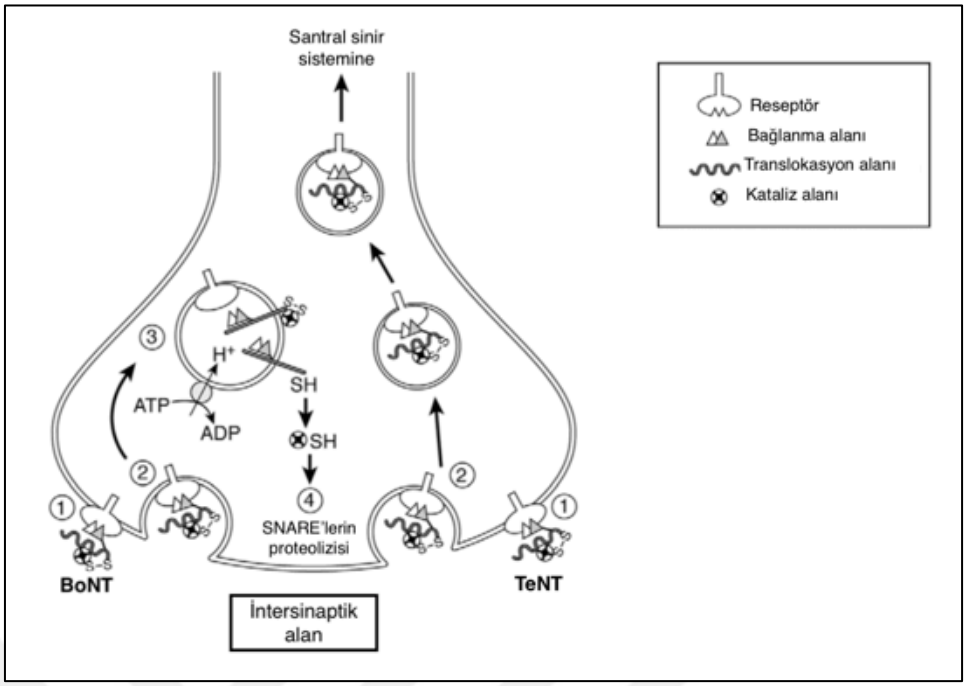
bulunur (Hanson & Stevens, 2002). Proteinin parçalanması ile toksin, 50 kDa hafif zincir ve 100 kDa ağır zincirden oluşan iki zincirli aktif formuna dönüşür. Toksinin aktif olan çift zincirli formu işlevsel önemi olan 50 kDa'lık üç parçadan oluşur (Şekil 5). Bu parçalar özellikle kataliz, bağlanma ve translokasyon basamaklarında önemli rol oynar (Montecucco & Schiavo, 1995).



Şekil 5. Botulinum toksinin şematik yapısı. **(a)** BTx-A'nın şematik görüntüsü. **(b)** kristal yapısı. Her iki şekildeki renk kodları aynı yapılar için kullanılmıştır. *(Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity, Nature Structural Biology 1998, D. Lacy. Değiştirilerek kullanılmıştır.)*.

Botulinum toksin etkisini presinaptik kas sinir bileşkesinde asetilkolin salınımını engelleyerek gösterir. Bu etkisini gösterebilmesi için toksinin şu aşamalardan geçmesi gerekir: bağlanma, içeri alınma ve presinaptik kas-sinir bileşkesinde nörotransmitter salınımının engellenmesi (Şekil 6).

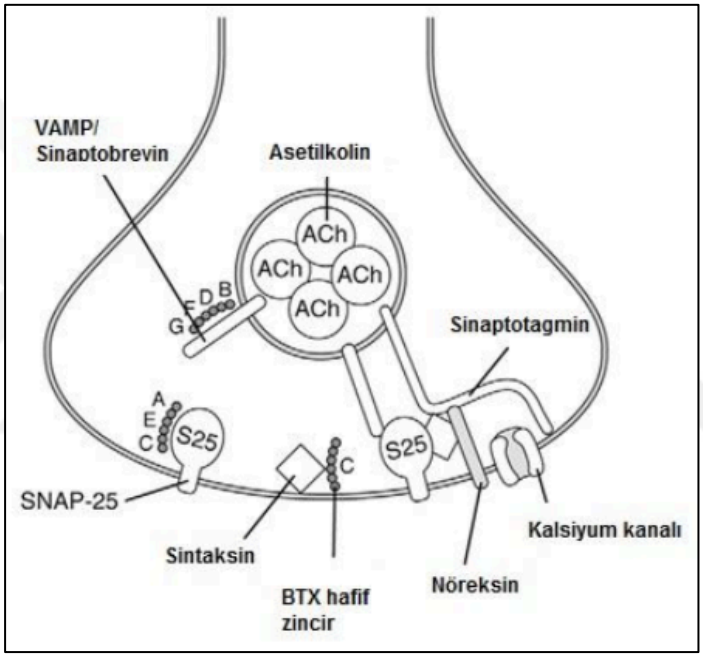
BT'nin ağır zincir kısmı (100 kDa), toksinin presinaptik reseptöre bağlanmasını sağlar. Ardından nörotoksin endositoz ile içeri alınır. Toksin vezikülün içine alındıktan sonra hafif zincir (50 dDa) yapısı vezikül duvarından geçerek nörotransmitter salınımının engellenmesinde görev almaya başlar. Hafif zincir çinko bağımlı bir proteaz olup, asetilkolinin presinaptik zara bağlanmasını sağlayan proteinlerden birini ayırır. Bunun sonucunda asetilkolin salınımını engeller (Black & Dolly, 1986). Sinirin toksine bağlanması seçici bir olaydır ve doyma prensibiyle çalışır. Toksinin etkisini gösterebilmesi için motor son plağa ulaşması gerekir.



Şekil 6. Botulinum toksinin etki mekanizması. Botulinum toksini (BoNT), presinaptik nöromüsküler bileşkede asetilkolin salınımını bloke ederek periferal sinir sistemine lokal olarak etki eder. Tetanoz toksini (TeNT), aynı presinaptik nöromüsküler alandan girer ve geriye doğru santral sinir sistemine ilerleyerek spinal korddaki internöronlardan glisin ve γ -aminobutirik asit salınımını engelleyerek etki eder (*The basic science of botulinum toxin. Facial Plast Surg Clin North, Lam 2003. Değiştirilerek kullanılmıştır.).*

Fizyolojik olarak presinaptik veziküllerde depolanan asetilkolin, sinaptik boşluğa salınmadan önce sinir membranı ile birleşir ve ekzositoz ile salınır. Asetilkolinin dışarı salınımında Ca iyonu büyük rol oynar. Hücre iskeletinde sinaptik veziküle bağlanan Sinapsin I' nın Ca bağımlı fosforilasyonu, presinaptik vezikülün hareket ederek presinaptik zara bağlanmasına yol açar (Hutson, Collins, East, & Thompson, 1994). Sinaptobrevin ve presinaptik membranda bulunan sintaksin ise sinaptik vezikül üzerindeki her iki zarın birbirine tutunmasını sağlar (Dertzbaugh & West, 1996). SNAP- 25, presinaptik zar üzerinde bulunur ve sintaksin proteinini bağlayarak bir kompleks oluşturur. Sinaptobrevin, bu komplekse sintaksin yerine bağlanarak vezikülün birleşmesini ve sinaptik boşluğa salınması için gereken konumu almasını sağlar. Botulinum toksin, veziküllerde depolanan ve salınımı için düzgün çalışması gereken protein yapıdaki bu reseptörler üzerinden etki gösterir (Brin, 1997).

Değinilmesi gereken bir başka önemli nokta ise hafif zincirin, endozom zarı ile presinaptik zarın birleşmesinden sorumlu olan SNARE (soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachement proteine receptor) proteinlerine bağlanmasıdır (Pellizzari, Rossetto, Schiavo, & Montecucco, 1999). SNARE protein kompleksi üç temel yapıdan meydana gelmektedir. Bunlar veziküllerdeki sinaptobrevin (VAMP = Vesicle-associated membrane protein) ile hücre membranlarındaki SNAP-25 (25kd synaptosome associated protein) ve sintaksin'dir. Botulinum toksinin her bir alt tipi farklı proteini ayırmaktadır. Botulinum toksin serotip A, C ve E, SNAP-25'i ayırır (Şekil 7).



Şekil 7. Botulinum toksinin her bir alt tipi farklı proteinler üzerinden etki gösterir (*The basic science of botulinum toxin. Facial Plast Surg Clin North, Lam 2003. Değiştirilerek kullanılmıştır.)*.

Serotip A, Botox® (Allergan, Irvine, Kaliforniya) ve Dysport® (Ipsen Ltd, Slough, Berkshire, UK) isimli markalar şeklinde piyasada bulunur. Dysport®'un bir flakonunda 500 MU, Botox®'un bir flakonunda ise 100 Ünite toksin bulunmaktadır. Bu iki ürünün etkilerini karşılaştırmak gerekirse 1 Ü Botox® yaklaşık olarak 3-4 Ü Dysport®'a denk gelmektedir (Pickett & Hambleton, 1994).

Sonuç olarak; botulinum toksin, presinaptik alanda bulunan veziküller üzerindeki protein yapılı reseptörlere bağlanarak, vezikülün sinaptik zarla birleşmesini ve dışarı salınımını engeller. Sinaptik iletinin engellenmesiyle birlikte uyarılan kasta zayıflama ve atrofi oluşur. Fonksiyonun geri dönmesi ancak belirli süre sonrasında olur ve bu süreç yeni sinapsların oluşmasına bağlıdır (Münchau & Bhatia, 2000).

2.3.2. Botulinum toksinin kullanım alanları ve yan etkileri

Son yıllarda botulinum toksin oldukça geniş yelpazede klinik kullanım alanı bulmaktadır. Kullanım endikasyonları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Lokalize kas spazmı ve ağrıları
- Şaşılık tedavisi
- Fokal distonik durumlar: Servikal distoni, trunkal distoni, blefarospazm, ekstremite distonisi, oro-mandibular distoni, distonik tremor, larengeal distoni
- Spastisite tedavisi: İnme, travmatik beyin hasarı, spinal kord hasarı, serebral palsi, multipl skleroz, herediter spastik paraparezi
- İstemsiz kas aktivitesinin eşllik ettiği distoni dışındaki hastalıklar: Hemifasyal spazm, tremor, tikler, sinkinezi, miyoklonus, diş sıkma ve ağız açamama, nistagmus.
- Düz kas hiperaktivite bozuklukları: Akalazya, Hirschspung hastalığı, kronik anal fissürler, detrüsor-sfinkter uyumsuzluğu
- Kozmetik amaçlar: Hiperkinetik yüz çizgileri
- Terleme bozuklukları: Aksiller ve palmar hiperhidroz, Frey sendromu
- Diğer durumlar: Sialore, anismus, vaginusmus (Brin, Hallett, & Jankovic, 2002; Jost & Kohl, 2001).
- Kronik migren tedavisi (2010 yılında FDA onayı sonrası bu endikasyon için de botulinum toksin kullanılmaya başlanmıştır) (Janis, 2014).

Botulinum toksinin yan etkileri az olmakla birlikte kullanım sonrası anafilaksi durumu bildirilmemiştir. Görülebilecek yan etkiler ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Kas güçsüzlüğü: Uygulama yaplan kaslara veya komşuluğundaki kaslara bağlı olarak
- Komşu anatomik yapıların etkilenmesine bağlı yan etkiler: Disfaji (servikal distonide), punktat keratit, korneal ülserasyon, pitoz, diplopi, blefarospazm
- Bölgesel yan etkiler: Ağrı, lokal hematom, ağız kuruluğu, ses kısıklığı
- Diğer yan etkiler: Kaşıntı, döküntü, nezle benzeri semptomlar, brakial pleksopati (Contarino et al., 2017; Dutton & Buckley, 1988; Huang, Foster, & Rogachefsky, 2000; A. W. Klein, 2001; Swartling, Färnstrand, Abt, Stålberg, & Naver, 2001).

Uygulamalarda en sık rastlanan sorunlardan biri, tekrarlayan uygulamalarda botulinum toksine karşı direnç gelişimidir. Bu direnç toksine karşı nötralizan antikorların oluşması nedeniyle oluşmaktadır ve sıklığı literatürde %3 ile %17 arasında bildirilmiştir (Greene, Fahn, & Diamond, 1994; Naumann, Boo, Ackerman, & Gallagher, 2013).

Emziren annelerde, gebelerde, toksine ve insan albuminine karşı hipersensitivitesi olanlarda, Myastenia Gravis ve Eaton-Lambert gibi nöromuskuler hastalığı olanlarda, aminoglikozid, kinin, siklosporin ve kalsiyum kanal blokeri gibi sinir-kas sistemini baskılayabilecek ilaç kullananlarda botulinum toksin kullanılmamalıdır (Huang et al., 2000; A. W. Klein, 2001; Matarasso, 1998).

2.3.3. Botulinum toksinin yağ grefti sağ kalımı üzerine etki mekanizması

Bazı klinisyenler yağ grefti uygulamalarından önce kullanılan botulinum toksin A uygulması ile daha optimal düzeyde estetik sonuçların olduğunu gözlemlediler.

Dr. Baek ve arkadaşlarının hayvan modeli üzerindeki araştırmasında, yağ greftinin alıcı alana verilmeden önce botulinum toksin A (BTx-A) ile karıştırılması sonucunda yağ greftlerinin ağırlık, hacim gibi parametrelerde artışın gerçekleştiğini ve hücresel bütünlüklerin daha fazla oranda korunmuş olduğunu saptadılar (Baek et al., 2012). Bu çalışmanın devamı niteliğinde Dr. Tang ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise BTx-A' nın, artmış vazodilatasyon ve endotel hücre proliferasyonunda rol oynayan CD31 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyon seviyelerini artırması sebebi ile sağ kalımı artırdığı sonucuna varılmıştır. (Tang et al., 2017).

Yine aynı yazarlar tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada ise, BTx- A'nın adipoz kökenli kök hücre proliferasyonunu, adipojenik farklılaşma kapasitesini ve anjiyogenezi düzenleyen CD31 ve VEGF gibi sitokinlerin düzeyini artırdığı, bu mekanizmalar ile yağ hücre sağ kalımına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Tang et al., 2017). Ancak alıcı veya verici alanın botulinum toksin ile ön koşullandırma uygulanması durumunda yağ grefti sağ kalım etkisini değerlendiren bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın temelindeki hipotez; literatürde bildirilen botulinum toksinin kas kasılmasını azaltıcı (Baek et al., 2012) ve damarlanma üzerine etki eden sitokinleri (VEGF gibi) artırıcı etkisinden yola çıkılarak (Tang et al., 2017), botulinum toksin ile ön koşullandırılmış alıcı ve verici alanlarda, yağ grefti sağ kalım etkisini değerlendirmektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Protokolü ve Deney Grupları

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (Protokol Kodu: 23.2018.mar, tarih: 5 Mart 2018) alınarak Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı ile Üsküdar Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

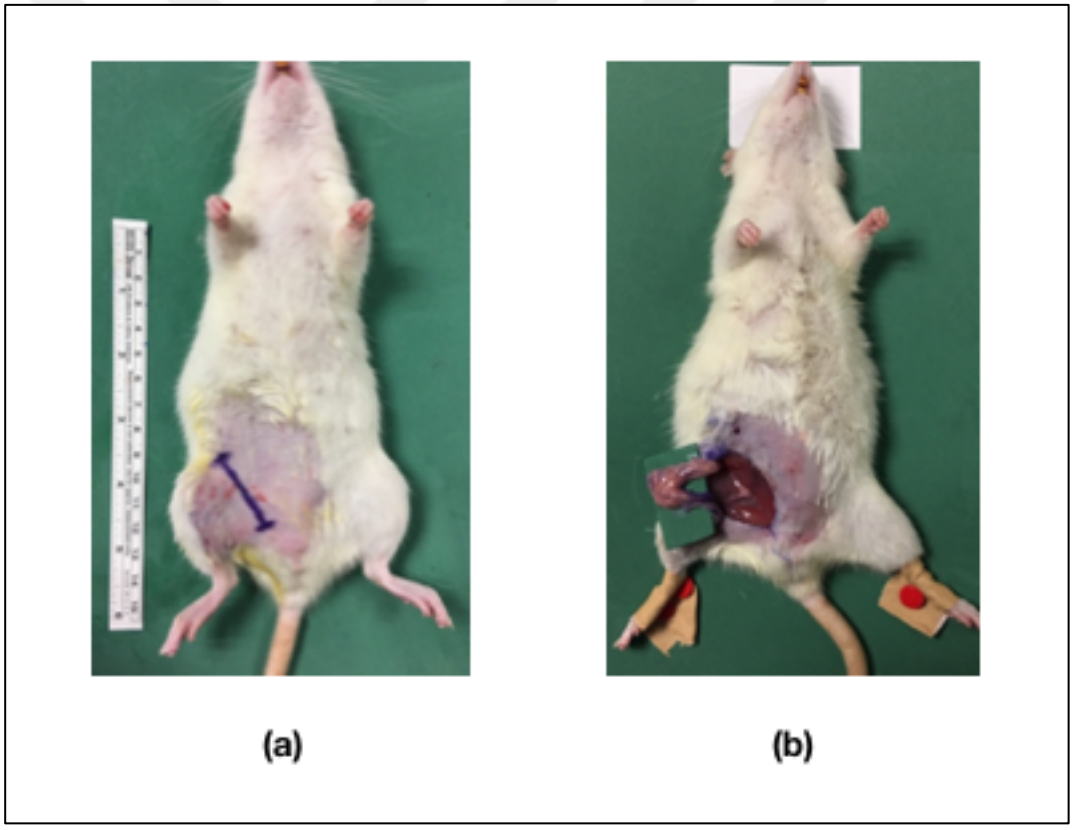
Çalışma çift kör randomize bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Çalışmada; kırk adet "Wistar Albino" cinsi dişi sıçanlar (ortalama ağırlıkları 226,67 gr, ortalama 152 günlük) her grupta sekiz adet sıçan olacak şekilde, toplamda 5 grup olarak düzenlenmiştir. Tüm gruplarda yağ grefti verici alanı olarak sağ inguinal yağ yastıkçığı ve alıcı alan olarak sıçan dorsal subkutan bölgesindeki interskapular alan kullanılmıştır.

Deney hayvanlarının tamamı standart fiziki şartların sağlandığı, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık, 20-21°C sıcaklığında tekli kafeslerde barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve musluk suyu verilerek düzenli olarak karşılandı.

Sıçanlar her işlem öncesi, 50 mg/kg ketamine (Ketalar® flakon Pfizer, Brooklyn, New York, USA) + 5 mg/kg xylazine (Rompun® flakon, Bayer, Leverkusen, Germany) sağ inguinal bölgede işlem uygulanacağından sol intra-peritoneal tarafa verilerek uyutuldu. Anestezi derinliği cilt ya da parmak kıstırma yanıtları ile değerlendirildi. Sıçanlara; sırt üstü pozisyonlarda el ve ayakları tespit edilerek işlemler uygulandı. Sekiz hafta takip süresi sonunda yağ greftleri materyalleri alındıktan sonra, tüm sıçanlar periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjekte edilerek sakrifiye edildi.

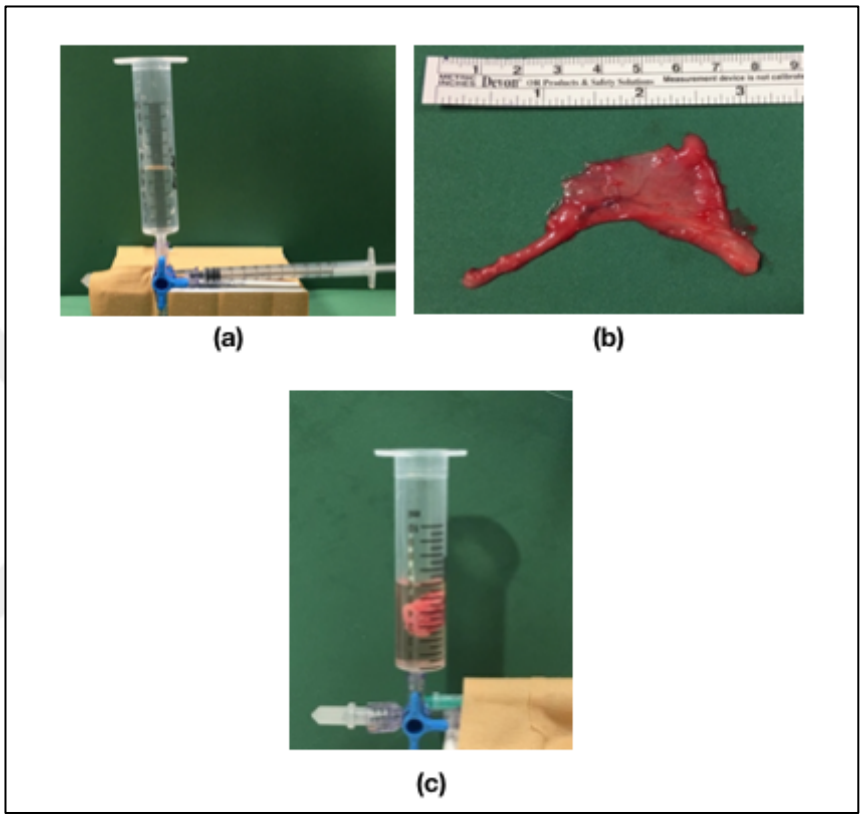
3.2. Cerrahi Yöntem

J.H. Piasecki ve arkadaşlarının yayınlamış olduğu model kılavuzluğunda yağ grefti hazırlama protokolü uygulandı. Sıçanların sağ inguinal bölgesi steril şartlarda hazırlandı. Sıçanlar öncelikle sırt üstü pozisyonda her iki kol ve bacaklarından tespit edildi. Uygun saha temizliği ve örtmeyi takiben kasık bölgesinde inguinal ligamana paralel olarak cilt kesisi yapıldı. Cilt kesisi sonrası cerrahi makas yardımı ile atravmatik teknik kullanılarak inguinal yağ yastıkçığına ulaşıldı ve çevre dokulardan ayrıştırıldı (Şekil 8). Yağ yastıkçığına giden epigastrik damarlar bağlandı ve çevre dokulardan cerrahi olarak ayrıştırılarak yağ grefti elde edildi (Piasecki et al., 2007).



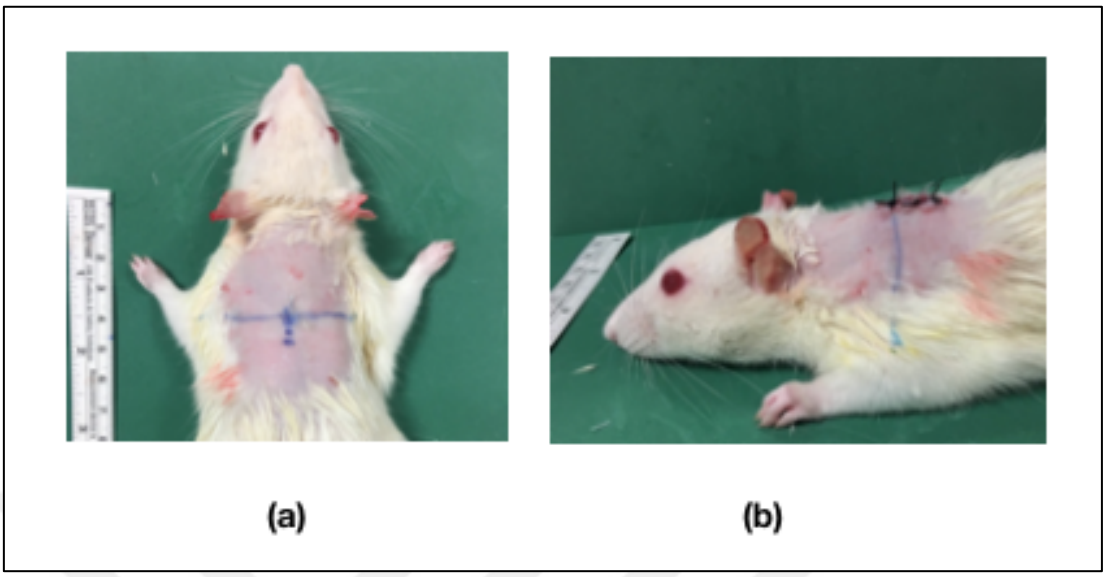
Şekil 8. (a) Sağ inguinal bölgede inguinal yağ yastıkçığına ulaşmak için yapılan işlem öncesi çizim **(b)** sağ inguinal yağ yastıkçığı.

Elde edilen yağ greft hacimleri, üzerinde herhangi bir işlem uygulanmadan önce su taşırma yöntemi ile Arşimed prensibine uygun olarak ölçüldü. Hacimler, dik duran ve içinde 5 mL distile su bulunan 10 mL' lik enjektörler ve daha net ölçüm için yere parallel olarak yerleştirilen 1 cc'lik enjektör ile kurulan düzenekte ölçüldü. Kasık bölgesinde açılan kesiler 4/0 emilemeyen dikiş ile dikildi (Şekil 9).



Şekil 9. (a) Yağ grefti hacminin ölçülmesi için Arşimed prensibine dayanan düzenek **(b)** alıcı alana yerleştirilmeden önceki yağ grefti **(c)** yağ grefti hacminin bu düzenekte ölçülmesi.

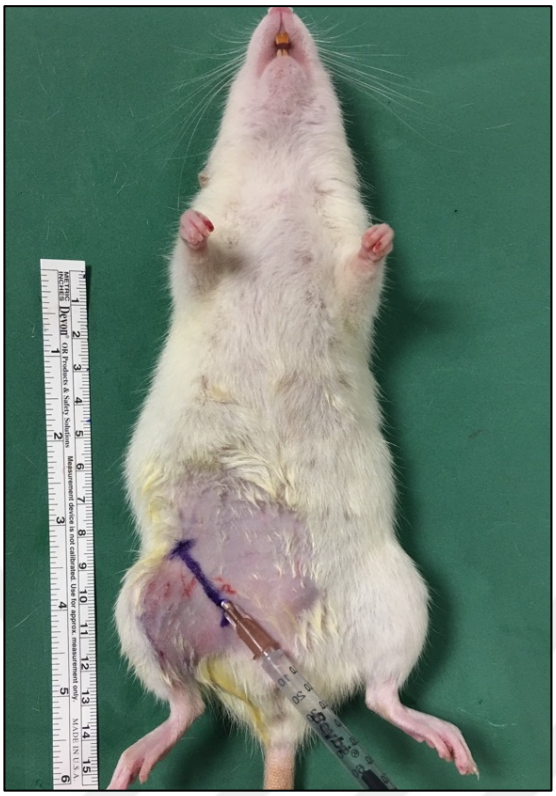
Kasık bölgesinin kapatılmasının ardından sıçanlar yüzüstü pozisyona alındı ve her iki kol açık halde iken tam orta düzlemde olacak şekilde interskapular alana 1.5 cm' lik vertikal kesi ile girildi. Bu bölgede cilt altı planda cep açıldı ve bu alanı standardize etmek amacı ile dairesel 1.5 cm' lik taslak her işlemde kullanıldı. Serum fizyolojik ile yıkanmış olan yağ greftleri tek parça halinde oluşturulan cep içerisine yerleştirildi. Kesi 4/0 emilemeyen dikiş ile dikildi (Şekil 10). Daha sonra sıçanların tekli kafeslerde uygun koşullarda bakım ve beslenmesi sağlandı.



Şekil 10. (a) Yağ grefti alıcı alan interskapular bölge çizimi **(b)** yağ greftinin alıcı alana yerleştirilmesi.

Enjeksiyon yöntemi olarak 2. ve 3. grupta sağ inguinal bölgeye, 4. ve 5. grupta dorsal interskapular alana 0,75 cc' lik enjeksiyonlar uygulanarak gruplardaki alıcı veya verici sahalar hazırlandı.

Dr. Kim ve arkadaşlarının çalışmasındaki, botulinum toksinin flep ön koşullandırmasında sağ kalımı artırmada ideal doz olarak belirtilen 1.5 Ü BTx-A dozu referans olarak alındı ve ikinci grup inguinal 1.5 Ü BTx-A (Botox® - Allergan) ve 4. grup dorsal 1.5 Ü BTx-A (Botox® - Allergan) enjeksiyon grubu olarak hazırlandı. Bu enjeksiyonlarda 1.5 Ü BTx-A, 0,75 cc serum fizyolojik içerisinde subkutan alana verildi (Şekil 11) (Kim et al., 2009). Üçüncü grupta inguinal bölgeye ve beşinci grupta dorsal bölgeye serum fizyolojik (salin) verilen grup olarak hazırlandı ve bu gruplarda enjeksiyon subkutan alana 0.75 cc serum fizyolojik olarak uygulandı.



Şekil 11. İkinci grupta (botulinum toksin A) ve üçüncü grupta (serum fizyolojik) 26 G iğne ile yapılan enjeksiyon yöntemi.

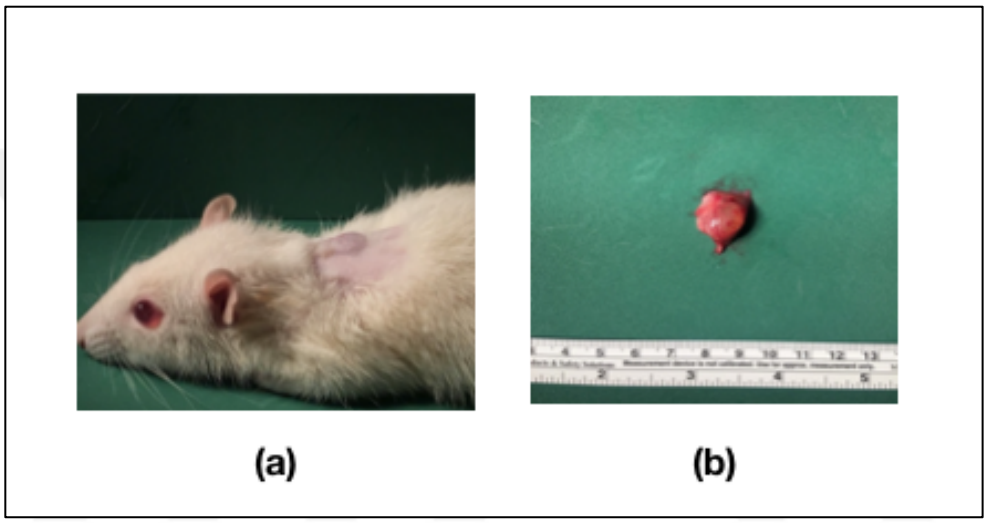
Özetlemek gerekirse kontrol grubunda (grup 1) yağ grefti, sağ inguinal bölgeye kesi ile girilip yağ yastıkçığı şeklinde alınmıştır. Verici alanın primer sütüre edilmesinin ardından, alınan yağ grefti serum fizyolojik ile yıkanıp, dorsal subkutan bölgeye kesi ile girilmiş ve burada standart olarak açılan alana yerleştirilmiştir.

İkinci grupta; sağ inguinal bölgeye 1.5 Ü (0,75 cc serum fizyolojik içerisinde) botulinium toksin A (BTx- A) enjeksiyonu uygulanıp, 7 gün sonra aynı işlem ile alınan yağ grefti dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilip alıcı alan emilemeyen dikiş ile dikilmiştir.

Üçüncü grupta; sağ inguinal bölgeye 0,75 cc serum fizyolojik enjeksiyonu uygulanıp, 7 gün sonra aynı işlem ile alınan yağ grefti dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilip alıcı alan aynı şekilde emilemeyen dikiş ile dikilmiştir.

Dördüncü grupta; dorsal subkutan bölgeye 1.5 Ü BTx- A (0,75 cc serum fizyolojik içerisinde) uygulanıp; yedi gün sonra, sağ inguinal bölgeden alınan yağ grefti ön koşullandırılan dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilmiştir.

Beşinci grupta ise; dorsal subkutan bölgeye 0.75 cc serum fizyolojik uygulanıp; 7 gün sonra, sağ inguinal bölgeden alınan yağ greftinin, daha önce enjeksiyon yapılan dorsal subkutan bölgeye aynı işlem ile yerleştirilmiştir.



Şekil 12. (a) Sekizinci haftanın sonunda alıcı alandaki yağ greftinin görünümü ve **(b)** yağ greftinin ileri inceleme için cerrahi olarak çıkarılması

Sekiz haftanın sonunda tüm sıçanlarda uygulanan yağ greftleri; çevre dokulardan cerrahi olarak ayrıştırılarak (Şekil 12) hacim ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Alınan materyaller ardından apoptotik hücre varlığı ve sağ kalımın histopatolojik olarak araştırılması açısından Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirilmiştir.

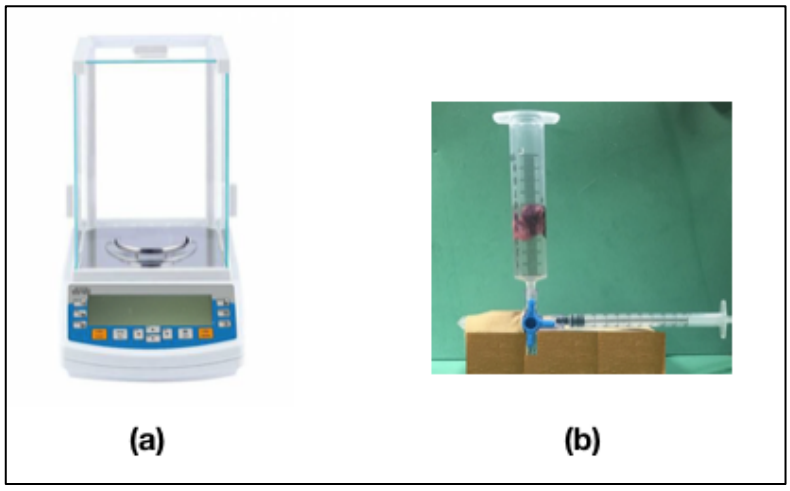
3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Grup 2 (inguinal BTx- A)' de üç, Grup 3 (inguinal salin)' de üç, Grup 4 (dorsal BTx- A)' te üç sıçanda, operasyon sonrası üçüncü ile yedinci günler arasında yağ grefti alıcı alanındaki dikişlerde açılma sebebi ile bu hayvanlar deney dışında tutulmuştur. Bu sıçanların yerine, belirtilen üç grupta üçer adet yeni sıçan, kendi grubuna uygun olarak işleme sokularak çalışmaya dahil edilmiştir.

3.3.1. Makroskopik değerlendirme

Tüm gruplardaki sıçanların sağ inguinal bölgeden alınan yağ greft ağırlıkları serum fizyolojik ile yıkanmadan önce hassas terazi ile tartıldı ve ardından Arşimed prensibine uygun olarak hazırlanan düzenekte Baek ve arkadaşlarının uyguladığı yönteme parallel olarak yağ greft hacimleri ölçüldü (Baek et al., 2012) (Şekil 13).

Sekizinci hafta sonunda dorsal interskapular bölgeye konulan yağ greftleri cerrahi olarak çıkarıldı ve aynı şekilde her bir gruptaki yağ grefti ağırlıkları hassas tartı ile tartıldı ve ardından Arşimed prensibine uygun olarak hazırlanan düzenekte aynı işlem ile hacimler ölçüldü.



Şekil 13. (a) Laboratuvar Analitik Hassas Terazi, Radwag 220 AS ile greft ağırlıklarının ölçümü **(b)** greft hacminin ölçülmesi.

3.3.2. Histolojik değerlendirme

Tüm gruplardan elde edilen yağ dokuları %10 formaldehit solüsyonunda fikse edildi ve rutin histolojik değerlendirmelere tabi tutuldu. Dokular yükselen alkol serilerinde dehidrate edilip ksilen içinde şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Yaklaşık 4μm kalınlığında alınan parafin kesitler genel morfolojinin değerlendirilmesi için hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyandı. Bağ doku elemanlarındaki değişiklikleri göstermek için Masson'un trikrom boyama yöntemi (HT15-1KT, Sigma Aldrich, Almanya) uygulandı.

Her kesitte birbirinin benzeri 10 alanda histopatolojik skorlama yapıldı ve her bir kriter, 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: yoğun olarak değerlendirildi ve maksimum skor 15 idi. Histopatolojik skorlama kriterleri; kist oluşumu, inflamasyon, anjiyogenez, hasarlı uniloküler yağ doku varlığı ve multiloküler yağ doku oluşumu olarak değerlendirildi.

Adipoz dokuda, apoptotik hücre varlığı, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılı dUTP-digoksijenin nick uçlu etiketleme (TUNEL) analizi (ApopTag® Plus Peroksidaz In Situ Apoptoz Kiti, Millipore, Kat No: S7101, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Boyama, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Kısaca, parafin kesitleri deparafinize edildi, alkollerden geçirilerek rehidrate edildi ve 20 ug / ml proteinaz K (37 ° C, 20 dakika) uygulandı. PBS'li %3 H202 endojen peroksidaz aktivitesinin blokajı için uygulandı. PBS ile durulandıktan sonra, kesitler 30 dakika TdT dengeleme tamponu ile inkübe edildi, TdT enzim çözeltisi ile kaplandı ve 1 saat 37 ° C'de inkübe edilip STOP çözeltisinde 5 dakika tutuldu. PBS içinde yıkamanın ardından, anti-digoksijenin konjugatı, nemlendirilmiş bölmede 30 dakika boyunca kesitlere damlatılarak uygulandı. Kesitler PBS tamponu içinde durulandı ve tüm doku bölümleri 10 dakika DAB çözeltisi ile kaplandı. Nukleuslar Mayer'in Hematoksileni ile hafif düzeyde boyandı. Apoptozun bir göstergesi olan TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak boyandılar.

Pozitif kontrol boyama kit içinden çıkan doku ile yapıldı. TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak gözlendi. Birbirinin benzeri 10 alanda TUNEL pozitif hücreler x40 objektif büyütmesinde sayıldı ve ondalık değer olarak değerlendirildi.

Tüm değerlendirmeler gruplar hakkında bilgisi olmayan iki histolog tarafından ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) altında değerlendirildi ve dijital kamera (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı.

3.3.3. İstatistiksel değerlendirme

Veriler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda *Instat* programı (versiyon 3.05) ile değerlendirildi. Her bir grubun kendi içerisindeki ağırlık ve hacim değerlendirmelerinde yağ greftinin ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki karşılaştırması 'Wilcoxon matched pairs signed rank test' ile değerlendirildi.

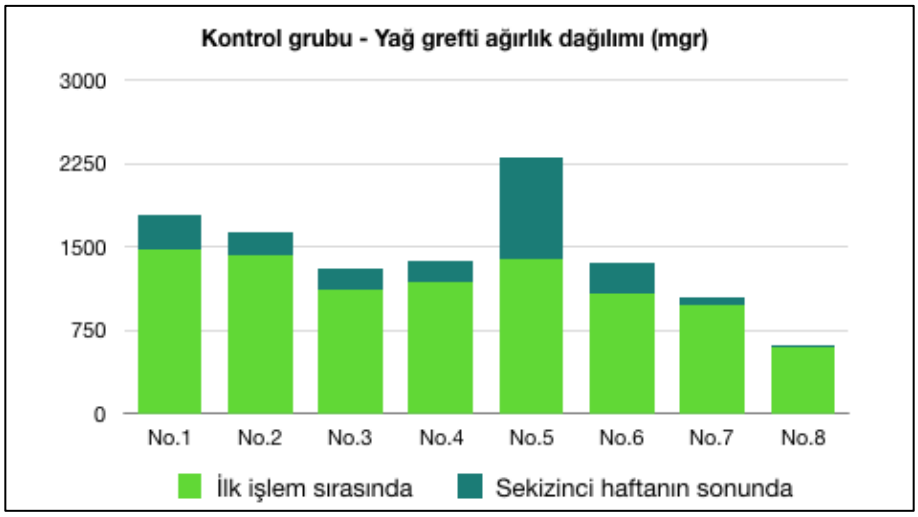
Beş grubun biribiri ile histolojik parametrelerin değerlendirilmesinde 'Kruskal-Wallis (non-parametrik ANOVA) testi' kullanıldı. Bu testte değerlerin anlamlı bulunması durumunda ise 'Dunn çoklu karşılaştırma testi' ile gruplar ikili olarak karşılaştırıldı. P değeri 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

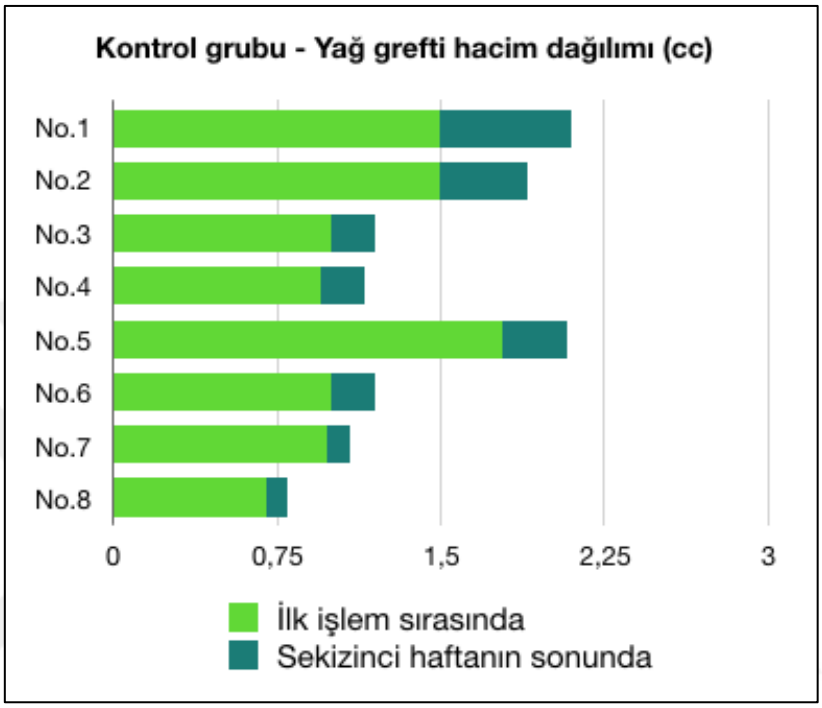
İlk işlem sırasında elde edilen yağ grefti ağırlık ve hacimlerin, tüm gruplar arasındaki istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (p: 0.7263). Bu sonuç, sıçan seçiminde ağırlık ve hacim açısından gruplar arasında taraf tutma veya yanlılık gibi bir durumunun olmadığını teyit etti. Beklenildiği üzere her gruptaki yağ greftlerinin ilk işlem sırasındaki ağırlık ve hacimlerinin, sekizinci hafta sonunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde tüm gruplarda azalmış olduğu ortaya konuldu (p: 0.0078).

Kontrol grubunda (Grup 1); sekiz sıçanın ortalama ağırlıkları 243.87 gr (206-265 gr arasında) olarak saptandı. İlk işlem sırasında alınan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 1157.87 mgr (597- 1470 mgr arasında) olarak tartıldı. Sekizinci haftanın sonunda interskapular bölgeden cerrahi olarak çıkarılan yağ greftinin kontrol grubundaki ortalama ağırlığı 268.38 mgr (17- 904 mgr) olarak tespit edildi (Tablo 1).



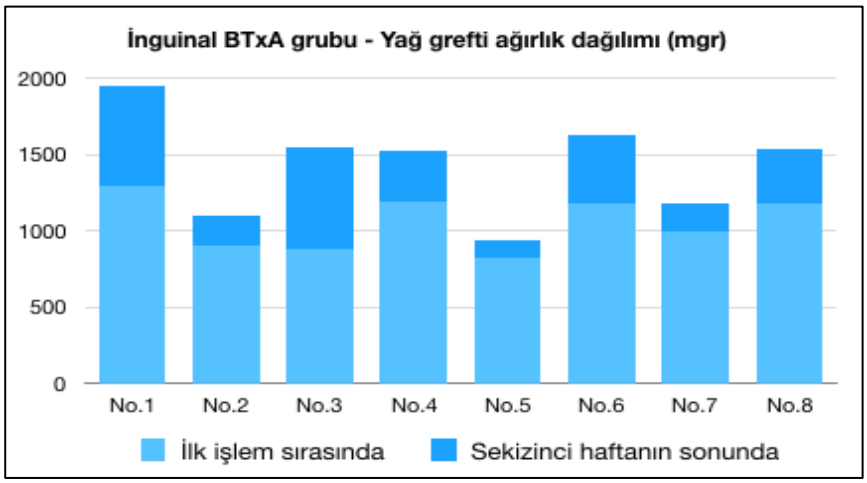
Tablo 1. Grup 1- Kontrol grubunda ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

Kontrol grubundaki yağ greftlerinin ilk işlem sırasındaki hacimlerinin ortalaması 1,18 cc (0,7- 1,78 cc arasında) olarak ölçüldü. Sekizinci hafta sonunda interskapular alandan cerrahi olarak çıkarılan yağ greftinin ortalama hacmi ise 0,35 cc (0,1- 0,9 cc arasında) olarak saptandı (Tablo 2).



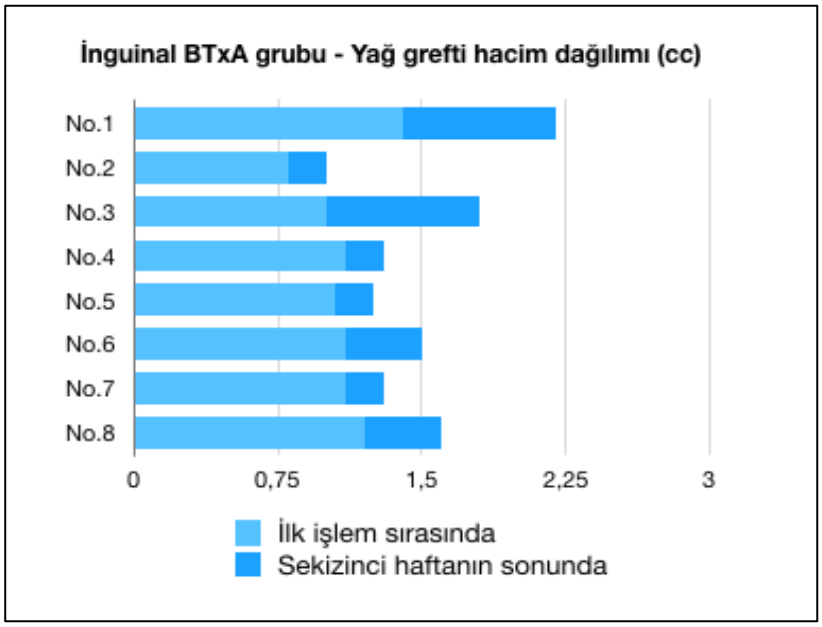
Tablo 2. Grup 1- Kontrol grubunda ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc).

Sağ inguinal bölgeye botulinum toksin (BTx- A) enjeksiyonu uygulanan grupta (Grup 2); sekiz sıçanın ortalama ağırlıkları 202 gr (170- 217 gr arasında) olarak saptandı. BTx- A enjeksiyonundan yedi gün sonra ilk işlem sırasında alınan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 1058.4 mgr (826- 1300 mgr arasında) olarak tartıldı. Sekizinci haftanın sonunda interskapular bölgeden cerrahi olarak çıkarılan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 369.3 mgr (117- 665 mgr arasında) olarak tespit edildi (Tablo 3).



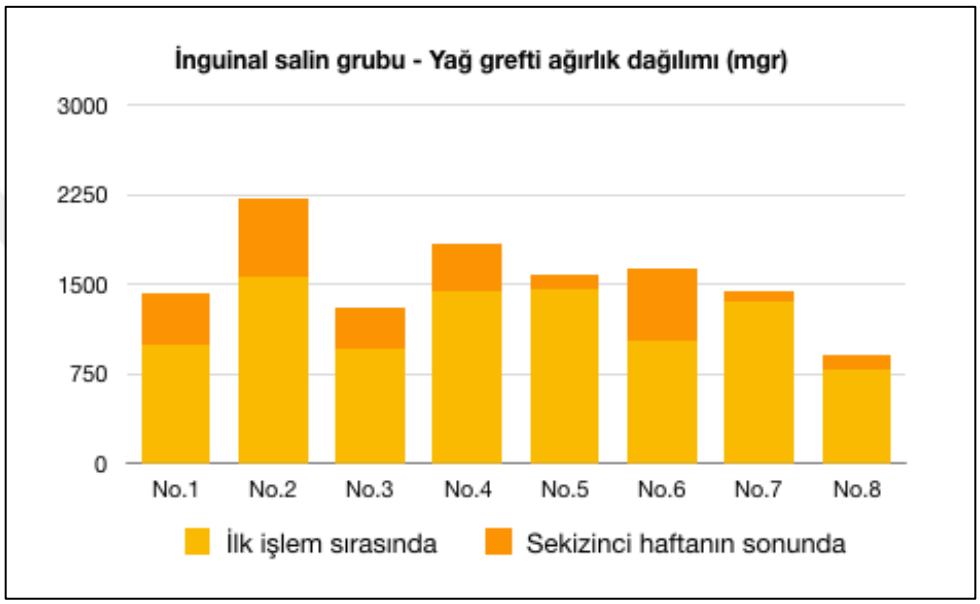
Tablo 3. Grup 2- Sağ inguinal bölgeye BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

İnguinal bölgeye BTx-A enjeksiyonu ile ön koşullandırılan dokudan yedi gün sonra alınan yağ greftlerinin ilk işlem sırasındaki hacimlerinin ortalaması 1,22 cc (0,8-1,4 cc arasında) olarak ölçüldü. Sekizinci hafta sonunda interskapular alandan cerrahi olarak çıkarılan yağ greftinin ortalama hacmi ise 0,4 cc (0,2- 0,8 cc arasında) olarak tespit edildi. (Tablo 4).



Tablo 4. Grup 2- Sağ inguinal bölgeye BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc)**.**

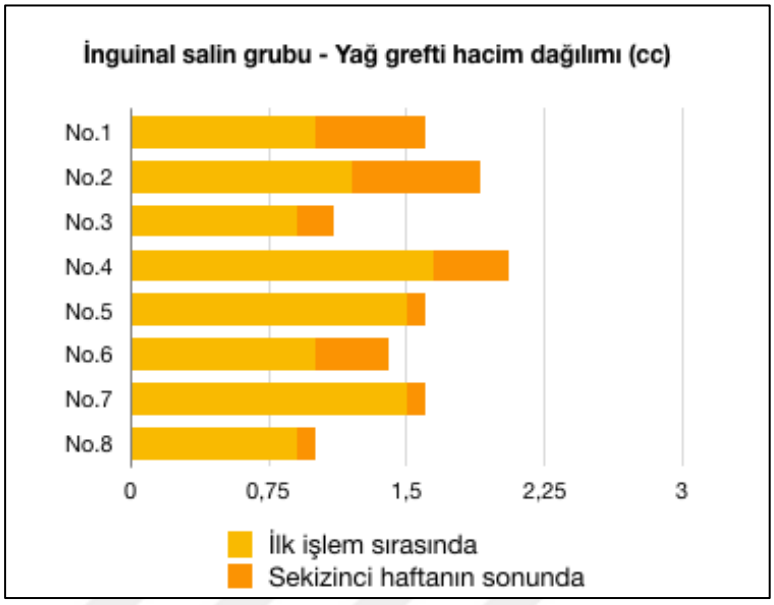
Sağ inguinal bölgeye serum fizyolojik (salin) uygulanan grupta (Grup 3); sekiz sıçanın ortalama ağırlıkları 233,75 gr (204- 267 gr arasında) olarak tartıldı. Salin enjeksiyonundan yedi gün sonra ilk işlem sırasında alınan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 1199,6 mgr (789- 1564 mgr arasında) olarak tartıldı. Sekizinci haftanın sonunda interskapular bölgeden cerrahi olarak çıkarılan yağ greftinin ortalama ağırlığı 344,9 mgr (81- 648 mgr arasında) olarak tespit edildi (Tablo 5).



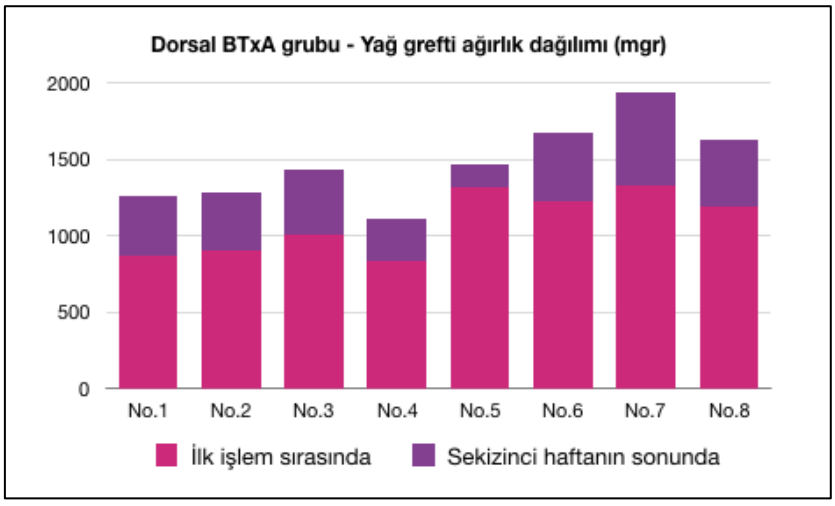
Tablo 5. Grup 3- Sağ inguinal bölgeye salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr).

İnguinal bölgeye salin enjeksiyonu uygulanmasından yedi gün sonra alınan yağ greftlerinin ilk işlem sırasındaki hacimlerinin ortalaması 1,21 cc (0,9- 1,65 cc arasında) olarak ölçüldü. Sekizinci hafta sonunda interskapular alandan cerrahi olarak çevre dokudan ayrılıp çıkarılan yağ greftinin ortalama hacmi ise 0,33 cc (0,1- 0,7 cc arasında) olarak saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. Grup 3- Sağ inguinal bölgeye salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc)

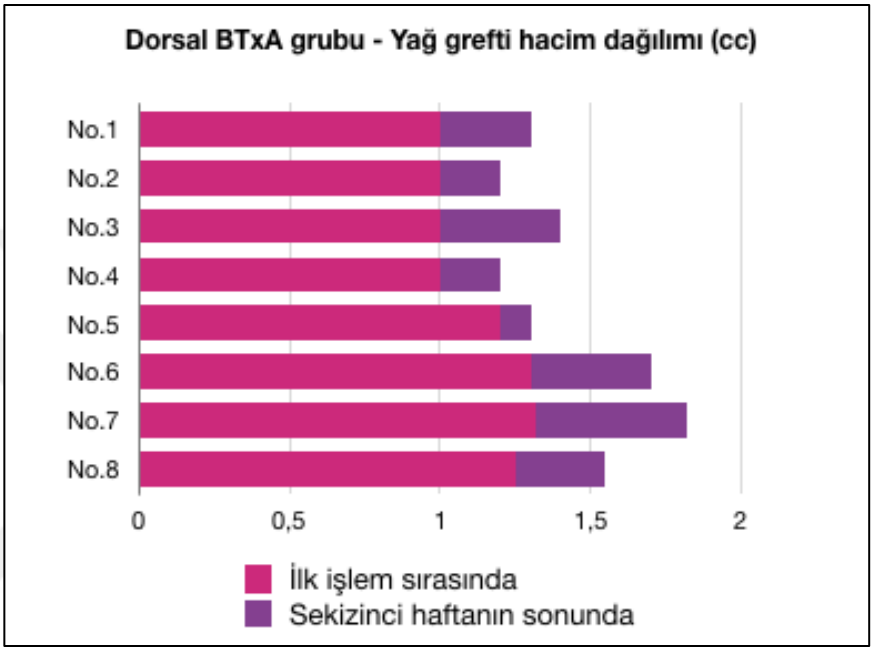


Dorsal interskapular bölgedeki alıcı alana BTx- A enjeksiyonu uygulanan grupta (Grup 4); sekiz sıçanın ortalama ağırlıkları 218,63 gr (195- 244 gr arasında) olarak tartıldı. BTx- A enjeksiyonundan yedi gün sonra ilk işlem sırasında alınan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 1085,3 mgr (837- 1325 mgr arasında) olarak saptandı. Sekizinci haftanın sonunda interskapular bölgeden cerrahi olarak alınan yağ greftinin ortalama ağırlığı 388,9 mgr (150- 611 mgr arasında) olarak tespit edildi (Tablo 7).



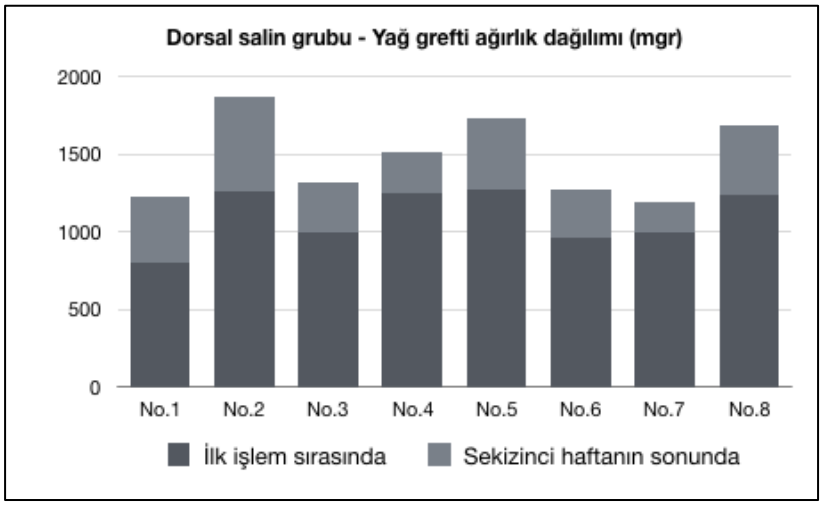
Tablo 7. Grup 4- Dorsal alıcı alana BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr)

Dorsal alıcı alana BTx-A enjeksiyonu uygulanmasından yedi gün sonra alınan yağ greftlerinin ilk işlem sırasındaki hacimlerinin ortalaması 1,13 cc (1- 1,32 cc arasında) olarak ölçüldü. Sekizinci hafta sonunda interskapular alandan cerrahi olarak çevre dokudan ayrılıp çıkarılan yağ greftinin ortalama hacmi ise 0,3 cc (0,1- 0,5 cc arasında) olarak tespit edildi (Tablo 8).



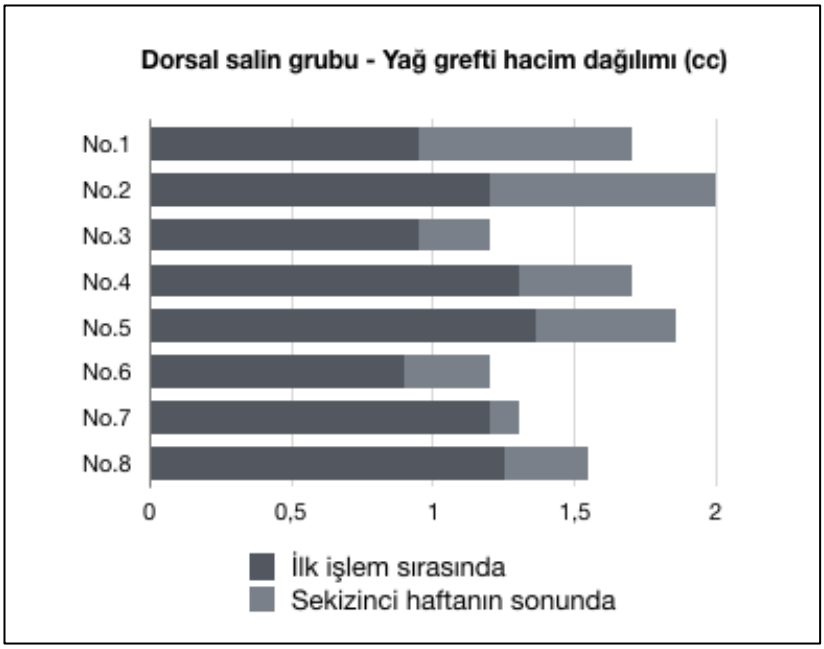
Tablo 8. Grup 4 – Dorsal alıcı alana BTx-A enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc)

Dorsal interskapular bölgedeki alıcı alana salin enjeksiyonu uygulanan grupta (Grup 5); sekiz sıçanın ortalama ağırlıkları 235,1 gr (213- 263 gr arasında) olarak tartıldı. Salin enjeksiyonundan yedi gün sonra ilk işlem sırasında alınan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 1097 mgr (807- 1276 mgr arasında) olarak saptandı. Sekizinci haftanın sonunda interskapular bölgeden cerrahi olarak çevre dokulardan ayrıştırılıp çıkarılan yağ greftinin ortalama ağırlığı ise 378,6 mgr (197- 611 mgr arasında) olarak tespit edildi (Tablo 9).



Tablo 9. Grup 5 – Dorsal alıcı alana salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti ağırlıkları (mgr)

Dorsal alıcı alana salin enjeksiyonu uygulanmasından yedi gün sonra alınan yağ greftlerinin ilk işlem sırasındaki hacimlerinin ortalaması 1,14 cc (0,9- 1,25 cc arasında) olarak ölçüldü. Sekizinci hafta sonunda interskapular alandan cerrahi olarak çıkarılan yağ greftinin ortalama hacmi ise 0,43 cc (0,1- 0,8 cc arasında) olarak saptandı (Tablo 10).



Tablo 10. Grup 5 – Dorsal alıcı alana salin enjeksiyonu uygulanan grupta ilk işlem sırasındaki ve sekizinci haftanın sonundaki yağ grefti hacimleri (cc)

Yağ greftlerindeki ağırlık kaybı açısından gruplar değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Ancak dorsal alıcı alana BTx- A enjeksiyonu yapılan dördüncü gruptaki ağırlık kaybının en az olduğu, kontrol grubu olan birinci grupta ise yağ grefti ağırlık kaybının en fazla olduğu göreceli olarak anlamlı bulundu.

Yağ greftlerindeki hacim kaybı açısından gruplar değerlendirildiğinde ise, gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$) (Tablo 11).

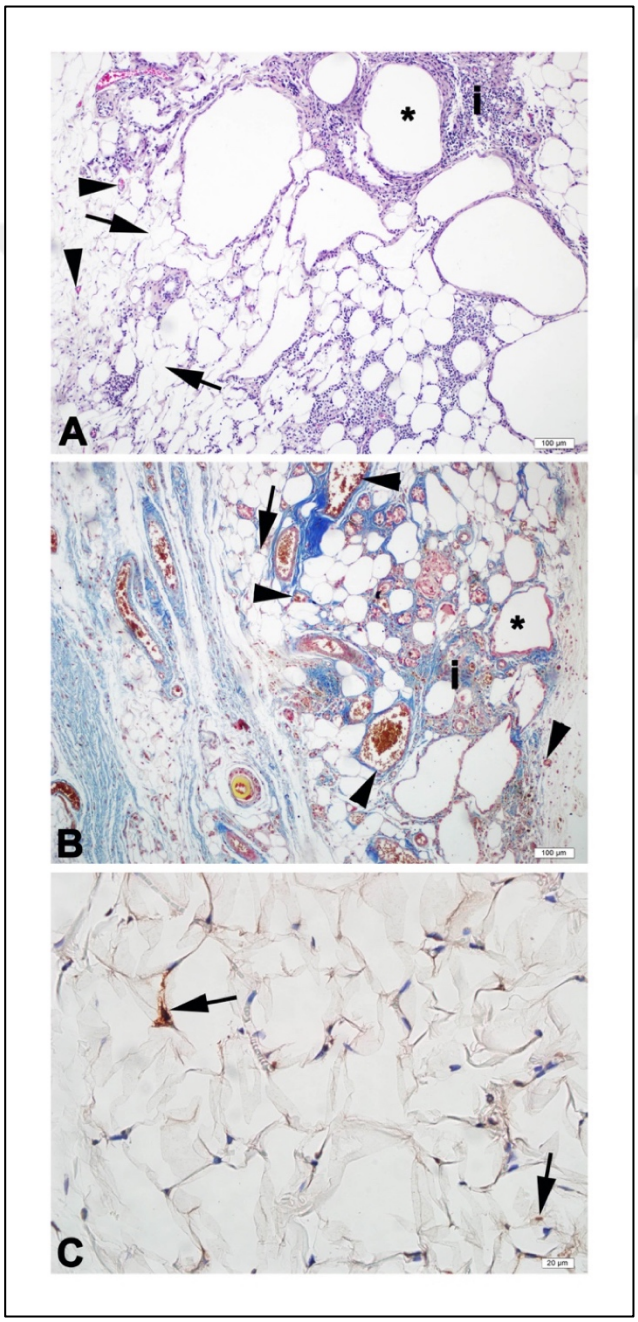
	Ağırlık (ilk)	Ağırlık (son)	Sağkalım yüzdesi
Grup 1- Kontrol	1157.9 mgr	268.4 mgr	23.2
Grup 2- İnguinal BTx	1058.4 mgr	369.3 mgr	34.9
Grup 3- İnguinal salin	1199,6 mgr	344.9 mgr	28.8
Grup 4- Dorsal BTx	1085.3 mgr	388.9 mgr	35.8
Grup 5- Dorsal salin	1097 mgr	378.6 mgr	34.5

	Hacim (ilk)	Hacim (son)	Sağkalım yüzdesi
Grup 1- Kontrol	1.18 cc	0.35 cc	29,6
Grup 2- İnguinal BTx	1.22 cc	0.4 cc	32,8
Grup 3- İnguinal salin	1.21 cc	0.33 cc	27,2
Grup 4- Dorsal BTx	1.13 cc	0.3 cc	26,6
Grup 5- Dorsal salin	1.14 cc	0.43 cc	37.7

Tablo 11. Beş grubun ilk işlem sırasındaki ve sekizinci hafta sonundaki ortalama yağ greft ağırlık ve hacim açısından sağ kalım yüzdeleri

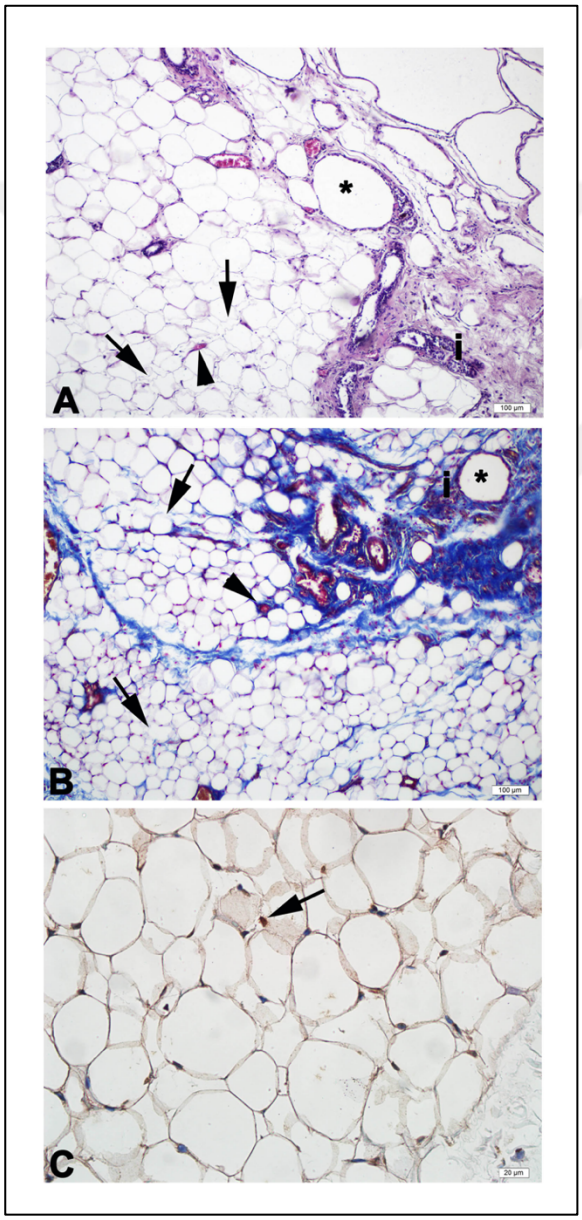
4.2. Histolojik Bulgular

Grup 1'de, yoğun kist oluşumları, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve çok sayıda küçük damar oluşumları ve hasarlı uniloküler adipositler gözlendi (Şekil 14 1 A, B). İncelenen 9 alanda 1-4 TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 14 C).



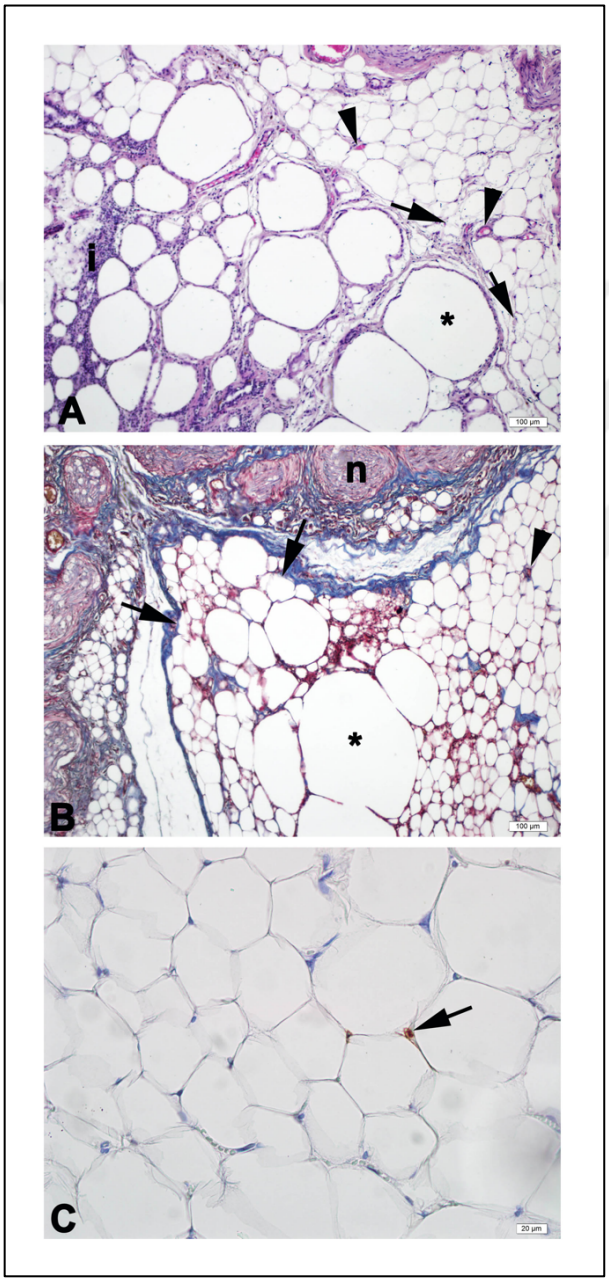
Şekil 14. Grup 1'e ait temsili fotomikrograflarda, yoğun kist oluşumu **(*)**, enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları **(ok başı)**, hasarlı uniloküler adipositler **(A ve B - ok)** ve TUNEL pozitif hücreler **(C, ok)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Grup 2'de orta düzeyde kist oluşumu, hafif düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve çok sayıda küçük damar oluşumları ve hasarlı uniloküler adipositler gözlendi. Uniloküler adipositlerle birlikte multiloküler adipositler de gözlendi (Şekil 15 A, B). İncelenen 10 alanın 2'sinde 1 TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 15 C).



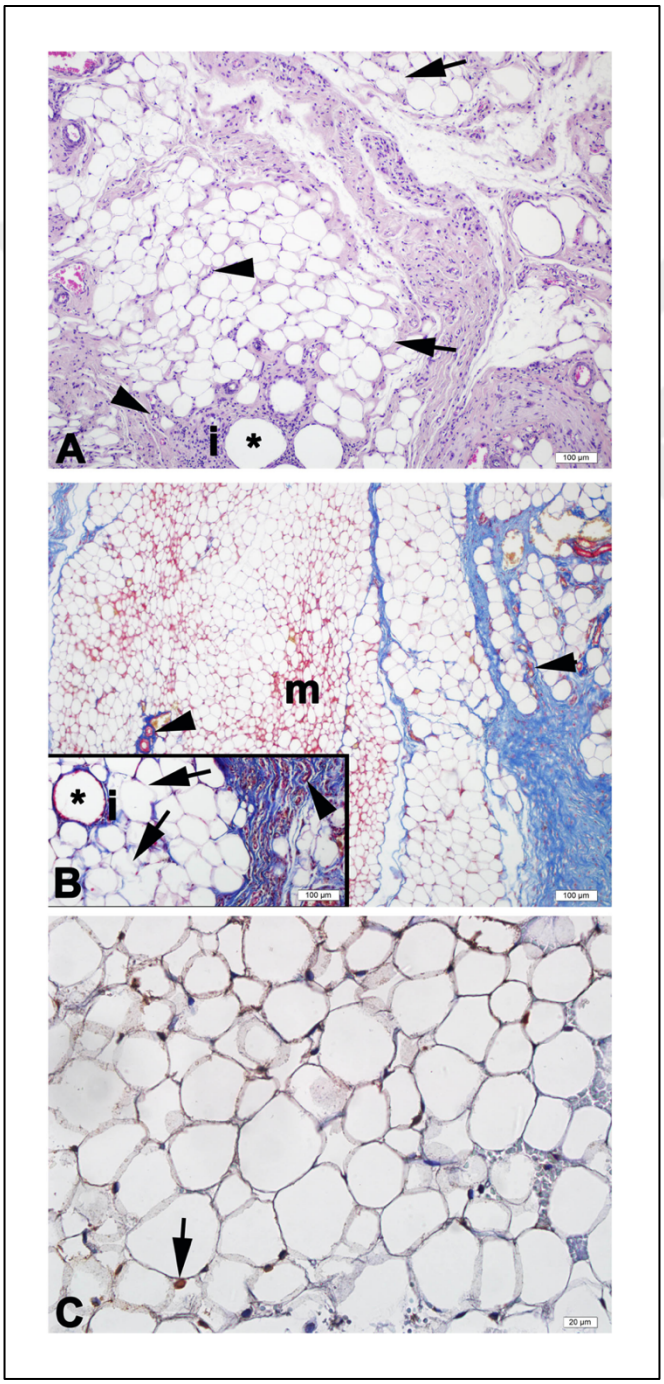
Şekil 15. Grup 2'ye ait temsili fotomikrograflarda, orta düzeyde kist oluşumu **(*)**, hafif düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları (ok başı) ve orta düzeyde hasarlı uniloküler adipositler **(ok, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Grup 3'de yoğun kist oluşumu, orta düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve hasarlı uniloküler adipositler gözlendi. Uniloküler adipositlerle birlikte multiloküler adipositler de gözlendi (Şekil 16 A, B). İncelenen 10 alanın 2'sinde 1-2 TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 16 C).



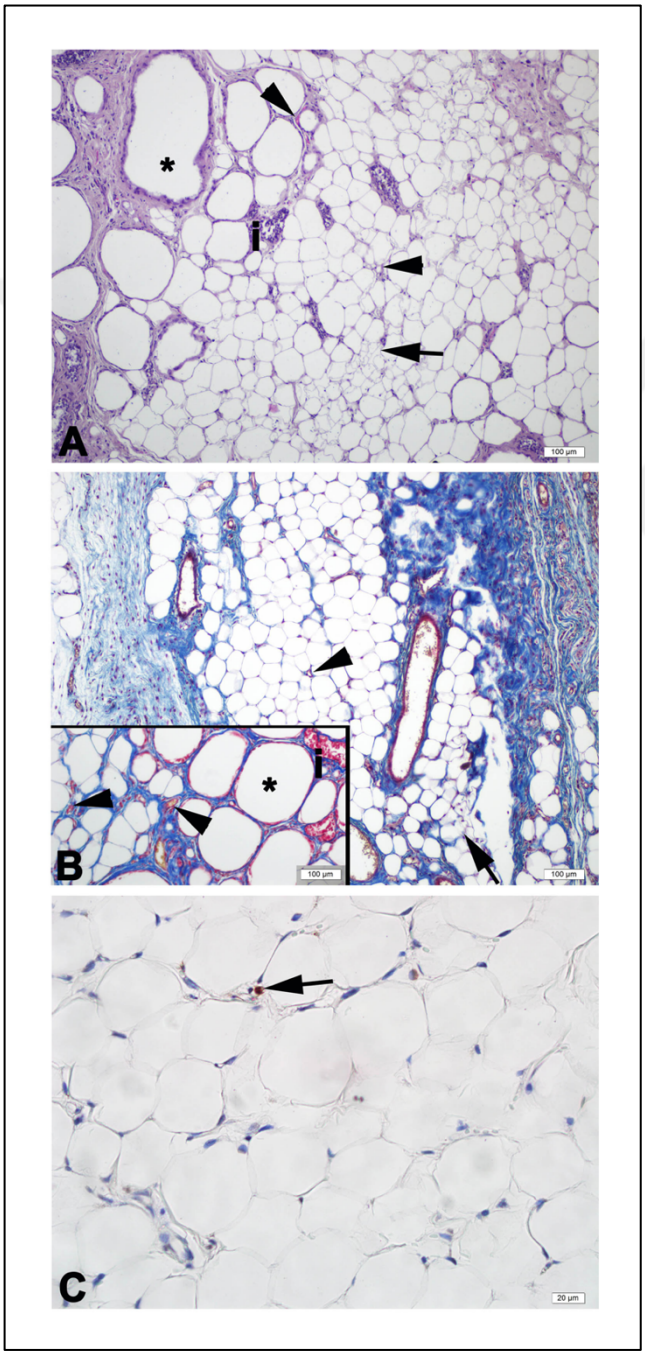
Şekil 16. Grup 3'e ait temsili fotomikrograflarda, yoğun kist oluşumu **(*)**, orta düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları **(ok başı)**, orta düzeyde hasarlı uniloküler adipositler **(ok, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. Periferik sinir kesiti **(n, B)**. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Grup 4'de hafif kist oluşumu, hafif düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve hasarlı uniloküler adipositler gözlendi. Uniloküler adipositlerle birlikte yoğun multiloküler adipositler de gözlendi (Şekil 17 A, B). İncelenen 10 alanın 1'inde 1 TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 17 C).



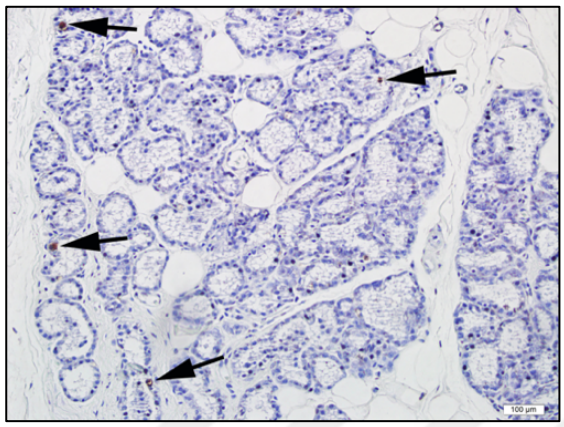
Şekil 17. Grup 4'e ait temsili fotomikrograflarda, hafif düzeyde kist oluşumu **(*)**, enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, çok sayıda küçük damar oluşumları **(ok başı)**, az sayıda hasarlı uniloküler adipositler **(ok)**, multiloküler adipositler **(m, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

Grup 5'de orta düzeyde kist oluşumu, orta düzeyde enflamatuvar hücre infiltrasyonu, vasküler konjesyon ve hasarlı uniloküler adipositler gözlendi. Uniloküler adipositlerle birlikte yoğun multiloküler adipositler de gözlendi (Şekil 18 A, B). İncelenen 10 alanın 2'sinde 1-2 TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 18 C).



Şekil 18. Grup 5'e ait temsili fotomikrograflarda, orta düzeyde kist oluşumu **(*)**, enflamatuvar hücre infiltrasyonu **(i)**, küçük damar oluşumları **(ok başı)**, hasarlı uniloküler adipositler **(ok, A ve B)** ve TUNEL pozitif hücre **(ok, C)** görülmektedir. **A:** H&E boyası; **B:** Masson'un trikrom boyası; **C:** TUNEL boyası. Orijinal büyütme: A ve B: x100, B: x400.

TUNEL boyamanın pozitif kontrolü kit içinden çıkan preparatın boyanması ile yapıldı. TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak gözlendi (Şekil 19).

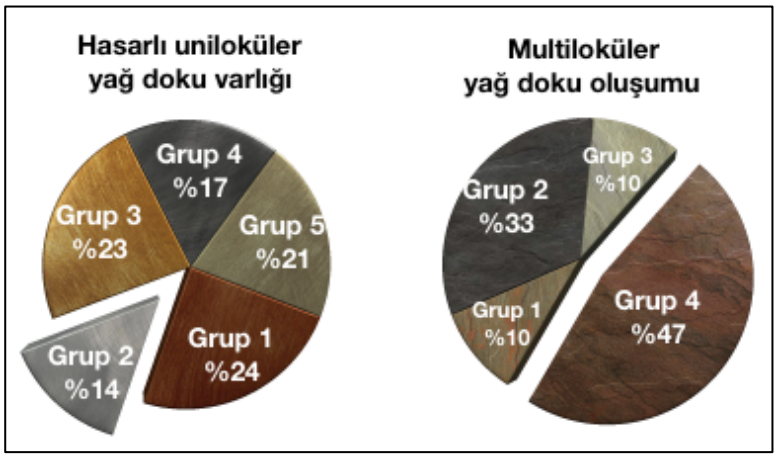


Şekil 19. TUNEL boyamanın pozitif kontrolü preparatında TUNEL pozitif **(ok)** hücreler görülmektedir. Orijinal büyütme: x200

Kist oluşumu, inflamasyon derecesi ve anjiyogenez açısından beş grup arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$). Ancak dorsal alıcı alana BTx- A enjeksiyonu yapılan dördüncü grupta inflamasyon derecesinin daha az olduğu, inguinal bölgeye BTx-A ve dorsal bölgeye BTx-A enjeksiyonu yapılan gruplarda anjiogenezin diğer gruplara göre göreceli olarak artmış olduğu saptandı (Tablo 12).

	Kist oluşumu	İnflamasyon	Anjiogenez	Hasarlı yağ doku	Multiloküler yağ doku oluşumu
Grup 1- Kontrol	2	2,13	2,38	2,5	0,31
Grup 2- İnguinal BTx	1,43	1,31	2,75	**1,44***	1
Grup 3- İnguinal salin	2,38	1,69	2,06	2,38	0,31
Grup 4- Dorsal BTx	1,5	1,14	2,5	1,79	**1,43***
Grup 5- Dorsal salin	1,31	1,31	1,62	2,13	0

Tablo 12. Histopatolojik değerlendirmelerin ortalama değerleri



Şekil 20. Hasarlı uniloküler yağ doku varlığı ve multiloküler yağ doku oluşum ortalamalarının gruplar arasında karşılaştırılması

Hasarlı uniloküler yağ doku (beyaz yağ dokusu, bkz. '2.1 Yağ Dokusu' ve '2.2.4 Yağ grefti ve hayvan modelleri') varlığı açısından gruplar değerlendirildiğinde; verici alana BTx-A enjeksiyonu yapılan grupta (grup 2), hasarlı dokunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi (p: 0.0023) (Tablo 13 ve Şekil 20). Bu anlamlılık, Dunn çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırmada değerlendirildi. Verici alana BTx-A enjeksiyonu yapılan gruptaki anlamlı sonucun, kontrol grubuna göre ($p < 0.01$) ve verici alana salin enjeksiyonu uygulanan gruba göre ($p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı olmasından kaynaklanmakta olduğu tespit edilmiştir.

HASARLI UNİLOKÜLER YAĞ DOKU	Denek sayısı	Toplam değer	Median	Ortalama Değer
Grup 1- Kontrol	8	214.00	2.50	26.75
Grup 2- İnguinal BTx	8	**75.00 ***	**1.25 ***	**9.37 ***
Grup 3- İnguinal salin	8	208.50	2.50	26.03
Grup 4- Dorsal BTx	7	97.50	1.50	13.93
Grup 5- Dorsal salin	8	146.00	2.00	20.86
p değeri				***0.0023 ****

Tablo 13. Hasarlı uniloküler yağ doku açısından grupların 'Kruskal-Wallis (non-parametrik ANOVA) testi ile değerlendirilmesi.

Multiloküler yağ doku oluşumu (kahverengi yağ dokusu, bkz. ‘2.1 Yağ Dokusu’ ve ‘2.2.4 Yağ grefti ve hayvan modelleri’) açısından gruplar değerlendirildiğinde ise; alıcı alana BTx-A enjeksiyonu yapılan grupta (grup 4), yeni yağ doku oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi (p: 0.0016) (Tablo 14). Bu anlamlılık, Dunn çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırmada değerlendirildi ve alıcı alana BTx-A enjeksiyonu yapılan gruptaki sonucun (grup 4), alıcı alana salin enjeksiyonu yapılan gruptaki (grup 5) sonuca göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı derecede yüksek olmasından kaynaklandığı saptanmıştır ($p < 0.01$).

Ayrıca apoptozun bir göstergesi olan TUNEL pozitif hücreler açısından gruplar değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

MULTİLOKÜLER YAĞ DOKU OLUŞUMU	Denek sayısı	Toplam değer	Median	Ortalama Değer
Grup 1- Kontrol	8	138.50	0.00	17.31
Grup 2- İnguinal BTx	8	196.50	1.00	24.56
Grup 3- İnguinal salin	8	133.00	0.00	16.63
Grup 4- Dorsal BTx	7	**220.00 ***	**1.00 ***	**31.43 ***
Grup 5- Dorsal salin	8	92.00	0.00	11.50
p değeri				***0.0016 ****

Tablo 14. Multiloküler yağ doku oluşum açısından grupların ‘Kruskal-Wallis (non-parametrik ANOVA) testi ile değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

Yaşlanmaya veya travmaya bağlı kontür deformitelerinin düzeltilmesi, uzun süreden beri plastik cerrahların ilgi alanı olmuştur ve bu deformitelerin düzeltilmesi adına çeşitli yöntemler ortaya konulmuştur. Otolog yağ greftleri bu amaçla sıkça kullanılan yöntemlerden biridir ve uzun operasyon süresi gerektirmemesi, yabancı bir maddenin kullanılmaması ve hastanın kendi dokularını tekrarlayan şekilde kullanabilme gibi önemli avantajlara sahiptir. Yağ grefti sağ kalım oranlarının yüzde 20 ile 90 arasında değişim göstermesi ve bu sağ kalımın öngörülemez olması ise en önemli dezavantajıdır (Ersek, 1991; Goldwyn, 1988). Bu dezavantajı azaltmak adına otolog yağ greftlerinin alınma, hazırlanma, alıcı alana verilme (çeşitli maddeler ile birlikte veya izole olarak) ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Tüm bu çalışmaların ortak amacı yağ grefti sağ kalımını artırmak ve rezorbsiyon oranını azaltmak olmuştur.

Yağ greftlerinin sağ kalım mekanizmasında iki ayrı teori genel kabul görmektedir. Bunlardan birincisi; alıcı alanda yağ dokusunun sağ kalamadığı durumda, sağ kalamayan yağ dokunun histiyositler tarafından yeni adipoz doku ile yer değişimini destekleyen 'hücre yer değiştirme teorisi'dir. İkinci genel kabul gören teori ise; alıcı alana yerleştirilen bazı yağ hücrelerinin alıcı alan reaksiyonu ile yıkımına dayanan ve bu yıkımın histiyositler tarafından hasara uğramış lipidleri ortamdan uzaklaştırıp rezidüel yağ hücrelerinin ortamda bırakmasına dayanan 'hücre sağ kalım teorisi'dir (Chiu, 1990). Yapılan son çalışmalarda ise yağ grefti sağ kalımında, bu iki görüş de birlikte savunulmaktadır. Çünkü alıcı (konak) alandaki yağ grefti incelendiğinde hem olgun adiposit hücresi hem de pre- adiposit içermektedir. Kısaca yağ grefti; aktarımdan sonra 'sağ kalan' olgun adiposit hücresi ve alıcı alandaki pre-adipositlerden dönüşüme uğrayarak adipoz hücreye 'yer değiştiren' adiposit hücrelerinin birleşiminden oluşmaktadır (Pu, 2016).

Doi ve arkadaşlarının 2015 senesinde yağ greftinin alıcı sahada sağ kalımını inceleyen bir çalışmada; greftin yeniden şekillenme aşamasında alıcı alandaki hücrelerin büyük çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu (erken aşamada yüzde 90'dan fazla, on ikinci haftada yüzde 60), 12.haftada incelenen greft dokusunun büyük

çoğunluğunun ise adipoz kökenli kök veya stromal hücrelerden köken aldığı tespit edilmiştir. Bu adipoz kökenli kök veya stromal hücrelerin ise hem greft hem de alıcı alandaki kök hücrelerden kaynaklandığı saptanmıştır (Doi et al., 2015).

Eto ve arkadaşlarının 2012 senesinde yağ grefti sağ kalımını dinamik bir süreç olarak nitelendirdikleri bir başka hayvan modeli çalışmasında ise, adipoz kökenli kök hücrelerin aktarıldıkları alanda üç güne kadar sağ kalabildikleri ancak adipositlerin ilk günden itibaren apoptoza gittiği ve sadece alıcı dokunun 300 μm etrafında olan bazı olgun adiposit hücrelerin hayatta kaldığı belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada çoğalan hücre sayısının üçüncü günden itibaren arttığı ve yedinci günde canlı adiposit alanların saptanabildiği ortaya konulmuştur (Eto et al., 2012).

Alıcı alandaki damarlanma durumunun yağ grefti sağ kalımına etkisi birçok çalışmada vurgulanmıştır. B. Sezgin ve arkadaşlarının 2014 senesinde yaptığı bir çalışmada '*microneedle'* ile ön koşullandırılmış alıcı alandaki damarlanmanın, yağ greft hücresel bütünlüğünü ve yağ grefti sağ kalımınını istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı tespit edilmiştir (Sezgin et al., 2014). Adipoz doku greftlerinin hayatta kalma süresinde, 7. günden itibaren hızlı şekilde artan ve 30. günden sonra daha az şekilde artan sonrasında da plato çizen mikrodamar sayısı, özellikle indüklenen revaskülarizasyonun derecesinde de önemlidir. Hausman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada VEGF'ün de dahil olduğu anjiyogenik sitokinlerin buna paralel olarak 7 gün boyunca revaskülarizasyonu desteklediği bulunmuştur (Hausman & Richardson, 2004).

Bizim çalışmamızda yağ grefti hayvan modeli olarak sıçan seçiminin sebebi yağ grefti (Tang et al., 2017) ve botulinum toksin ile ön koşullandırma yapılmış flep çalışmaları dahil olmak üzere (Kim et al., 2009) bu düzlemde yapılmış olan bir çok çalışmanın sıçan modelleri üzerinden yapılan araştırmalar olmasıdır. 2017 senesinde Lujan-Hernandez ve arkadaşlarının, yağ grefti çalışmalarında kullanılan hayvan modelleri üzerine yaptıkları bir meta-analizde, yağ greftleri modellerinde en sık alıcı alan olarak dorsal subkutan sahanın seçildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak, bizim araştırmamızda da yağ grefti alıcı saha olarak dorsal subkutan bölge

seçilmiştir. Bu çalışmada yağ grefti takip süresi; bu meta-analizde ikinci en sık olarak seçilen yağ grefti bir çok yağ grefti çalışmasında uygulanan protokolle yağ grefti takip süresi sekiz hafta olarak uygun görülmüştür (Lujan-Hernandez et al., 2017).

Bahsedildiği üzere yağ grefti sağ kalımını artırmaya ve rezorbsiyon oranlarını azaltmaya yönelik olarak yağ greftlerinin çeşitli ajanlar ile birlikte kullanımına dair literatürde birçok yayın bulunmaktadır. Kølle ve arkadaşlarının yaptığı klinik bir çalışmada adipoz kökenli kök hücre (ASC) ile aktarılan yağ greftlerinde sağ kalımın ve yeni oluşan yağ doku miktarının artmış olduğu ve nekrotik dokuların daha az oranda oluşmuş olduğu ortaya konulmuştur (Kølle et al., 2013). Buna ek olarak, Doi ve arkadaşlarının yaptığı deneysel bir çalışmada yağ grefti sonrasında yeni oluşan adipoz dokunun ana kaynağının adipoz kökenli kök hücreler olduğu ve bu hücrelerin hem alıcı alandan hem de yerleştirilen yağ greftinde mevcut olan kök hücrelerden dönüşüme uğradığı savunulmuştur (Doi et al., 2015).

Li ve arkadaşlarının literatüre kattığı bir başka çalışmada ise, yağ greftleri stromal vasküler fraksiyon (SVF) ve SVF ile kombine olarak VEGF (SVF + VEGF) ile birlikte verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda VEGF ile kombine olarak verilen SVF grubunda, yağ nekroz oranlarının ve fibrozisin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu saptanmıştır (L. Li et al., 2014). Li ve arkadaşlarının 2017 senesinde yaptığı bir çalışmada ise, yağ greftleri izole olarak adipoz kökenli kök hücre ile ve adipoz kökenli hücreye ek olarak trombositten zengin plazma (PRP- *platelet rich plasma*) ile beraber verilmiştir. Yapılan incelemede, adipoz kökenli hücrelere ek olarak trombositten zengin plazma ile birlikte verilen grupta, kapiler dansitenin ve rezidüel yağ doku hacminin istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir (K. Li et al., 2017).

Yağ greftlerinin çeşitli maddeler ile birlikte kullanımına dair bir başka yaklaşım olarak, Karaçal ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları deneysel bir araştırmada, fibrin yapıştırıcının yağ grefti üzerine etkisi incelenmiştir. Fibrin yapıştırıcı ile verilen yağ greftlerinde sağ kalımın istatistiksel olarak anlamlı derecede

artmış olduğu ve bu grupta yeniden damar oluşumun da artmış olduğu ortaya konulmuştur (Karaçal et al., 2007).

Botulinum toksin-A ile birlikte yağ grefti işlemi ise plastik ve rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu birlikte kullanım halen tartışmalıdır. Bazı klinisyenler artmış sağ kalım oranının, BTx-A'nın kas kasılmasını azaltma etkisine ve adipoz dokunun nispeten hareketsiz alana yerleşmesine bağlı olduğunu düşünmektedir. Bununla birlikte, bugüne kadar yapılan hiçbir çalışma, özellikle başarılı adipoz doku greftlemesinin temel faktörleri açısından, BTx-A'nın adipoz doku greftleri üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatamamıştır. Baek ve arkadaşlarının 2012 senesinde yaptıkları deneysel bir çalışmada, yağ grefti her iki inguinal yağ yastıkçığından alınıp bir taraf sadece salin solüsyonu ile yıkanmış, diğer yağ grefti botulinum toksin (0.5 Ü BTx-A) ile karıştırılarak dorsal interskapular alana yerleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda BTx-A grubundaki yağ greft hücre bütünlüğün, yağ grefti ağırlık ve hacminin istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu, bununda alıcı alandaki kas kasılmalarının BTx-A ile azalmasına bağlı olabileceği savunulmuştur. Ancak bizim çalışmamızda Baek ve ark.'larının araştırmasındakinin aksine verici veya alıcı alan BTx-A ile ön koşullandırmaya tabii tutulduktan sonra yağ grefti işlemi uygulanmıştır (Baek et al., 2012). Ayrıca çalışmamızda, alıcı alandaki kas kasılmasına BTx-A ile müdahale edilmeksizin verici alana uygulanan BTx-A grubunda hasarlı yağ dokularının anlamlı derecede daha az olduğu ortaya konulmuştur. Bizim elde ettiğimiz bu sonuç ise, BTx-A'nın yağ grefti üzerineki olumlu etkisinin sadece kas kasılmalarını engelleyerek etki etmediği şeklinde yorumlanabilir.

Tang ve arkadaşlarının 2017 senesinde yaptıkları deneysel bir çalışmada ise botulinum toksin-A'nın CD31 ve VEGF ekspresyon düzeyini artırdığı ve vazodilatasyon ile endotelyal hücre proliferasyonuna katkı sağladığı görülmüştür. Bu çalışmanın '*in vitro'* bölümünde ise, botulinum toksin-A'nın adipoz kaynaklı kök hücre üzerine etkisi araştırılmış olup, 8x10-2 Ü/ml dozundaki BTx-A'nın adipoz kaynaklı kök hücrelerin proliferasyon ve adipojenik dönüşüm kapasitesini artıran optimal doz olarak belirlenmiştir (Tang et al., 2017). Bizim çalışmamızda ise BTx-

A'nın etkinliği dokular üzerine ön koşullandırma yapılarak ve verici alan üzerindeki etkisi de araştırmaya alınarak yağ grefti sağ kalıma etkisi incelenmiştir.

Gugerell ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir başka deneysel çalışmada ise botulinum toksin-A'nın olgun adipositler, adipoz kök hücre ve fibroblastlar üzerindeki etkisi araştırılmış olup BTx-A'nın, bu hücreler üzerinde proliferasyon veya sağ kalımlarını artırıcı etkisi bulunmamıştır (Gugerell et al., 2014). Bizim araştırmalarımız sonucunda da, Gugerell ve ark.'larının yaptığı çalışmaya paralel olarak, apoptoz göstergesi olan TUNEL pozitif hücrelerin gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Bütün fleplerde görülebilecek en sık problemlerden biri flep distalinde nekrozun oluşmasıdır. Bunun sebebi sıklıkla, küçük arteriollerde oluşan vazokonstrüksiyon ve perfüzyon basıncında azalma sonucunda flep distaline yeterli kan akımının ulaşmamasıdır. Özellikle distal flep canlılığını artırmak için flep geciktirme veya flep ön koşullandırma yöntemleri kullanılabilmektedir. Banbury ve arkadaşlarının 1999'da yaptıkları bir çalışmada, otonom sinir sistemini hedef alan ilaçların kimyasal geciktirmeye etkisi literatürde yer bulmuştur (Banbury, Siemionow, Porvasnik, Petras, & Zins, 1999). Kimyasal geciktirme ve dokuların ön koşullandırılmasında botulinum toksinin etkinliği bir çok çalışmada araştırılmıştır. Kim ve ark.'larının sıçanlar üzerine yaptıkları ve botulinum toksin-A'nın dorsal kutanöz flep sağ kalımını araştırdıkları çalışmada, BTx-A uygulandığı durumda dorsal kutanöz flep sağ kalımının istatistiksel olarak arttığı, bunun da artmış olan VEGF, CD31 ve iNOS gibi proliferasyonu ve vazodilatasyonu uyaran sitokinler ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada BTx-A farkmakolojik olarak cildin otonomik sempatik sinir sistemini hedef alarak, pre-sinapik alanda asetilkolin salınımını engelleyip sempatik nöronları baskılayarak etki gösterdiği belirtilmiştir. Kim ve arkadaşlarının yaptığı dorsal kutanöz flep sağ kalımı ile ilgili bu çalışmada da ideal botulinum toksin dozunun 1.5 Ü BTx-A olduğu tespit edilmiş ve bu dozda yapılan histopatolojik incelemelerde kimyasal ön koşullandırmaya bağlı damarlanmada artış, damarsal büyüme ve genişleme görülmüştür (Kim et al., 2009).

Bizim yaptığımız çalışmada, Kim ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmadan yola çıkarak alıcı ve verici alan ön koşullandırması 1.5 Ü BTx-A ile yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda dorsal alana botulinum toksin uygulanan 8 sıçanın üçünde (%38), alıcı alana botulinum toksin uygulanmayan 32 sıçanın altısında (%19) alıcı saha dikişlerinde açılma görüldü ve bu sıçanlar çalışma dışı tutuldu. Komplikasyon görülen sıçanların tümü tekli kafeslerde takip edilmekteydi. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde, botulinum toksin uygulanan gruplarda, BTx-A uygulanmayan gruplara göre komplikasyon açısından anlamlı bir fark saptanmadığı tespit edildi. Dorsal interskapular bölgeye botulinum toksin uygulanan gruplardaki komplikasyonun göreceli olarak daha fazla görülme sebebi, Favre ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya bağlantılı olarak, botulinum toksinin kas ve hormonal bez fonkiyonlarını inhibe etmesine ek olarak ağrı yolaklarına da etki etmesine bağlanabilir (Favre-Guilmard, Chabrier, & Kalinichev, 2017). BTx-A uygulanan gruptaki sıçanların alıcı alanı daha çok kemirmesinin ve dikişlerde açılmanın daha çok olmasının sebebi, botulinum toksinin etkisi altındaki alıcı alanı daha az hissetmeleri olabilir.

Araştırmamızın sonuçları yağ greftlerindeki ‘hacim ve ağırlık kaybı’ olarak incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak alıcı sahaya BTx-A uygulanan grupta yağ greftlerindeki ağırlık kaybının göreceli olarak daha az olduğu tespit edilmiştir. Tang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile paralel olarak anjiyogenezin, botulinum toksin uygulanan her iki grupta göreceli olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tang et al., 2017). Bizim çalışmamıza ek olarak Tang ve ark.’larının yaptığı çalışmada BTx-A’nın yağ grefti üzerindeki anlamlı etkinin anjiogenez üzerinden değil, proliferasyona sebep olan CD31 ve VEGF gibi sitokinlerin artmasına bağlı olabileceği ortaya konulmuştur.

Casteilla ve arkadaşlarının yaptığı hayvan ve insan çalışmalarında kullanılan yağ yastıkçıklarının histomorfolojik özelliklerine dair bir çalışmada, kemirgenlerde bulunan beyaz ve kahverengi yağ dokusunun çevresel faktörlere ve anatomik bölgelere bağlı olarak çeşitli oranlarda bulunabileceği ortaya konmuştur. Bu çalışmada sıçan ve farelerdeki beyaz yağ dokusunun, kahverengi yağ dokusuna güçlü oranda

dönüşebileceği, bununda yağ dokusundaki hücre plastisitesine bağlı olarak gerçekleştirebileceği ortaya konulmuştur. Yine bu araştırmada, hem kemirgenlerde hem insanlarda kahverengi yağ dokusunun da beyaz yağ dokusuna daha düşük oranda da olsa dönüşebileceği saptanmıştır (Casteilla et al., 2008). Bizim yaptığımız deneyde, multiloküler yağ doku oluşumunun alıcı alana BTx-A yapılan grupta anlamlı olarak artmış olduğu tespit edilmiştir. Casteilla ve ark.'larının yaptığı çalışma göz önüne alındığında, yeni oluşan multiloküler (kahverengi) yağ dokunun, uniloküler (beyaz) yağ dokusundan dönüşüme uğramış olan yağ dokusu olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Multiloküler yağ dokunun alıcı alana botulinum toksin enjeksiyonu yapılan grupta daha fazla olmasının sebebi ve BTx-A'nın yağ dokularındaki dönüşüme etkisi ise ileri araştırmaların konusu olabilir.

Bunlara ek olarak çalışmamızdaki yağ grefti preparatlarının incelenmesi sonucunda, literatüre uygun olarak hasarlı uniloküler yağ dokunun (hücre bütünlüğü bozulmuş hücreler dahil olacak şekilde) botulinum toksin uygulanan her iki grupta daha az miktarda olduğu tespit edilmiştir (Tang et al., 2017) (Baek et al., 2012). Ancak verici alanın BTx-A ile ön koşullandığı grupta hasarlı yağ dokunun istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olarak saptanması, literatüre iki açıdan katkı sağlayabilir. Birincil olarak, verici sahada BTx-A ile ön koşullanmış dokunun proliferasyonu sağlayan sitokinlerin artması ile özellikle kök hücre kaynaklı dokunun da artmış olabileceği ve bu şekilde aktarılan yağ greftinde daha az hasarlı dokunun oluşmuş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu durum daha detaylı çalışmalarda BTx-A'nın verici alandaki adipoz kaynaklı hücreye etkisinin araştırılması ile ortaya konulabilir. İkincil katkı olarak; alıcı alanda BTx-A ile kas kasılması engellenmeksizin sadece verici alanda BTx-A yapılan durumda da hücresel bütünlüğü korunmuş yağ hücrelerin daha fazla olmasıdır. Çünkü bu sonuç, BTx-A'nın yağ grefti üzerinde sağ kalım artırıcı etkisinin sadece kas kasılmasını engelleyerek yapmadığını göstermektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada; alıcı veya verici sahanın botulinum toksin-A ile ön koşullandırıldığı dokular üzerinden uygulanan yağ greftlerinde ağırlık ve hacim kaybı açısından sekiz haftalık süre sonunda anlamlı bir farkın olmadığı, ancak alıcı sahaya BTx-A uygulanan gruptaki yağ greftlerinde ağırlık kaybının göreceli olarak daha az olduğu tespit edilmiştir.

Yağ greftlerinin histopatolojik incelemesinde ise apoptotik hücre varlığı, kist oluşumu ve inflamasyon açısından gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır. İncelenen diğer bir histopatolojik kriter olan anjiogenez açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamış olup, alıcı veya verici sahanın botulinum toksin-A ile ön koşullandırıldığı iki grupta anjiogenezin diğer gruplara göre göreceli olarak artmış olduğu bulunmuştur.

Verici sahanın botulinum toksin-A ile ön koşullandırma uygulandığı gruptaki yağ greftlerinde hasarlı yağ hücrelerinin istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmış olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, alıcı alanın botulinum toksin-A ile ön koşullandırma uygulandığı gruptaki yağ greftlerinde multiloküler yağ doku oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu ortaya konulmuştur. Alıcı veya verici sahanın botulinum toksin-A ile ön koşullandırılan dokulardaki yağ grefti sağ kalım artışının net mekanizması ve bunun adipoz kökenli kök hücre ile ilişkisi ilerleyen çalışmaların konusu olabilir.

7. KAYNAKLAR

Agostini, T., Lazzeri, D., Pini, A., Marino, G., Quattrini, A. L., Bani, D., & Dini, M. (2012). Wet and dry techniques for structural fat graft harvesting: histomorphometric and cell viability assessments of lipoaspirated samples. *Plastic and Reconstructive Surgery, 130*(2), 331e-339e.

Baek, R. M., Park, S. O., Jeong, E. C., Oh, H. S., Kim, S. W., Minn, K. W., & Lee, S. Y. (2012). The effect of botulinum toxin A on fat graft survival. *Aesthetic plastic surgery, 36*(3), 680-686.

Banbury, J., Siemionow, M., Porvasnik, S., Petras, S., & Zins, J. E. (1999). Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plastic and reconstructive surgery, 104*(3), 730-737.

Benavides, F., Oberyszyn, T. M., VanBuskirk, A. M., Reeve, V. E., & Kusewitt, D. F. (2009). The hairless mouse in skin research. *Journal of dermatological science, 53*(1), 10-18.

Bernard, R. W., & Beran, S. J. (2003). Autologous fat graft in nipple reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery, 112*(4), 964-968.

Black, J. D., & Dolly, J. O. (1986). Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology, 103*(2), 535-544.

Brin, M. F. (1997). Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle & nerve, 20*(S6), 146-168.

Brin, M. F., Hallett, M., & Jankovic, J. (2002). *Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxin*: Lippincott Williams & Wilkins.

Brooks, V. (1964). The pharmacological action of botulinum toxin. *US Public Health Serv. Publ*, 105-111.

Cárdenas, J. C., & Carvajal, J. (2007). Refinement of rhinoplasty with lipoinjection. *Aesthetic plastic surgery, 31*(5), 501-505.

Carpaneda, C. A., & Ribeiro, M. T. (1994). Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic plastic surgery, 18*(1), 17-19.

Casteilla, L., Pénicaud, L., Cousin, B., & Calise, D. (2008). Choosing an adipose tissue depot for sampling. In *Adipose tissue protocols* (pp. 23-38): Springer.

Chenwang, D., Shiwei, B., Dashan, Y., Qiang, L., Bin, C., Muxin, Z., . . . Senkai, L. (2009). Application of botulinum toxin type A in myocutaneous flap expansion. *Plastic and reconstructive surgery, 124*(5), 1450-1457.

Chiu, D. (1990). Repair and grafting of dermis fat and fascia. *Plastic surgery, 1*, 516-520.

Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., & Nagy, T. R. (2016). Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Frontiers in nutrition, 3*, 10.

Coleman, S. R. (1997). Facial recontouring with lipostructure. *Clinics in plastic surgery, 24*(2), 347-367.

Coleman, S. R. (2001). Structural fat grafts: the ideal filler? *Clinics in plastic surgery, 28*(1), 111-119.

Coleman, S. R., & Carraway, J. H. (2002). Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plastic and reconstructive surgery, 110*(7), 1731-1744.

Coleman, S. R., & Katzel, E. B. (2015). Fat grafting for facial filling and regeneration. *Clinics in plastic surgery, 42*(3), 289-300.

Contarino, M. F., Van Den Dool, J., Balash, Y., Bhatia, K., Giladi, N., Koelman, J. H., . . . Relja, M. (2017). Clinical Practice: evidence-based recommendations for the treatment of cervical dystonia with botulinum Toxin. *Frontiers in neurology, 8*, 35.

Cortese, A., Savastano, G., & Felicetta, L. (2000). Free fat transplantation for facial tissue augmentation. *Journal of oral and maxillofacial surgery, 58*(2), 164-169.

Del Vecchio, D., & Rohrich, R. J. (2012). A classification of clinical fat grafting: different problems, different solutions. *Plastic and reconstructive surgery, 130*(3), 511-522.

Dertzbaugh, M. T., & West, M. W. (1996). Mapping of protective and cross-reactive domains of the type A neurotoxin of Clostridium botulinum. *Vaccine, 14*(16), 1538-1544.

Doi, K., Ogata, F., Eto, H., Kato, H., Kuno, S., Kinoshita, K., . . . Yoshimura, K. (2015). Differential contributions of graft-derived and host-derived cells in tissue regeneration/remodeling after fat grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery, 135*(6), 1607-1617.

Dutton, J. J., & Buckley, E. G. (1988). Long-term results and complications of botulinum A toxin in the treatment of blepharospasm. *Ophthalmology, 95*(11), 1529-1534.

Erbguth, F. (2008). From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *Journal of neural transmission, 115*(4), 559-565.

Erdim, M., Tezel, E., Numanoglu, A., & Sav, A. (2009). The effects of the size of liposuction cannula on adipocyte survival and the optimum temperature for fat graft storage: an experimental study. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 62*(9), 1210-1214.

Ersek, R. A. (1991). Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plastic and Reconstructive Surgery, 87*(2), 219-227; discussion 228.

Eto, H., Kato, H., Suga, H., Aoi, N., Doi, K., Kuno, S., & Yoshimura, K. (2012). The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plastic and reconstructive surgery, 129*(5), 1081-1092.

Favre-Guilmard, C., Chabrier, P. E., & Kalinichev, M. (2017). Bilateral analgesic effects of abobotulinumtoxinA (Dysport®) following unilateral administration in the rat. *European Journal of Pain, 21*(5), 927-937.

Fournier, P. F., & Otteni, F. M. (1983). Lipodissection in body sculpturing: the dry procedure. *Plastic and reconstructive surgery, 72*(5), 598-609.

Goldwyn, R. M. (1988). Unproven treatment: whose benefit, whose responsibility? *Plastic and reconstructive surgery, 81*(6), 946-947.

Greene, P., Fahn, S., & Diamond, B. (1994). Development of resistance to botulinum toxin type A in patients with torticollis. *Movement Disorders, 9*(2), 213-217.

Gugerell, A., Kober, J., Schmid, M., Nickl, S., Kamolz, L., & Keck, M. (2014). Botulinum toxin A and lidocaine have an impact on adipose-derived stem cells, fibroblasts, and mature adipocytes in vitro. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 67*(9), 1276-1281.

Gutowski, K. A., & Force, A. F. G. T. (2009). Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plastic and reconstructive surgery, 124*(1), 272-280.

Guyuron, B., & Majzoub, R. K. (2007). Facial augmentation with core fat graft: a preliminary report. *Plastic and reconstructive surgery, 120*(1), 295-302.

Hang-Fu, L., Marmolya, G., & Feiglin, D. H. (1995). Liposuction fat-fillant implant for breast augmentation and reconstruction. *Aesthetic plastic surgery, 19*(5), 427-437.

Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2002). Structural view of botulinum neurotoxin in numerous functional states. *Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxin. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 11*, 28.

Hausman, G., & Richardson, R. (2004). Adipose tissue angiogenesis. *Journal of animal science, 82*(3), 925-934.

Hu, S., Zhang, H., Feng, Y., Yang, Y., Han, X., Han, X., . . . Shi, J. (2007). Introduction of an easy technique for purification and injection of autogenous free fat parcels in correcting of facial contour deformities. *Annals of plastic surgery, 58*(6), 602-607.

Huang, W., Foster, J. A., & Rogachefsky, A. S. (2000). Pharmacology of botulinum toxin. *Journal of the American academy of dermatology, 43*(2), 249-259.

Hudson, D. A., Lambert, E. V., & Bloch, C. E. (1990). Site selection for fat autotransplantation: some observations. *Aesthetic plastic surgery, 14*(1), 195-197.

Hunting, C., Noort, W., & Zwaginga, J. (2005). Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization. *Vox sanguinis, 88*(1), 1-9.

Hutson, R. A., Collins, M. D., East, A. K., & Thompson, D. E. (1994). Nucleotide sequence of the gene coding for non-proteolyticClostridium botulinum type B neurotoxin: Comparison with other clostridial neurotoxins. *Current microbiology, 28*(2), 101-110.

Janis, J. E. (2014). *Essentials of plastic surgery*: CRC Press.

Jost, W. H., & Kohl, A. (2001). Botulinum toxin: evidence-based medicine criteria in rare indications. *Journal of neurology, 248*(1), I39-I44.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (2003). *Basic histology: text & atlas* (Vol. 11): McGraw-Hill New York.

Kakagia, D., & Pallua, N. (2014). Autologous fat grafting: in search of the optimal technique. *Surgical innovation, 21*(3), 327-336.

Karaçal, N., Çobanoğlu, Ü., Ambarcioğlu, Ö., & Kutlu, N. (2007). The effect of fibrin glue on fat graft survival. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery, 60*(3), 300-303.

Kashkouli, M. B., Amani, A., Jamshidian-Tehrani, M., Yousefi, S., & Jazayeri, A. A. (2014). Eighteen-point abobotulinum toxin a upper face rejuvenation: an eye plastic perspective on 845 subjects. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery, 30*(3), 219-224.

Kim, T. K., Oh, E. J., Chung, J. Y., Park, J. W., Cho, B. C., & Chung, H. Y. (2009). The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 62*(7), 906-913.

Klein, A. W. (2001). *Complications and adverse reactions with the use of botulinum toxin.* Paper presented at the Seminars in cutaneous medicine and surgery.

Klein, J. A. (1993). Tumescent technique for local anesthesia improves safety in large-volume lipoauction. *Plastic and reconstructive surgery, 92*(6), 1085-1098.

Klinger, M., Caviggioli, F., Klinger, F. M., Giannasi, S., Bandi, V., Banzatti, B., . . . Vinci, V. (2013). Autologous fat graft in scar treatment. *Journal of Craniofacial Surgery, 24*(5), 1610-1615.

Kølle, S.-F. T., Fischer-Nielsen, A., Mathiasen, A. B., Elberg, J. J., Oliveri, R. S., Glovinski, P. V., . . . Talman, M.-L. M. (2013). Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet, 382*(9898), 1113-1120.

Li, K., Li, F., Li, J., Wang, H., Zheng, X., Long, J., . . . Tian, W. (2017). Increased survival of human free fat grafts with varying densities of human adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 11*(1), 209-219.

Li, L., Pan, S., Ni, B., & Lin, Y. (2014). Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF–PLA nano-sustained release microspheres. *Cell biology international, 38*(8), 962-970.

Lu, F., Li, J., Gao, J., Ogawa, R., Ou, C., Yang, B., & Fu, B. (2009). Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery, 124*(5), 1437-1446.

Lujan-Hernandez, J., Appasani, R., Sullivan, K., Siegel-Reamer, L., & Lalikos, J. F. (2017). Experimental In-Vivo Models Used in Fat Grafting Research for Volume Augmentation in Soft Tissue Reconstruction. *Archives of plastic surgery, 44*(5), 361.

Matarasso, S. L. (1998). Complications of botulinum A exotoxin for hyperfunctional lines. *Dermatologic surgery, 24*(11), 1249-1254.

Montecucco, C., & Schiavo, G. (1995). Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Quarterly reviews of biophysics, 28*(4), 423-472.

Münchau, A., & Bhatia, K. (2000). Regular review: Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ: British Medical Journal, 320*(7228), 161.

Naumann, M., Boo, L. M., Ackerman, A. H., & Gallagher, C. J. (2013). Immunogenicity of botulinum toxins. *Journal of neural transmission, 120*(2), 275-290.

Neligan, P. C., & Warren, R. J. (2012). *Plastic Surgery-Aesthetic* (Vol. 2): Elsevier Health Sciences.

Niemelä, S., Miettinen, S., Sarkanen, J., & Ashammakhi, N. (2008). Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. *Topics in tissue engineering, 4*(1), 26.

Park, B., Kong, J. S., Kang, S., & Kim, Y. W. (2011). The effect of epidermal growth factor on autogenous fat graft. *Aesthetic plastic surgery, 35*(5), 738-744.

Pellizzari, R., Rossetto, O., Schiavo, G., & Montecucco, C. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 354*(1381), 259-268.

Piasecki, J. H., Gutowski, K. A., Lahvis, G. P., & Moreno, K. I. (2007). An experimental model for improving fat graft viability and purity. *Plastic and reconstructive surgery, 119*(5), 1571-1583.

Pickett, A., & Hambleton, P. (1994). Dose standardisation of botulinum toxin. *The Lancet, 344*(8920), 474-475.

Pu, L. L. (2016). Mechanisms of fat graft survival. *Annals of plastic surgery, 77*, S84-S86.

Pu, L. L., Coleman, S. R., Cui, X., Ferguson Jr, R. E., & Vasconez, H. C. (2008). Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study. *Plastic and reconstructive surgery, 122*(3), 932-937.

Pu, L. L., Yoshimura, K., & Coleman, S. R. (2015). Fat Grafting: Current Concept, Clinical Application, and Regenerative Potential, Part 2. *Clinics in plastic surgery, 42*(3), xiii-xiv.

Rennekampff, H., Reimers, K., Gabka, C., Germann, G., Giunta, R., Knobloch, K., . . . Heimburg, D. (2010). Current perspective and limitations of autologous fat transplantation--" consensus meeting" of the German Society of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons at Hannover; September 2009. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft fur Handchirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft fur Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefasse: Organ der V... 42*(2), 137-142.

Restrepo, J. C. C., & Ahmed, J. A. M. (2002). Large-volume lipoinjection for gluteal augmentation. *Aesthetic surgery journal, 22*(1), 33-38.

Roberts III, T. L., Toledo, L. S., & Badin, A. Z. (2001). Augmentation of the buttocks by micro fat grafting. *Aesthetic surgery journal, 21*(4), 311-319.

Rohrich, R. J., Sorokin, E. S., & Brown, S. A. (2004). In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plastic and reconstructive surgery, 113*(1), 391-395.

Rose Jr, J. G., Lucarelli, M. J., Lemke, B. N., Dortzbach, R. K., Boxrud, C. A., Obagi, S., & Patel, S. (2006). Histologic comparison of autologous fat processing methods. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery, 22*(3), 195-200.

Scott, A. B. (2004). Development of botulinum toxin therapy. *Dermatologic clinics, 22*(2), 131-133.

Serra-Mestre, J. M., Serra-Renom, J. M., Martinez, L., Almadori, A., & D'Andrea, F. (2014). Platelet-rich plasma mixed-fat grafting: a reasonable prosurvival strategy for fat grafts? *Aesthetic plastic surgery, 38*(5), 1041-1049.

Sezgin, B., Ozmen, S., Bulam, H., Omeroglu, S., Yuksel, S., Cayci, B., & Peker, T. (2014). Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 67*(5), 712-720.

Shi, Y., Yuan, Y., Dong, Z., Gao, J., & Lu, F. (2016). The fate of fat grafts in different recipient areas: Subcutaneous plane, fat pad, and muscle. *Dermatologic Surgery, 42*(4), 535-542.

Sirinoglu, H., Yesiloglu, N., Kaya, Ö. T., Ercan, F., & Filinte, G. T. (2017). Effects of Tumescent Solution on Fat Survival. *Facial Plastic Surgery, 33*(03), 339-346.

Snipe, P. T., & Sommer, H. (1928). Studies on Botulinus Toxin: 3. Acid Precipitation of Botulinus Toxin [with Discussion]. *The Journal of Infectious Diseases*, 152-160.

Sorisky, A., & Gagnon, A. (2002). Clinical implications of adipose tissue remodelling: adipogenesis and apoptosis. *Canadian Journal of Diabetes, 26*(3), 232-240.

Strong, A. L., Cederna, P. S., Rubin, J. P., Coleman, S. R., & Levi, B. (2015). The current state of fat grafting: a review of harvesting, processing, and injection techniques. *Plastic and reconstructive surgery, 136*(4), 897.

Suga, H., Eto, H., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., Doi, K., . . . Yoshimura, K. (2010). Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plastic and reconstructive surgery, 126*(6), 1911-1923.

Swartling, C., Färnstrand, C., Abt, G., Stålberg, E., & Naver, H. (2001). Side-effects of intradermal injections of botulinum A toxin in the treatment of palmar hyperhidrosis: a neurophysiological study. *European journal of neurology, 8*(5), 451-456.

Tang, Q., Chen, C., Wang, X., Li, W., Zhang, Y., Wang, M., . . . Tian, W. (2017). Botulinum toxin A improves adipose tissue engraftment by promoting cell proliferation, adipogenesis and angiogenesis. *International journal of molecular medicine, 40*(3), 713-720.

Tanzi, M. C., & Farè, S. (2009). Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert review of medical devices, 6*(5), 533-551.

Tholpady, S. S., Llull, R., Ogle, R. C., Rubin, J. P., Futrell, J. W., & Katz, A. J. (2006). Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clinics in plastic surgery, 33*(1), 55-62.

Trepsat, F. (2003). Periorbital rejuvenation combining fat grafting and blepharoplasties. *Aesthetic plastic surgery, 27*(4), 243-253.

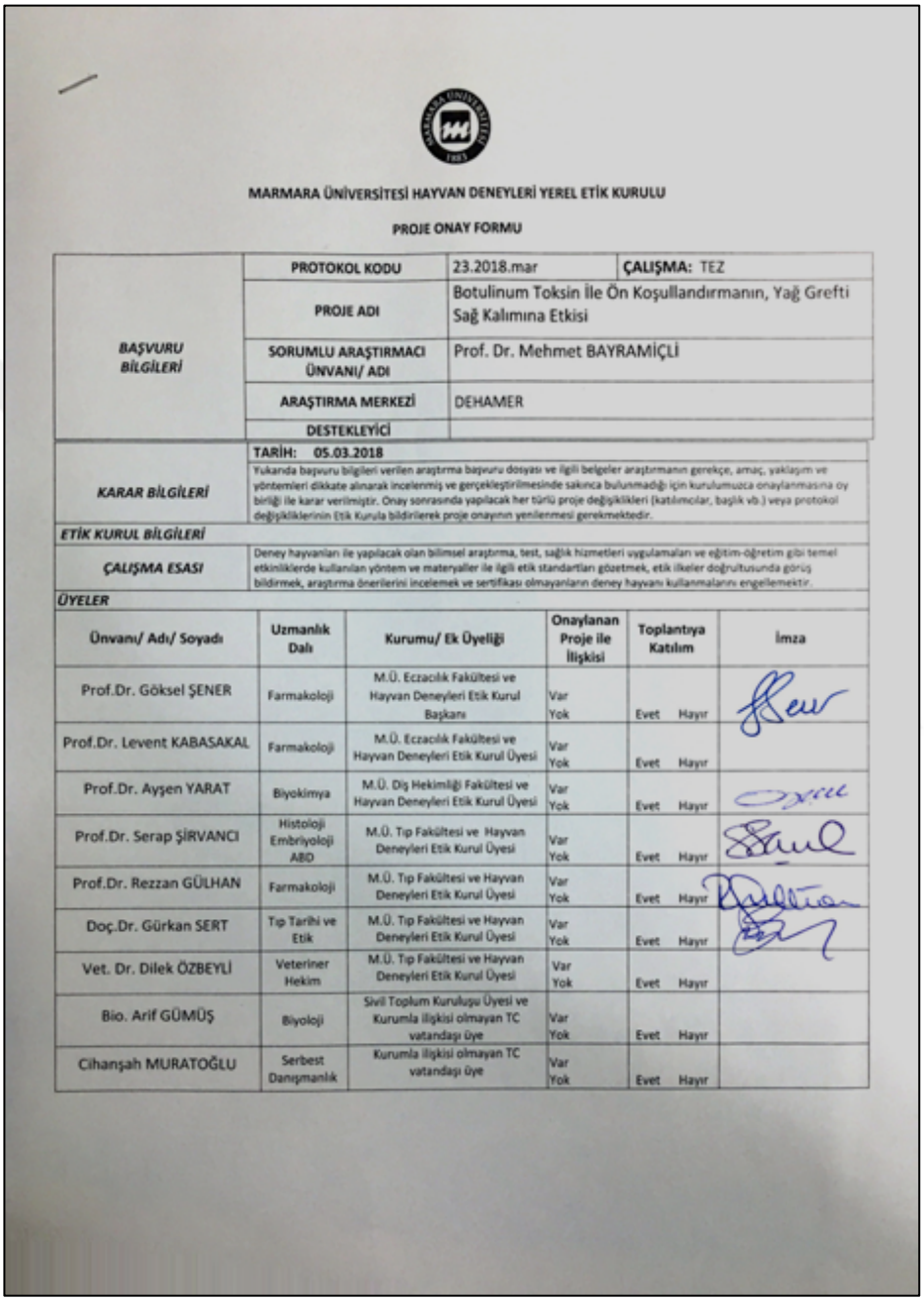
Xiao, Z., Zhang, M., Liu, Y., & Ren, L. (2011). Botulinum toxin type a inhibits connective tissue growth factor expression in fibroblasts derived from hypertrophic scar. *Aesthetic plastic surgery, 35*(5), 802-807.

Xiong, B.-J., Tan, Q.-W., Chen, Y.-J., Zhang, Y., Zhang, D., Tang, S.-L., . . . Lv, Q. (2018). The Effects of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells on Neovascularization and Fat Graft Survival. *Aesthetic plastic surgery*, 1-8.

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

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	23.2018.mar	ÇALIŞMA: TEZ
	PROJE ADI	Botulinum Toksin İle Ön Koşullandırmanın, Yağ Grefti Sağ Kalımına Etkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Mehmet BAYRAMİÇLİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER	
	DESTEKLEYİCİ		
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 05.03.2018 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.		

ÜYELER

Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

8.2. BAPKO Proje Onayı

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
DESTEKLEME SÖZLEŞMESİ
Proje No: SAG-C-TUP-090518-0224

1. TARAFLAR:

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri adına Rektör veya ilgili Rektör Yardımcısı ile Proje Yürütücüsü arasında aşağıdaki şartlarla bu araştırma projesi sözleşmesi yapılmış ve taraflarca imzalanmıştır.

2. TANIMLAR:

a) Bu sözleşmenin bundan sonraki kısımlarında Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri "Komisyon", Proje Yürütücüsü Prof.Dr. MEHMET NURİ BAYRAMİÇLİ "yürütücü", kabul edilen proje önerisi "proje" ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi "Yönerge" olarak alınacaktır.
b) Bu sözleşmenin konusu "BOTULİNUM TOKSİN İLE ÖN KOŞULLANDIRMANIN, YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMINA ETKİSİ" başlıklı SAĞLIK C-TUP projesinin Komisyon tarafından sözleşmede gösterilen şekilde desteklenmesidir.

3. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN GÖREVLERİ:

a) Projenin, bu sözleşme ekinde belirtilen program içinde, öngörülen süre, amaç, kapsam ve diğer hususlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasından proje yürütücüsü sorumludur.
b) Desteklenmesi kabul edilmiş projenin amaç, kapsam, süre, program ve bütçesinde Komisyon`un yazılı izni alınmadan hiçbir değişiklik yapılamaz.
c) Proje yürütücüsü; proje süresince herhangi bir sebepten dolayı ayrılması halinde yürütücü değişikliği işlemleri tamamlanmadan ilişik kesemez.

4. ARAÇ, GEREÇ VE DONANIM:

a) Proje bütçesi ile temin edilen mal ve malzemeler Taşınır Mal Yönetmeliği Hükümleri`ne tabiidir.
b) Bu teçhizat proje süresince, proje yürütücüsünün gözetimi ve sorumluluğu altındadır.

5. GELİŞME RAPORLARI:

a) Kabul edilen C, D ve tümü diğer kurumlar tarafından desteklenen projeler hariç araştırma projesinin yürütücüsü, BAP birimi başkanlığına altı ayda bir geçmiş dönemdeki çalışmalarla ilgili bilgilerin yer aldığı gelişme raporu sunar.
b) Gelişme raporları zamanında gönderilmediği ve kabul edilebilir özür bildirilmediği takdirde Komisyon Kararı ile rapor gelene kadar proje durdurulur ve bu süre içinde hiçbir ödeme yapılmaz.
c) Komisyon tarafından kısmen veya tamamen desteklenen projeler gerektiğinde yerinde inceleme yoluyla, Komisyon`ca görevlendirilen diğer Komisyon Üyesi (Proje izleyicisi) tarafından izlenir. Proje Yürütücüleri, Proje izleyicisinin talep ettiği her türlü bilgi ve belgeyi vermekle yükümlüdürler.

6.KESİN RAPOR:

a) A ve B Tipi Projeler: Bu tip projelerden, Marmara Üniversitesi atama ve yükseltme ölçütlerinde benimsenen uluslar arası bir bilimsel makale veya kitap içerisinde bölüm niteliğinde yayın beklenir. Bu şekilde yapılmış bir yayın/patent varsa, sonuç raporu olarak benimsenir. Aynı yürütücünün bir sonraki veya aynı dönemde aynı kategoride ikinci bir proje alabilmesi için bu yayın koşulunu sağlamış olması gerekir. Bir dergi tarafından değerlendirilmesi yapılmakta olan yayın için BAPKO karar verir. Bu koşulların yerine getirilmediği durumlarda BAP birimi başkanlığına kesin rapor sunulur.
b) C Tipi Projeler: Bu proje çerçevesinde desteklenen bir yüksek lisans, doktora veya tıpta uzmanlık projesi, tezin veya sanatta yeterlik (tez/sergi/proje) çalışmasının tamamlanması ile sonuçlanmış olur. Teze ait bir adet CD ve jüri tutanağı BAP birimi başkanlığına iletilir.
c) D Tipi Projeler: Proje yürütücüsü, bu kapsamda desteklenen projelerde, proje gerekçelerinin ve hedeflerinin gerçekleştiğini belirten bir raporu BAP birimi başkanlığına sunar.
d) E Tipi Projeler: Proje yürütücüsü verilen desteğin ne şekilde sonuçlandırıldığını ve alt yapının nasıl kullanılabilir hale geldiğini gösteren bir kesin raporu BAP birim başkanlığına sunar. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından yerinde incelenir.
e) F Tipi Projeler: Bu kapsamda desteklenen projelerde, projeyi destekleyen kuruluş tarafından proje gerekçelerinin ve hedeflerinin gerçekleştiğini belirten bir belge istenir. Gizlilik aranmayan projelerin sonuçlandırılması A ve B tipi projelerde olduğu gibi yapılır.
f) I Tipi Projeler: Bu kapsamda desteklenen projelerin sonuçlandırılması için hazırlanan bir rapor ders araç ve gereçleri ile ilgili Fakülte/Yüksekokul/Enstitü/Merkez müdürlükleri birimlerinde oluşturulan Strateji Planlama Komisyonuna sunulur. Bu komisyon görüşlerini bir kesin rapor halinde BAP birimi başkanlığına sunar.

7. GÜVENLİK TEDBİRLERİ:

Proje yürütücüsü, proje yerinde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından İş Kanunu, Sosyal Sigortalar Kanunu ve ilgili diğer kanun, tüzük ve yönetmeliklere göre gerekli her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından sorumludur.

8. GİZLİLİK:

Proje yürütücüsü, projeyle ilgili olarak elde edilecek bilgilerin gizliliğinin korunması bakımından Kurum`a karşı sorumludur.

9. PATENT VE TELİF HAKLARI:

a) Projenin gerçekleştirilmesi sonucunda bir ihtira geldiği takdirde, bu ihtiradan dolayı usulüne uygun olarak istihsal edilecek patentin %30`u Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna, % 70`i Prof.Dr. MEHMET NURİ BAYRAMİÇLİ, Tıp. Uzm. Öğr. SAMET ŞENDUR aittir. Ancak, patent alındığının Kurum`a bildirilmesi zorunlu olup patentin yurtdışına satılması veya kiralanması kurumun iznine tabidir. Projeden elde edilen bilimsel sonuçların telif hakkı Marmara Üniversitesine aittir. Aksi taktirde her iki durumdada yasal işlem uygulanır.
b) Proje yürütücüsünün proje bitiminden itibaren 2 yıl içerisinde Sağlık ve Fen Bilimleri için Science Citation Index`te, Sosyal ve Eğitim Bilimleri için ise Uluslar arası bir bilimsel makale, sergi veya kitap içerisinde bölüm niteliğinde yayına dönüştürmesi zorunludur. Bu yayının bilgilendirme kısmında çalışmanın Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından SAG-C-TUP-090518-0224 proje numarası ile desteklendiği mutlaka belirtilecektir.

10. DESTEK MİKTARI

a) Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu`nca projeye 22,111.54 TL destek sağlanacaktır.
b) Bu sözleşme 09.05.2018 tarihinden 09.05.2019 tarihine kadar yürürlüktedir.
c) Bu sözleşme ile öngörülen toplam maddi destek miktarı ve buna ait ödeme planında, Komisyon`a tahsis edilen bütçe imkânları ile Komisyon`a nakit akışında meydana gelebilecek kısıntıların sebep olacağı aksamalar mücbir sebep olarak kabul edilir ve bundan ötürü taraflar sorumlu tutulamaz.

11. SÖZLEŞMENİN UZATILMASI:

A, B, E ve I tipi Bilimsel Araştırma Projeleri en çok üç yıl içinde tamamlanır. Proje yürütücüsünün gerekçeli başvurusu üzerine, proje süresi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu`nun kararı ile 1 (bir) yıl uzatılabilir.

12. UYGULAMA VE YÜRÜTME

Bu sözleşmede yer almayan hususlarda Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi ve Yüksek Öğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik hükümleri uygulanır.

TARİH:...../...../2018

Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Mehmet AKALIN
Rektör Yardımcısı
Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanı

Yürütücü

Prof.Dr. MEHMET NURİ BAYRAMİÇLİ

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Samet	**Soyadı**	Şendur
Doğum Yeri	İstanbul	**Doğum Tarihi**	24.02.1988
Uyruğu	T.C	**Tel**	(535) 211 73 69
E-mail	sametsendur@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/ Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı	-
Lisans	İstanbul Üniversitesi - İstanbul Tıp Fakültesi	2012
Lise	Kabataş Erkek Lisesi	2005

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
	Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	5 yıl (2013-)

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
		7.5						

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer)			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office, Keynote	Çok iyi