

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

KOLAJEN BİNDİNG DOMAİN İÇEREN VEGF'İN YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMI ÜZERİNE ETKİSİ

DENEYSEL ÇALIŞMA

DR. FATİH İÇBUDAK

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2024

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

KOLAJEN BİNDİNG DOMAİN İÇEREN VEGF'İN YAĞ GREFTİ SAĞ KALIMI ÜZERİNE ETKİSİ

DENEYSEL ÇALIŞMA

DR. FATİH İÇBUDAK

UZMANLIK TEZİ

Danışman: DOÇ. DR. ZEYNEP DENİZ AKDENİZ DOĞAN

İSTANBUL 2024

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimimin ilk gününden itibaren tecrübe ve bilgisiyle mesleki deneyimimin gelişmesinde büyük katkıları olan anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Bayramiçli'ye ve tez çalışma sürecinde desteğini esirgemeyen, mesleki gelişimimde büyük rol oynayan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Zeynep Deniz Akdeniz Doğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve becerilerinden büyük kazanımlar edindiğim emekli öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Özhan Bekir Çelebiler ve Sn. Prof. Dr. Erdem Tezel'e; bilimsellik ve cerrahi beceri anlamında yetişmemde büyük katkısı bulunan Sayın Prof. Dr. Bülent Saçak'a, Sayın Doç. Fatma Nihal Durmuş Kocaaslan'a, Sayın Doç. Dr. Dağhan Dağdelen'e, Sayın Doç. Dr. Ahmet Hamdi Sakarya'ya ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şeyda Güray'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bugünlere gelmemde en büyük katkıyı sağlayan aileme; anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Dr. Fatih İçbudak

İmza

ÖZET

Giriş ve Amaç: Yağ greftleme hem estetik hem de rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Ancak, greft sağkalımı ve hacim korunumu, bu prosedürün en önemli zorlukları arasında yer almaktadır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenezi destekleyerek greft sağkalımını artırma potansiyeline sahiptir, ancak kısa yarı ömrü etkinliğini sınırlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, kolajen bağlanma bölgesi içeren modifiye VEGF (CBD-VEGF) kullanarak yağ grefti sağkalımını artırıp artırmayacağını ve özellikle radyoterapi (RT) sonrası fibrotik dokularda bu etkinin nasıl gerçekleştiğini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, 24 adet Spraque Dawley cinsi sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Sıçanların sırt bölgesine genel anestezi altında RT uygulanarak fibrotik doku oluşumu indüklendi ve hayvanlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı. RT işleminden 1 ay sonra Grup 1'e yalnızca yağ grefti, grup 2'ye VEGF ile yağ grefti, grup 3'e ise CBD-VEGF ile yağ grefti uygulanmıştır. 2 ay sonra yağ greftleri diseke edilerek ağırlık ölçümü ve immünohistokimya analizi yapıldı. Fibrozis, nekroz, CD31 pozitifliği (mikrovasküler yoğunluk) ve perilipin pozitifliği (adiposit sağkalımı) gibi parametreler değerlendirildi.

Bulgular: Grup 3'te yağ grefti ağırlığı hem grup 1 hem de grup 2'ye kıyasla yüksek bulundu.($p<0,01$). Fibrozis skoru grup 3'te grup 1'e kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. ($p<0,01$). Benzer şekilde nekroz skoru ise grup 3'te grup 1'e kıyasla düşük bulundu. ($p<0.05$). CD31 pozitiflik skoru grup 3'te grup 1'e kıyasla anlamlı olarak yüksek, perilipin pozitifliği ise, grup 3'te hem grup 2 hem de grup 1'e kıyasla anlamlı olarak yüksek gözlendi. (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,05$)

Sonuç: Elde edilen bu bulgular, CBD-VEGF'nin yağ greftleme işlemlerinde RT sonrasında fibröz doku gelişimine karşı klinik olarak kullanılabilecek potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: CBD-VEGF, Radyoterapi, Vasküler endotelyal büyüme faktörü.

ABSTRACT

Aim: Fat grafting is a technique widely used in both aesthetic and reconstructive surgery. However, graft survival and volume retention remain significant challenges in this procedure. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has the potential to enhance graft survival by promoting angiogenesis, but its short half-life limits its efficacy. The aim of this study is to evaluate whether the use of modified VEGF with a collagen-binding domain (CBD-VEGF) can improve fat graft survival, particularly in fibrotic tissues induced by radiotherapy (RT).

Materials and Method: This study was performed using 24 Spraque Dawley rats. Fibrotic tissue formation was induced by applying radiation therapy(RT) to the back region of the rats under general anesthesia, and the animals were randomly divided into three groups.1 month after RT, fat graft alone was applied to Group 1, fat graft with VEGF was applied to Group 2, and fat graft with CBD-VEGF was applied to Group 3. After 2 months, fat grafts were dissected and weight was measured and immunohistochemistry was analyzed. Parameters such as fibrosis, necrosis, CD31 positivity (microvascular density) and perilipin positivity (adipocyte survival) were evaluated.

Results: The fat graft weight in group 3 was found to be significantly higher compared to both group 1 and group 2 ($p<0.01$). The fibrosis score in group 3 was significantly lower compared to group 1 ($p<0.01$). Similarly, the necrosis score was lower in group 3 compared to group 1 ($p<0.05$). The CD31 positivity score in group 3 was significantly higher compared to group 1, and perilipin positivity was significantly higher in group 3 compared to both group 2 and groud 1. ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively).

Conclusion: These findings suggest that CBD-VEGF may be considered as a potential therapeutic agent in fat grafting procedures, particularly for preventing fibrous tissue development following RT.

Keywords: CBD-VEGF, Radiotherapy, Vascular Endothelial Growth Factor.

İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖNSÖZ I

ÖZET II

ABSTRACT III

İÇİNDEKİLER TABLOSU IV

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VII

ŞEKİLLER, TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ X

1. GİRİŞ VE AMAÇ. 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. YAĞ GREFTLEME 3

2.1.1. TANIM VE PROSEDÜR 3

2.1.2. PROSEDÜR 4

2.1.2. YAĞ GREFTLEMEDE KARŞILAŞILAN ZORLUKLAR 6

2.2. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ 8

2.2.1. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ EKSPRESYONU VE DÜZENLENMESI 10

2.2.2. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE ANJIYOGENEZ 10

2.2.2. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE YAĞ GREFTI 14

2.4. CBD-VEGF 14

2.5. RADYOTERAPI KAYNAKLI FIBROZIS VE YAĞ GREFTI ÜZERINE ETKILERI 15

3. GEREÇ VE YÖNTEM 17

3.1. MATERYELLER 17

3.1.1. BAKTERIYEL SUŞLAR 17

3.1.2. KLONLAMA VEKTÖRLERI 17

3.2. YÖNTEMLER 17
3.2.1. GEN KLONLAMA VE TRANSFORMASYON 18
3.2.2. PROTEIN EKSPRESYONU 18
3.2.3. PROTEIN SAFLAŞTIRMA 18
3.2.4. HIS-TAG KESIMI VE PROTEIN SAFLAŞTIRMA 19
3.3.PROTEIN MIKTAR TAYINI 19
3.4. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI 19
3.5. DENEY PLANI 20
3.6. ANESTEZI UYGULAMASI 20
3.7. CERRAHI TEKNIK 21
3.8. RADYOTERAPI UYGULANMASI 22
3.8.1. SIMÜLASYON VE PLANLAMA 22
3.9. SAKRIFIKASYON VE ÖRNEKLERIN ALINMASI 24
3.10. HISTOLOJIK ANALIZLER 25
3.11. İMMÜNOHISTOKIMYASAL ANALIZLER 25
3.13. İSTATISTIKSEL ANALIZ 26
4. BULGULAR 27
5. TARTIŞMA 31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 36
7. KAYNAKLAR 37
8. EKLER 56
8.1. ETIK KURUL ONAY FORMU 56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

• °C	Santigrat derece
• µg	Mikrogram
• AKT	Protein kinaz B
• BCA	Bikinkoninik asit
• BT	Bilgisayarlı tomografi
• CBD	Kolajen bağlanma bölgesi
• CBD-VEGF	Kolajen bağlanma bölgesi içeren VEGF
• ECM	Hücre dışı matris
• EH	Endotel hücre
• eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
• ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
• FAK	Fokal adhezyon kinaz
• FGF2	Fibroblast büyüme faktörü 2
• FGFR1	Fibroblast büyüme faktörü reseptör 1
• Flt-1	Fms benzeri tirozin kinaz-1
• gr	Gram
• GTV	Gross Tümör Hacmi
• HIF	Hipoksi ile indüklenen faktör
• HRE	Hipoksiye duyarlı element

- HSPG Heparan sülfat proteoglikan
- IL İnterlökin
- iNOS İndüklenebilir nitrik oksit sentazın
- KDR Kinaz ekleme alanı içeren reseptör
- LB Luria Bertani
- MAPK Mitojenle aktive olan protein kinaz
- ml Mililitre
- mm Milimetre
- nm Nanometre
- NO Nitrik oksit
- NOS Nitrik oksit sentaz
- NRP1 Nöropilin 1
- NRP2 Nöropilin 2
- p38 MAPK p38 mitojenle aktive olan protein kinaz
- PCR Polimeraz zincir reaksiyonu
- PI3K Fosfoinositid 3-kinaz
- PKC Protein kinaz C
- PLCγ Fosfolipaz C izoform-gama
- PLGF Plasental büyüme faktörü
- PTV Planlanan Hedef Hacim

- RAC — Ras ile ilişkili C3 Botulinum toksin substratı
- RT — Radyoterapi
- SRC — Proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src
- sVEGFR1 — Çözünür VEGFR
- svVEGF — Yılan zehri VEGF
- TGF — Dönüştürücü büyüme faktörü
- VEGF — Vasküler endotelyal büyüme faktörü
- VEGF-E — Viral VEGF (Orf-VEGF)
- VEGFR — Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
- VMAT — Volumetrik Ark Radyoteapi
- α — Alfa
- β — Beta
- γ — Gama

ŞEKİLLER, TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1. (a) Farklı VEGF izoformlarının VEGF reseptörü üzerinden etkilediği hücre içi yolaklar ve hücresel süreçler. (b) Farklı VEGF izoformlarının HSPG'lere bağlanma mekanizmaları ve *Vegf* genlerinin farklı izoformları (13). 9

Şekil 2. Yağ greftinin sırtta oluşturulan cebe yerleştirilmesi.....21

Şekil 3. A. Aksiyel BT kesitleri. **B.** 3 boyutlu ışınlama görüntüsü ve **C.** Tedavi Planlaması ve Doz-Volüm Histogramı 23

Şekil 4. (A) Tedavi öncesi pozisyonlamanın CBCt ile belirlenmesi. **(B)** Sıçanların ışınlanması.....24

Şekil 5. Yağ greftlerinin ağırlıkları.....27

Şekil 6. Grupların **(a)** fibrozis ve **(b)** nekrozis skorlama sonuçları 28

Şekil 7. Grupların **(a)** CD31 ve **(b)** perilipin pozitifliği skorlama sonuçları. 28

Şekil 8. Grupların hematoksilen ve eozin boyaması ile **(a)** grup 1, **(b)** grup 2 ve **(c)** grup 3 'ün ışık mikroskobik değerlendirmesi 29

Şekil 9. Perilipin-1 ve CD31 immünoreaktivitesinin ışık mikroskobik değerlendirilmesi.....30

Tablo1. Deney grupları.....19

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otolog yağ greftlemesi, lipofilling olarak da bilinen ve hem estetik hem de rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (1-3). Bu prosedür, hastanın vücudunun bir bölgesinden yağ dokusunun alınmasını, işlenmesini ve hacim kaybını gidermek, doku hacmini artırmak ve estetik konturları düzeltmek amacıyla başka bir bölgeye yeniden enjeksiyonunu içerir. Yağ, hastanın kendi vücudundan elde edildiği için biyolojik olarak uyumludur ve yabancı cisim reaksiyonu riskini en aza indirir (1).

Yağ greftlemesi, diğer dolgu maddelerine kıyasla doğal görünümü ve hissi nedeniyle özellikle çekicidir (1). Ayrıca, cilt kalitesini artırma, elastikiyeti artırma ve tedavi edilen bölgelerde genel doku gençleşmesi sağlama potansiyeli sunar. Bu teknik, yüz gençleştirme, meme büyütme, kontur düzeltme ve skar tedavisi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır (1, 4). Bu geniş uygulama yelpazesi, cerrahların hastanın vücut yapısına uygun kişiselleştirilmiş tedaviler sunmasına olanak tanır.

Yaygın kullanımına rağmen, yağ greftlemesinde, özellikle greft sağkalımı ve hacmin korunması açısından zorluklarla karşı karşıya kalınmaktadır. Yüksek rezorpsiyon oranları ve öngörülemeyen hacim kaybı nedeniyle istenilen sonuca ulaşmak için genellikle birden fazla işlem gerektirmektedir (5-10). Bu zorluklar, greft dokusunun geçirdiği revaskülarizasyon süreçleri ile yakından ilişkilidir (11). Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenez ve vaskülogenezde kritik rol oynayan önemli bir protein olup (12), ekspresyonu hipoksi gibi çeşitli faktörlerle düzenlenir ve aktivitelerini VEGF reseptörleri (VEGFR'ler) üzerinden gösterir (13).

Önceki çalışmalar, VEGF'nin yağ grefti sağkalımını artırabileceğini göstermiştir, ancak kısa yarı ömrü etkinliğini sınırlamaktadır (14). Kolajen bağlanma bölgesi (CBD) içeren VEGF (CBD-VEGF), VEGF'nin CBD içeren modifiye edilmiş bir versiyonudur. Bu füzyon proteini, VEGF'nin kolajene bağlanmasını sağlayarak stabilitesini ve lokal aktivitesini artırmak için tasarlanmıştır.

Radyoterapi (RT)'nin ciltte fibrozis, atrofi, mikrovasküler düzeyde obliterasyon (iskemi) ve dermiste kalınlaşma gibi olumsuz etkileri bulunmaktadır (15-17). Yağ dokusu ve yağ dokusu kök hücrelerini içeren diğer yağ türevli ürünlerin anjiyogenik ve rejeneratif potansiyele sahip olduğu için sıçanlarda radyasyon hasarı durumunda, yara iyileşme kapasitesi geliştirmektedir (18). Ancak oksijenasyonu bozuk ve fibrotik dokuda greft canlılığının düşük olması önemli bir sorun oluşturmaktadır.

Çalışmamız, RT'ye bağlı gelişen skar dokusunda bulunan tip I kolajene spesifik olarak bağlanabilen CBD-VEGF kullanıldığında VEGF'nin ışınlanmış dokuda kalıcılığını artırarak yağ grefti sağkalımını iyileştireceğini hipotez etmektedir. Araştırmamızın temel amacı, CBD-VEGF'nin ışınlanmış dokulara uygulanmasının yağ greftlerinin sağkalımına etkisini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Greftleme

2.1.1. Tanım ve Prosedür

Yağ greftlemesi, tıbbi literatürde otolog yağ greftleme veya lipofilling olarak da bilinen bir prosedür olup bu teknik, hastanın vücudunun bir bölgesinden yağ dokusunun alınıp, bir dizi işleme tabi tutulduktan sonra başka bir bölgeye yeniden enjeksiyonunu içermektedir (1-3). Yağ enjeksiyonunun en temel amacı, hacim kaybını gidermek, doku hacmini artırmak ve estetik konturları düzeltmektir. İşlem sırasında kullanılan yağ, tamamen hastanın kendi vücudundan elde edildiği için biyolojik olarak uyumludur ve yabancı madde reaksiyonu riskini en aza indirir (3).

Yağ greftleme prosedürün çekiciliği, diğer dolgu maddelerine kıyasla doğal bir görünüm ve hissiyat sağlamasında yatar (19). Bunun yanı sıra, enjeksiyon yapılan bölgelerde cilt kalitesinde iyileşme, elastikiyet artışı ve genel dokunun gençleşmesi gibi ek faydalar sağlama potansiyeli de bulunmaktadır (20). Yağ enjeksiyonu, yüz gençleştirme, meme büyütme, kontur düzeltme, skar tedavisi gibi çeşitli estetik ve medikal uygulamalarda kullanılabilir (2, 20). Bu işlemin kapsamlı uygulama alanı, cerrahların hastanın vücut yapısına uygun, kişiselleştirilmiş tedaviler sunabilmesine olanak tanır.

Yağ greftlemesi özellikle estetik cerrahide, yüz, meme ve kalça gibi belirgin bölgelerde kullanılmasının yanı sıra, rekonstrüktif cerrahide travma, doğuştan gelen deformiteler veya önceki cerrahi müdahalelerin yol açtığı düzensizliklerin giderilmesinde de önemli bir role sahiptir (21, 22). Yağ dokusunun kullanımının bir diğer avantajı, vücudun farklı bölgelerinden elde edilebilmesi ve bu nedenle hastanın estetik beklentilerine uygun şekilde özelleştirilebilmesidir (23).

2.1.2. Prosedür

Yağ greftlemesinde sık kullanılan 2 yöntem mevcuttur. Bunların ilkinde liposuction yöntemiyle toplanan yağ, işlendikten sonra alıcı bölgeye enjekte edilir. (24). Diğer yöntem ise en bloc yağ transferi adı verilen yağ greftinin atravmatik şekilde cerrahi olarak eksize edilip tek parça halinde alıcı sahaya direkt verilmesidir. (25-27). Her aşamanın dikkatle yürütülmesi, yağ hücrelerinin canlılığını korumak ve başarılı sonuçlar elde etmek için gereklidir.

Yağ toplanmasının ilk aşamasında dokunun toplanacağı alanın seçimi gelir. Yağ dokusu genellikle karın, uyluk, kalça veya bel gibi yağ açısından zengin bölgelerden alınır (28, 29). Donör alanın seçimi, hastanın vücut yapısına ve tedavi edilecek bölgeye bağlıdır. Seçilen alan, yeterli miktarda yağ sağlarken estetik dengeyi koruyacak şekilde olmalıdır. Yağ, liposuction adı verilen bir teknikle toplanarak veya direk cerrahi rezeksiyon ile tek parça halinde elde edilir (30, 31) Liposuction yöntemi ile yağ eldesinde, küçük kesiler yoluyla deri altına yerleştirilen steril, negatif basınç altında yağ hücrelerini aspire eden bir emme cihazına bağlı bir kanül kullanılır (32). Yağ hücrelerinin canlılığını korumak için liposuction işlemi dikkatle yapılmalıdır (33). Düşük basınç uygulanan teknikler ve dikkatli işlem, yağ hücrelerine zarar verme riskini minimize eder (34). Kanülün çapı ve ucu, toplanan yağın kalitesini ve hücrelerin canlılığını belirlemede önemli bir rol oynar (35). Travmayı azaltmak için ince, künt uçlu kanüller tercih edilir (19, 35). Coleman tekniği; 3 mm genişliğinde ve 15 cm ya da 23 cm uzunluğunda künt uçlu bir Coleman kanülünün 10 ml'lik Luer Lock enjektörüne bağlanmasıyla uygulanır. Kanül ucu donör saha içinde bulunduğunda, enjektör pistonunun manuel olarak geri çekilmesi sağlanır. ve bu sayede oluşan negatif basınçla yağ dokusu minimal hasarla enjektör haznesine dolar. Bu teknik, günümüzde donör sahadan yağ grefti elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Toplanan yağ, yağ ve kök hücreleri, kan hücreleri, yağ (oil) karışımını içerir ve enjeksiyon için uygun hale getirmek amacıyla saflaştırılmalıdır (19). Yaygın saflaştırma yöntemleri arasında santrifüjleme, yıkama ve filtrasyon bulunur (36). Amaç, sağlıklı yağ hücrelerini yoğunlaştırmak ve greftin başarısını etkileyebilecek diğer hücrelerden arındırmaktır. Santrifüjleme, toplanan yağı, yoğunluğa göre

katmanlara ayırmak için yüksek hızda döndürmeyi içerir (37). Bu işlem, yağ hücrelerini diğer bileşenlerden, örneğin kandan ve yağdan (oil) ve eğer kullanıldıysa infiltrasyon sıvısından ayırmaya yardımcı olur (38). Bazı durumlarda yağ grefti tuzlu su çözeltisi ile yıkanır (39). Bu ek adım, greftlenecek yağ hücrelerinin mümkün olduğunca saf olmasını sağlar (39). Filtrasyon işlemi ise yağ hücrelerini daha da saflaştırmak için kullanılır. Bu işlemde, toplanan ve yıkanan yağ ince bir ağ veya filtreden geçirilerek istenmeyen kalıntılardan ayırılır.

Saflaştırılmış yağ hücreleri, steril şırıngalara veya enjektörlere çekilir. Enjekte edilecek yağın hacmi ve dağılımı, hedef bölgeye ve istenen sonuca göre planlanır (40). Yağın steril tutulması ve nazikçe işlenmesi, hücre canlılığını korumak için önemlidir (40). Bu teknik, pürüzsüz ve eşit bir dağılım yaratmaya yardımcı olur ve başarılı greftleme şansını artırır (41). Yağın küçük porsiyonlar halinde yerleştirilmesi, çevre dokularla yüzey temasını artırır, revaskülarizasyonu ve greftlenen yağın entegrasyonunu teşvik eder (42). Yağın katmanlı yerleştirilmesi hem hacim artırma hem de kontur düzeltme için önemlidir (43). Yağın, derinden yüzeye doğru birden çok katmanda enjekte edilmesi, kan damarları ve çevre dokularla daha iyi temas sağlar, greftin hayatta kalma oranını artırır (44). Katmanlar arasında yeterli boşluk bırakılması, transplante edilen yağ hücrelerine besin ve oksijenin optimal yayılmasını sağlar (45).

En bloc yağ transferinde; yağ grefti donör sahadan bistüri ile eksize edilebilir veya ucu keskin bir şırınganın donör saha içerisinde rotasyon ve ilerletme kuvveti uygulanarak yağ grefti materyalinin şırınga içerisine dolması sağlanarak elde edilebilir. Sonrasında elde edilen yağ grefti alıcı sahaya herhangi bir işlem yapmadan direkt olarak enjekte edilir. Bu yöntemin işlem sonrası gözle görünür skar kalması olumsuz yanıdır. Ancak aynı miktarda yağ greftinin tek parça halinde verilmesinin parçalara ayrılmış halde verilmesine oranla daha yüksek viabiliteye sahip olduğu düşünülmektedir (27, 46). Greftin küçük ve tek parça olarak kullanılması greft içinde kapillerlerin intakt olarak kalmasını sağlayarak alıcı sahada spontan anastomozlar sağlayarak hızlıca revaskülarizasyon sağlar. Benzer şekilde yağ greftinin santrifüje edilmesinin, hücrelerin mikrotravmaya maruz kalarak viabilitesini kaybetmesinden dolayı en bloc yağ transfer yönteminde tercih edilmemektedir (27, 47, 48).

İşlemden sonra hastalar, tedavi edilen bölgede hafif şişlik, morarma veya hassasiyet yaşayabilir ve bu semptomlar genellikle birkaç hafta içinde düzelir (19, 49). Hastalara iyileşme sürecini optimize etmek için belirli talimatlar verilir. Bu talimatlar arasında yorucu aktivitelerden kaçınma, tedavi edilen bölgeyi yüksekte tutma ve şişliği azaltmak için soğuk kompresler kullanma yer alabilir. Greftlenen yağın çevre dokularla iyi bir şekilde entegre olup olmadığını izlemek için takiplerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

2.1.2. Yağ Greftlemede Karşılaşılan Zorluklar

Yağ greftinin rekonstrüktif ve estetik cerrahilerde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, greftin başarısını ve uzun ömürlülüğünü etkileyebilecek birçok zorluk bulunmaktadır (3). Bu zorlukları anlamak, sonuçları iyileştirmek ve greftin sağkalımını artırmak için stratejiler geliştirmek açısından kritiktir. Başlıca zorluklar arasında yüksek rezorpsiyon oranları, öngörülemeyen hacim gerilemesi ve greft sağkalımını etkileyen faktörler, özellikle de vaskülarizasyon süreçleri, yer almaktadır (50).

Yağ greftlemesinde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri, transplante edilen yağın yüksek rezorpsiyon oranıdır. Çalışmalar, yağ greftinin %25 ila %80 oranlarında rezorbe olabileceğini göstermiştir (5-9). Bu yüksek rezorpsiyon oranı, greft hacminde önemli bir kayba yol açar ve istenilen estetik veya rekonstrüktif sonuçları elde etmek için tekrarlanan işlemlerin gerçekleştirilmesini gerektirmektedir.

Greftin sağkalımı ve entegrasyonu birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler arasında yağın toplanma tekniği, işlenmesi ve enjeksiyonu ve greftlemenin yapıldığı bölgenin biyolojik ortamı yer alır (10). Yağ toplama tekniği hücre canlılığını önemli ölçüde etkileyebildiğinden adipoz dokuya minimum travma uygulayan nazik liposuction teknikleri, greftin sağkalımını artırmak için tercih edilir (51). Toplama sonrası yağ hücrelerinin kan, yağ(oil) ve diğer hücrelerden arındırılması gerekir. Adipositlerin ve içlerindeki kök hücrelerin canlılığını etkileyebilecek santrifüj veya filtrasyon gibi teknikler kullanılır (52). Yağ enjeksiyon tekniği de greft sağkalımında önemlidir. Küçük yağ porsiyonlarının katmanlar veya tüneller halinde (katmanlı

yerleştirme) enjekte edilmesi, greftin daha iyi entegrasyonu ve vaskülarizasyonunu sağlar (53, 54).

Greft vaskülarizasyonu, sağkalım için bir diğer kritik öneme sahip faktördür. Adipoz doku yüksek oranda vaskülarize bir doku olup damarların yoğunluğu adiposit fonksiyonu, sağkalımı ve adipogenezin düzenlenmesi için kritiktir (11). Yeterli kan temini olmadan, transplante edilen yağın merkezi bölgeleri nekrotik hale gelebilir ve bu da greftin kısmen veya tamamen kaybına yol açar (55). Greftin vaskülarizasyonu, greftin ilk yerleştirildiği andan itibaren başlayan ve zamanla devam eden bir dizi biyolojik süreç içerir (56). Transplantasyon sonrası greft, oksijen ve besinler için difüzyona bağımlı olduğu bir avasküler fazdan geçer (57). Bu faz kritik olup birkaç gün sürebilir. İlk günlerde greft, çevresindeki dokulardan difüzyon yoluyla oksijen ve besin maddeleri alır (57). Bu dönem, yeterli difüzyon sağlanamazsa greft dokusu nekrotik hale gelebildiğinden greft sağkalımı için hayati önem taşır. Avaskülarizasyon sürecinden sonra, uzun süreli sağkalım ve başarılı entegrasyon için greftin yeni kan damarları oluşturduğu revaskülarizasyon süreci başlar (57). Bu süreçte, anjiyogenez sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi esastır. Anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluşumu sürecidir ve greftin beslenmesi için kritik öneme sahiptir. VEGF, platelet türevli büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin bu süreci tetiklediği ve yağ grefti sağ kalımını arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (58). VEGF gibi büyüme faktörleri, bu süreci tetikler ve destekler. VEGF, endotelyal hücrelerin çoğalmasını ve göç etmesini teşvik ederek yeni damarların oluşumunu sağlar (59). Transplantasyonun ilk birkaç haftasında, yeni kan damarları neovaskülarizasyon süreciyle greft içine büyür (56). Bu yeni damarlar, greftin merkezi bölgelerine oksijen ve besin maddeleri sağlar ve bu da greftin hayatta kalmasını ve entegrasyonunu destekler (60). Greftin vaskülarizasyonu, mekanik ve biyokimyasal sinyallerin etkileşimi ile yönlendirilir (61-63). Mekanik yük ve gerilim, vaskülarizasyon sürecini etkileyebilir. Ayrıca, hipoksi ile indüklenen faktör (HIF) gibi biyokimyasal sinyaller de bu süreçte rol oynar (64, 65).

Greftin vaskülarizasyonunu etkileyen diğer önemli faktörler, immünolojik ve inflamatuar yanıtlardır (66, 67). Bu yanıtlar, greftin kabulü ve entegrasyonu üzerinde

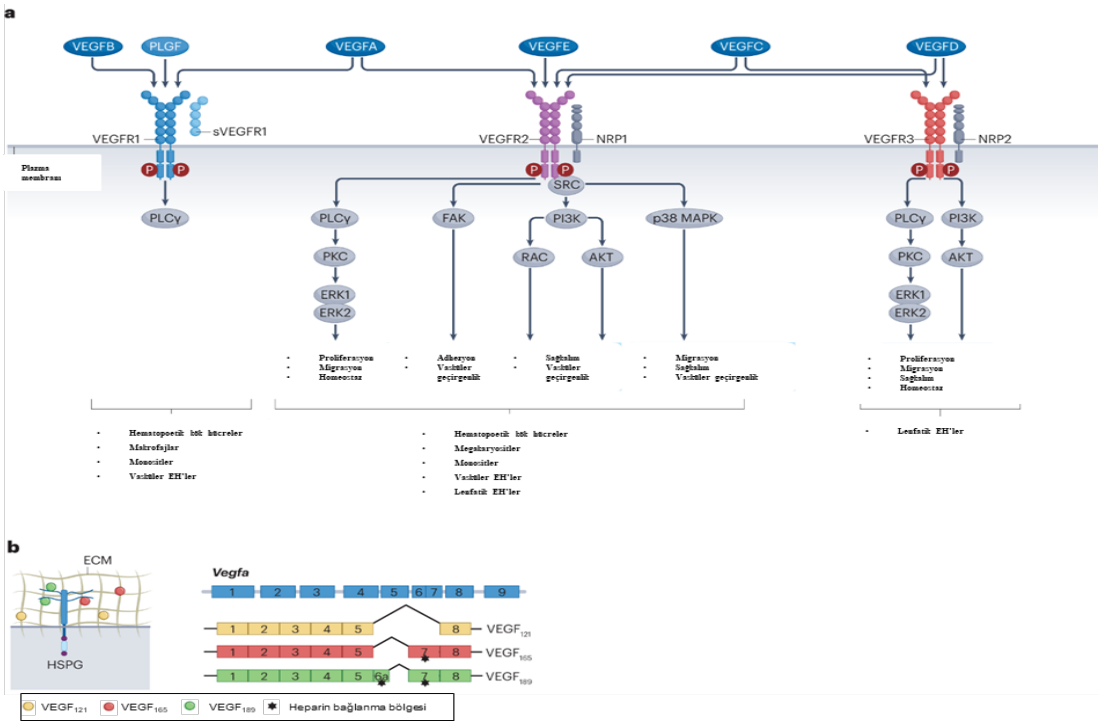
doğrudan etkili olabilir. Greftin yerleştirilmesi sonrasında, vücut inflamatuar bir yanıt başlatır (56). Bu yanıt, greftin sağkalımı ve entegrasyonu için hem olumlu hem de olumsuz etkiler yaratabilir. Kontrollü inflamasyon, iyileşme sürecini ve yeni damar oluşumunu destekleyebilirken, aşırı inflamasyon greftin zarar görmesine ve nekroza yol açabilir (68, 69). Ek olarak greftin immünolojik olarak kabul edilmesi, başarılı bir vaskülarizasyon için gereklidir. Vücudun greftlenen dokuya karşı bir immün yanıt oluşturması, inflamasyon ve fibrozise yol açarak greftin sağkalımını tehlikeye atabilir.

2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGF anjiyogenez ve vaskülogenezde kritik rol oynayan güçlü bir sinyal proteinidir (12). VEGF familyası VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, plasental büyüme faktörü (PLGF), VEGF-E (Orf-VEGF) ve *Trimeresurus flavoviridis* svVEGF'yi içerir. Son iki üye dışında, insanlar da dahil olmak üzere memeli genomlarında VEGF ailesinin beş izoformu bulunmaktadır (70). VEGF proteinleri aktivitelerini VEGF reseptörlerine (VEGFR) bağlanarak ve çok çeşitli sinyal yolakları üzerinden gerçekleştirir (**Şekil 1a**) (13). VEGF-B, PLGF ve VEGF-A, immünoglobulin benzeri alan 2 (D2) ve D3 yoluyla VEGFR1'e ve bunun çözünür formunu sVEGFR1'e bağlanır (13). VEGF bağlanması üzerine VEGFR1'deki Tyr1169'un fosforilasyonu azalır ve mitojenle aktifleşen protein kinazlara (MAPK) yönelik fosfolipaz C izoform-γ (PLCγ)-protein kinaz C (PKC) yolunu yalnızca hafifçe aktive eder (13). VEGFR1 vasküler endotel hücrelerinde (EH'ler), hematopoetik kök hücrelerde, bağışıklık hücrelerinde ve hatta bazı tümör hücrelerinde eksprese edilir (13). VEGF-A aynı zamanda nöropilin 1 (NRP1) ve VEGF-E'nin ve VEGF-C ile VEGF-D'nin işlenmiş formlarına bağlanması yoluyla da aktive edilebilen VEGFR2'ye de bağlanabilir (13). VEGFR2 stimülasyonunu takiben çeşitli yollar aktive edilir. PLCγ-PKC yolu, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1'i (ERK1) ve ERK2'yi aktive ederek proliferasyonu, göçü ve homeostazı kontrol eder ve fokal adhezyon kinaz (FAK) yoluyla hücre dışı matrise (ECM) yapışmayı ve vasküler permeabiliteyi düzenler (13). Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src (SRC) aktivasyonunun aracılık ettiği protein kinaz B (AKT) ve Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substratı (RAC) sinyalleşme kaskadlarının aktivasyonu yoluyla

sağkalımı ve permeabiliteyi kontrol eder (13). Ayrıca p38 MAPK aktivasyonu göç, permeabilite ve sağkalımda rol oynar (13). VEGFR2 hematopoietik kök hücrelerde, megakaryositlerde ve vasküler ve lenfatik EH'lerde eksprese edilir. VEGF-C ve VEGF-D ayrıca lenfatik EH'lerde ifade edilen VEGFR3 ve NRP2'ye de bağlanır (13). VEGFR3, PLCγ-PKC ve PI3K yollarının aktivasyonu yoluyla düzenlenen lenfatik EH proliferasyonu, sağkalım, göç ve homeostazının kontrolünde anahtar rol alır (13).

Ek olarak *Vegfa* geninin alternatif ekzon kesimi, hücre yüzeyinde ve ECM'de heparan sülfat proteoglikanları (HSPG'ler) için diferansiyel afiniteye sahip çeşitli VEGF izoformları üretir (13) (**Şekil 1b**). $VEGF_{121}$, HSPG bağlama alanlarından yoksundur ve dokularda serbestçe difüze olur (13). Ana VEGF izoformu olan $VEGF_{165}$'in yaklaşık yarısı difüze olabilirken diğer yarısı ekson 7 kodlu diziler yoluyla hücre yüzeyi HSPG'lerine bağlanır (13). $VEGF_{189}$ veya $VEGF_{206}$ gibi daha uzun formlar HSPG'lere ekson 6 ve ekson 7 tarafından kodlanan iki farklı heparin bağlama alanı yoluyla bağlanır ve ECM'deki HSPG'ler tarafından neredeyse tamamen sekestre edilir (13).



Şekil 1. (a) Farklı VEGF izoformlarının VEGF reseptörü üzerinden etkilediği hücre

içi yolaklar ve hücresel süreçler. (b) Farklı VEGF izoformlarının HSPG'lere bağlanma mekanizmaları ve *Vegf* genlerinin farklı izoformları (13).

("Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A " isimli makaleden alınmış ve orjinalinden Türkçe'ye çevrilmiştir.)

2.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Ekspresyonu ve Düzenlenmesi

VEGF ekspresyonu, hipoksi gibi çeşitli fizyolojik uyarıcılar tarafından düzenlenir. Hipoksi VEGF üretiminin birincil indükleyicisidir (71). Düşük oksijen koşulları altında, HIF'ler stabil hale gelir ve VEGF gen promotöründeki hipoksiye duyarlı elementlere (HRE'ler) bağlanarak transkripsiyonu artırır (72). Stabil HIF-1α ve HIF-2α, HIF-1β ile dimerize olur ve HRE'lere bağlanarak *Vegf* geninin transkripsiyonunu artırır. Bu mekanizma, oksijen seviyelerinin düşük olduğu durumlarda VEGF üretiminin hızla artmasına neden olur, bu da anjiyogenez ve yeni kan damarlarının oluşumu için kritik bir adaptasyon sağlar (64, 73-75).

Hipoksinin yanı sıra, çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri de VEGF ekspresyonunu modüle edebilir. Örneğin, interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinler, VEGF üretimini artırarak inflamatuar yanıt sırasında anjiyogenezi teşvik eder. Benzer şekilde, dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) gibi büyüme faktörleri de VEGF ekspresyonunu artırarak hücresel büyüme ve onarımı destekler (76). Bu faktörlerin VEGF üzerindeki etkisi, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu gibi süreçler için önemlidir (76).

Östrojen gibi hormonlar da VEGF ekspresyonunu düzenleyebilir (77). Östrojen, endotel hücrelerinde VEGF üretimini artırarak kadın üreme sistemi ve diğer dokularda anjiyogenezi destekler (77). Hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinlerin VEGF üzerindeki bu düzenleyici etkisi, vücudun farklı fizyolojik ihtiyaçlara ve streslere yanıt olarak anjiyogenez sürecini optimize etmesini sağlar.

2.2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Anjiyogenez

VEGF esas olarak embriyonik gelişim sırasında ortaya çıkan, endotelyal öncü hücrelerden ilkel bir vasküler yapının *de novo* oluşumu olan vaskülogenezde önemli

rol oynamaktadır (78, 79). VEGF ayrıca embriyonik ve doğum sonrası gelişim sırasında anjiyogenez için de gereklidir, ancak yetişkinlerde yara onarımı ve dişi üreme siklusları gibi durumlarla sınırlıdır (80, 81). VEGF'nin ana reseptörleri, VEGR1 veya fms benzeri tirozin kinaz-1 (Flt-1) ve kinaz ekleme alanı içeren reseptör (KDR) olarak da bilinen VEGFR2 (80, 82). VEGFR1 sinyalleşmesinin kesin mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır, ancak VEGF için yem reseptör olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (80, 83). Ek olarak VEGFR1, diğer VEGF ailesi üyeleri olan VEGF-B ve PLGF için özel reseptördür (81, 84). Reseptör hematopoezde, matriks metaloproteinazların (MMP'ler) aktivasyonunda ve ayrıca monositlerin ve diğer bağışıklık hücrelerinin tümör mikro ortamına (TME) göçünde esastır (80, 82, 84).

Öte yandan VEGFR2, çeşitli mekanizmalar yoluyla her iki süreci de desteklediği için vaskülogenez ve anjiyogenez için önemlidir (80, 81). VEGF'nin VEGFR2'ye bağlanması, endotelyal nitrik oksit sentazın (eNOS) yanı sıra nitrik oksit sentaz (NOS) yolu yoluyla indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) aktivasyonuyla sonuçlanır (85). Bu sinyal yolu, nitrik oksit (NO) gibi vazodilatörlerin aşağı yönde salınmasına ve ardından damar geçirgenliğinde bir artışa yol açar (86). VEGF'nin VEGFR2'ye bağlanması aynı zamanda PI3K'yi aktive edebilir, bu da AKT'nin aşağı yönde aktivasyonuyla sonuçlanır, bu da EH'nin hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve tüp oluşumunu destekler (87, 88). Yukarıda belirtilen etkilere ek olarak VEGF, paxillin aracılığıyla hücre göçünü indükleyen fokal adezyon kinazı (FAK) aktive eder ve böylece aynı zamanda anjiyogenezi de destekler (89). VEGF VEGFR2'ye VEGFR1'e kıyasla yaklaşık 10 kat daha düşük bir afiniteyle bağlanmaktadır. Bununla birlikte, VEGFR2 daha büyük bir sinyalleşme aktivitesi gerçekleştirir ve sonuç olarak VEGF'nin mitojenik etkilerine esas olarak VEGFR2 aracılık eder (80, 90). Ek olarak VEGFR2, VEGF'nin indüklediği EH migrasyonu ve damar geçirgenliğine aracılık etmede anahtar rol oynar, ancak VEGFR1 bu bağlamda zayıf veya saptanamayan bir yanıt sergiler (80, 81).

VEGF izoformlarından anjiyogenez ile ilişkisi en çok çalışılan form VEGFA'dır. VEGF-A, VEGFR1 veya VEGFR2'ye bağlanır ve daha sonra

anjiyogenezi teşvik etmek için alt yolak sinyallerini aktive eder (91). Ligand bağlanmasına yanıt olarak VEGFR1 ve VEGFR2 dimerleşerek homodimerler veya heterodimerler oluşturur (92). VEGFR2, VEGF-A'nın ana bağlanma reseptörüdür ve anjiyogenez için anahtar düzenleyicidir. VEGF-A, VEGFR2'nin hücre dışı alanına bağlanarak tirozin kalıntılarının otofosforilasyonuna ve ardından endotel hücre proliferasyonunu kolaylaştıran aşağı yönde sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (93-95). VEGFR1, yüksek afinitesi nedeniyle VEGF-A bağlanmak için VEGFR2 ile rekabet eder, ancak tirozin kinaz alanında zayıf otofosforilasyon sergilediğinden anjiyogenez için sınırlı düzenleyici yeteneği vardır (96-98). Bir başka çalışmada ise, VEGF-A'nın bir alt tipi olan $VEGF_{165}$'in VEGFR1'i aktive ettiğini ve PI3K/AKT kinaz yolağının aracılık ettiği sinyaller yoluyla melanom hücrelerinin hareketliliğini düzenlediği bulunmuştur (99).

VEGF'in önemli bir izoformu olan $VEGF_{121}$, anjiyogenezde ve tümör büyümesinde çok önemli bir rol oynar. VEGFR'ye bağlanarak endotel hücre çoğalmasını, göçünü ve tüp oluşumunu teşvik eder (100, 101). VEGF121, serbestçe difüze olma yeteneği nedeniyle diğer izoformlara göre daha tümörijenik ve anjiyojeniktir (102). $VEGF_{165}$, öncelikle SRC yolağı üzerinden damar geçirgenliğini düzenlerken $VEGF_{165,}$ MEK/ERK yolu yoluyla anjiyogenezi indükler (103). Ek olarak, bir $VEGF_{121}$-$VEGF_{165}$ füzyon proteininin, anjiyogenezi ve ilaç direncini azaltma potansiyeli olduğu gösterilmiştir (104). $VEGF_{121}$-toksin konjugatları ise çoğalan endotel hücrelerini ve tümör büyümesini seçici olarak inhibe edebilir (105). İlginç bir şekilde, alternatif olarak eklenmiş bir izoform olan $VEGF_{121b}$, anti-anjiyogenik özellikler sergiler ve tümör büyümesini inhibe eder (106).

$VEGF_{165}$, VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörleri aracılığıyla anjiyogenezi düzenleyen önemli bir proanjiyogenik faktördür. Ancak alternatif bir ekleme varyantı olan $VEGF_{165b}$'nin, VEGFR2'yi aktive etmeden ona bağlanan ve dolayısıyla anjiyogenezi baskılayan inhibitör bir izoform olarak tanımlandığı görülmüştür (107). $VEGF_{165b}$'nin retinal neovaskülarizasyonu (108) ve tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (108). Ayrıca retina hücreleri üzerinde sitoprotektif etkiler de gösterir (109). Buna karşılık $VEGF_{165}$, embriyonik kalplerde vasküler büyümeyi ve tüp oluşumunu arttırır (110) ve korneada inflamasyonu indükler (111). Bunların yanında

periferik arter hastalığında (112) ve miyokard enfarktüsünü takiben (112) yüksek VEGF165b seviyeleri gözlemlenmiştir.

$VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ temel olarak hücreyle ilişkili olup ve hücre dışı matrise bağlanırken, $VEGF_{121}$ ve $VEGF_{165}$ daha kolay salgılanır (113). Meme kanseri hücrelerinde VEGF189'un aşırı ekspresyonu, tümör içi damarların genişlemesine yol açar (114). Aynı zamanda hücre adhezyonunu arttırır ve NRP1'e bağlanır (114). Progesteron, insan rahminde seçici olarak $VEGF_{189}$ ekspresyonunu indükler ve bunun vasküler yeniden şekillenmeyi ve implantasyonu etkileyebileceği düşünülmektedir (115). $VEGF_{189}$, meme kanseri hücrelerinde NRP1 yoluyla stres koşulları altında apoptozu indükleyebilir (116). Ancak $VEGF_{121}$'in *in vivo* olarak $VEGF_{165}$ veya $VEGF_{189}$'dan daha tümörijenik ve anjiyojenik olduğu görülmektedir (102).

VEGF-A anjiyogenezin anahtar aracısı olmasına rağmen VEGF-B'nin rolü daha karmaşıktır. VEGF-B'nin, fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) / fibroblast büyüme faktörü reseptör 1 (FGFR1) yolağını baskılayarak aşırı anjiyogenezi inhibe ettiği bulunmuştur (117) ve büyümeden ziyade kan damarlarının sağkalımı için kritik öneme sahiptir (118). VEGF-B ayrıca yağ damar sistemini genişleterek obezite ile ilişkili metabolik komplikasyonları da ortadan kaldırır (119).

VEGF-C ve VEGF-D, embriyonik gelişim sırasında hem anjiyogenezde hem de lenfanjiyogenezde önemli roller oynar. VEGF-C lenfatik gelişim için gerekli olsa da VEGF-D'nin bağlama özgü ve telafi edici işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (120). VEGF-C, bu yolu düzenleyen Rspo1-Wnt sinyalleşmesi ile anjiyogenezi teşvik etmek için VEGFR3 aracılığıyla etki eder (121). VEGF-C ayrıca tomurcuklanma sırasında lenfatik rehberliği ve endotel hücre göçünü etkileyerek hem parakrin hem de otokrin etki göstererek işlev görür (122). VEGFR3 sinyali, damar füzyon bölgelerinde Notch sinyalini güçlendirerek uçtan sapa hücre dönüşümünü kontrol eder (123). Ek olarak VEGF-C'nin patolojik anjiyogenezde, özellikle de retinal neovaskülarizasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (124).

PLGF, VEGF ve bunların reseptörleri ile etkileşime girerek anjiyogenezde karmaşık bir rol oynar. PLGF, VEGF ile benzer düzeyde iskemik dokularda anjiyogenezi ve kollateral büyümeyi uyarır (125). Kemik iliği kaynaklı hücreleri harekete geçirerek ve VEGF ile sinerji oluşturarak damar büyümesine katkıda bulunur

(126). PIGF, VEGF'ye bağlı mekanizmalar yoluyla tümör anjiyogenezini hem teşvik edebilir hem de inhibe edebilir (127). Adenovirüs aracılı PLGF gen transferi, endojen VEGF-A ekspresyonunu arttırarak anjiyogenezi indükler (128). Bazı çalışmalar PLGF blokajının primer tümör anjiyogenezini engellemediğini öne sürerken (129), diğerleri anjiyojenik bozukluklar için potansiyel terapötik hedefler olarak PLGF ve reseptörü Flt-1'i önermektedir (125, 130). Ek olarak anjiyogenezin modüle edilmesinde PLGF ve VEGF arasındaki karmaşık etkileşimin antianjiyogenik kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (127).

2.2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Yağ Grefti

Yapılan çalışmalarda yağ greftlerinin revaskülarizasyonunda vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) önemli olduğu bulunmuştur (58). VEGF, yağ hücresi apoptoz oranını azaltır ve yağ hücresinin hayatta kalmasını artırır. VEGF greftleme işleminden 7 gün sonra artmaya başlar. Bu nedenle yağ greftleri ilk hafta hipoksiye duyarlı hale gelir ve bu da yağ grefti morbiditesinin daha fazla olmasına neden olur (131). Yağ greftine VEGF eklenmesi anjiyogenezin indüksiyonu ile greft canlılığını arttırır (132). VEGF proteini kullanımının sonuçları ümit verici olsa da VEGF proteininin yarı ömrü yaklaşık 30-45 dakika olduğundan etkileri geçici olabilir (133). VEGF'nin uzun süreli salınımı, alıcı bölge vasküler ağı önemli ölçüde artırır ve daha kaliteli yağ greftlerine katkıda bulunur (134).

2.4. CBD-VEGF

CBD-VEGF kollajen bağlanma CBD içeren modifiye edilmiş bir versiyonudur (135). Bu füzyon proteini, VEGF'nin kollajene, yani dokulardaki ekstraselüler matriksin ana bileşenine, spesifik olarak bağlanmasını sağlayarak stabilitesini ve lokal aktivitesini artırmak için tasarlanmıştır (135). CBD eklenmesi, VEGF'nin doku yararlanımının arttırılmasını ve greft bölgesinde tutulmasını uzatmayı, böylece anjiyojenik etkilerini sürdürebilmeyi ve terapötik sonuçları iyileştirmeyi amaçlar.

Doğal VEGF'nin terapötik uygulamalardaki başlıca kısıtlılığı, kısa yarı ömrü nedeniyle vücuttan hızlı bir şekilde parçalanarak atılmasıdır (14). Bu kısa süreli aktivite, özellikle yara iyileşmesi, doku mühendisliği veya yağ greftinin hayatta

kalması gibi kan damarlarının uzun süreli büyümesinin gerekli olduğu durumlarda, VEGF'nin anjiyogenezi teşvik etme etkinliğini azaltabilir.

VEGF'nin kollajen bağlanma bölgesi ile birleştirilmesiyle, modifiye edilmiş CBD-VEGF, ekstraselüler matriksteki kollajen açısından zengin bölgelere yerleşerek, biyoyararlanımını artırır ve lokal etkilerini geliştirir (136). Bu hedefli yaklaşım, VEGF'nin istenilen bölgede yüksek konsantrasyonda bulunmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sistemik maruziyeti de en aza indirir ve böylece VEGF tedavisi ile ilişkili yan etkilerin azalmasına katkıda bulunur.

CBD-VEGF, VEGF'e benzer şekilde endotel hücreleri üzerindeki VEGF reseptörlerine bağlanır ve anjiyogenezi teşvik eder. Ancak kollajen bağlanma bölgesi, VEGF'nin ekstraselüler matrikste bulunan kollajen I liflerine bağlanmasını sağlar (135). Bu bağlanma, VEGF'nin ihtiyaç duyulan bölgelerde, örneğin doku hasarı veya implantasyon bölgelerinde lokalize kalmasını sağlar. CBD-VEGF'nin bu bölgelerde kalıcı varlığı, endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve yeni kan damarlarının oluşumunu artırır (137, 138). Bu süreçler, yeterli kan temini ve besinlerin sağlanmasını garanti ederek dokunun yenilenmesi ve greft dokularının hayatta kalması için oldukça önemlidir.

2.5. Radyoterapi Kaynaklı Fibrozis ve Yağ Grefti Üzerine Etkileri

RT ile ilişkili fibrozis, özellikle kanser hastalarında RT'ye maruz kalan dokularda meydana gelen yaygın ve zorlu bir komplikasyondur (139). Bu durum, yüksek enerjili radyasyonun çevredeki sağlıklı dokulara zarar vererek aşırı fibrotik doku oluşumuna yol açmasıyla ortaya çıkar (140). Bu durum, dokuların sertleşmesine, esnekliğin azalmasına ve fonksiyonel sınırlamalara yol açabilir. RT görmüş ve estetik cerrahi, özellikle yağ enjeksiyonu yaptırmak isteyen hastalarda, değişmiş doku ortamı nedeniyle özel dikkat gereklidir.

RT ile ilişkili fibrozisli dokularda yağ enjeksiyonu yaparken karşılaşılan zorluklar, bu işlemin potansiyel faydalarına rağmen dikkatle ele alınması gereken önemli hususlar içermektedir. Bu zorluklar, dokuların RT sonrası değişen biyolojisi, yağ greftinin hayatta kalma oranı, komplikasyon riski ve fibrozisin şiddeti gibi faktörlerden kaynaklanır (141, 142).

RT dokularda vaskülarizasyonu olumsuz etkileyerek kan akışını azaltır (143). Bu durum, greft edilen yağın sağkalımını ve başarılı bir şekilde entegrasyonunu zorlaştırır (144). Yağ greftinin hayatta kalabilmesi için yeterli oksijen ve besin maddeleri sağlanması gerekmektedir ancak RT nedeniyle zarar görmüş damarlanma, bu süreci engelleyebilir.

Fibrotik bir ortamda yağ enjeksiyonu yapılması, çeşitli komplikasyon risklerini artırır. Radyasyonun neden olduğu fibrozis, dokuların sertleşmesine ve elastikiyetini kaybetmesine yol açar (145). Bu sertleşmiş dokuya yağ enjekte edildiğinde, yağın düzgün bir şekilde yayılmaması, birikmesi veya resorbe olması gibi sorunlar ortaya çıkabilir (146). Yağın homojen bir şekilde dağılımı sağlanamazsa, nodüller, kist formasyonları veya yağ nekrozu gibi istenmeyen durumlar gelişebilir (147-149). Bu riskleri en aza indirmek için cerrahlar, düşük hacimli yağ enjeksiyonları kullanabilir ve yağın düzgün bir şekilde dağılması için multi-lobular enjeksiyon tekniklerini tercih edebilirler. Ayrıca, enjeksiyon sonrası düzenli takip ve ultrason gibi görüntüleme yöntemleriyle yağın durumunun izlenmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MÜHDEK) onayı sonrası gerçekleştirildi (Tarih: 09.01.2024, Protokol onay numarası: 02.2024mar). Çalışmada Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınan 24 adet Spraque Dawley soyu erişkin (Yaş=4-6 haftalık, ağırlık= 200 – 250 gram) sıçan kullanıldı ve hayvanlar yine aynı merkezde takip edildi. Hayvanlar her kafeste cerrahi öncesi 3, cerrahi sonrası 1 hayvan olmak üzere kontrollü ortamda 21,0 ± 1,0°C sıcaklıkta ve 12 saat/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde takip edildi. Sıçanların deney süresi boyunca standart kemirgen yemine ve çeşme suyuna erişimi kısıtlama olmaksızın sağlandı.

3.1. Materyaller

3.1.1.Bakteriyel Suşlar:

Escherichia coli DH5α: Genel klonlama amacıyla kullanılan DH5α suşu, Invitrogen'den temin edilmiştir. Bu suş, intraselüler endonükleazı bloklayarak plazmid kararlılığını artırır ve homolog rekombinasyonu önleyerek plasmid multimerleşmesini önler. Suşlar Luria Bertani (LB) besiyerinde gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve %20 gliserol içeren stokları -80°C'de saklanmıştır.

Escherichia coli BL21(DE3): Rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan BL21(DE3) suşu, T7 promotoru ile yüksek protein ekspresyonu sağlamak amacıyla tercih edilmiştir. Bu suş, VEGF165 ve CBD-VEGF165 genlerinin ifadesi için kullanılmıştır.

3.1.2. Klonlama Vektörleri:

pET-28a(+) vektörü: Bu çalışmada, N-terminalde 6xHis etiketi içeren ve proteinlerin saflaştırılmasına uygun pET-28a(+) vektörü kullanılmıştır. Vektör, 5.4 kb büyüklüğünde olup Kanamisin direnç geni ve T7 promotor bölgesine sahiptir. Vektörler GenScript'ten temin edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1 Gen Klonlama ve Transformasyon

VEGF165 ve CBD-VEGF165 genleri, pET-28a(+) vektörüne klonlanmak üzere NdeI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Bu klonlama işlemi için 100 ng pET-28a(+) DNA ve 500 ng gen ürünü kullanılmıştır. Kesim sonrası DNA'lar ligaz enzimi ile birleştirilmiş ve ligasyon ürünü Escherichia coli DH5α hücrelerine kimyasal transformasyon yöntemiyle aktarılmıştır. Transformasyon işleminde 100 µl kompetan hücreye 10 µl ligasyon ürünü eklenerek 42°C'de 45 saniye ısı şoku uygulanmıştır. Hücreler LB besiyerinde 37°C'de 200 rpm'de 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından kanamisin (30 µg/ml) içeren LB agar plakalarına yayılarak gece boyunca inkübe edilmiştir.

Pozitif koloniler PCR ile doğrulanmış ve Sanger DNA sekanslama yöntemi ile genin doğru klonlandığı onaylanmıştır.

3.2.2 Protein Ekspresyonu

Doğrulanan pET-28a(+)-VEGF165 ve pET-28a(+)-CBD-VEGF165 vektörleri, rekombinant protein ekspresyonu için Escherichia coli BL21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır. 100 ng plasmid DNA 100 µl kompetan BL21(DE3) hücrelerine eklenmiş ve aynı kimyasal transformasyon yöntemiyle 42°C'de ısı şoku uygulanarak transformasyon gerçekleştirilmiştir.

Ekspresyon işlemi için, pozitif koloniler kanamisin (30 µg/ml) içeren LB besiyerinde 37°C'de ve 200 rpm'de gece boyunca büyütülmüştür. Kültür, OD600 değeri 0.6'ya ulaştığında son konsantrasyonu 0.25 mM IPTG olacak şekilde indüklenmiştir. İndüksiyon sonrası kültürler 6 saat boyunca aynı koşullarda inkübe edilmiş ve her saat başı numuneler alınarak ekspresyon durumu SDS-PAGE ile izlenmiştir.

3.2.3 Protein Saflaştırma

Protein saflaştırması, Ni-NTA kolonları kullanılarak immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) yöntemiyle yapılmıştır. Ekspresyon sonrası BL21(DE3) hücreleri 8000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücre peleti 20 ml 1X PBS tamponu (pH 7.5) içinde çözülmüş ve buz üzerinde 30 dakika

bekletilmiştir. Hücreler sonikasyon yöntemiyle (her biri 15 saniye süreli 4 çevrim) parçalanmış ve süpernatant elde edilmiştir.

Sonikasyon sonrası elde edilen süpernatant, Ni-NTA kolonlarına yüklenmiş ve 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 tamponu ile yıkanmıştır. Saflaştırma aşamasında kolona bağlı proteinler, 20 mM ila 200 mM imidazol içeren tamponlarla elüe edilmiştir. Saflaştırılan proteinler %10'luk SDS-PAGE kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.4 His-Tag Kesimi ve Protein Saflaştırma

Saflaştırılan His-VEGF165 ve His-CBD-VEGF165 proteinlerinin His etiketi, trombin enzimi kullanılarak çıkarılmıştır. Proteinler, trombin içeren tamponda 10 U trombin ile inkübe edilmiş ve bu işlem oda sıcaklığında 2 saat sürmüştür. Kesim sonrası proteinler yeniden Ni-NTA kolonu kullanılarak saflaştırılmış ve saf proteinler -80°C'de saklanmıştır.

3.3. Protein Miktar Tayini

Saf proteinlerin miktarı BCA yöntemi ile belirlenmiştir. Her bir protein örneğinden 5 µl alınarak mikroplakaya eklenmiş ve BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi oluşturulmuştur. Örnekler 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucusunda 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar rastgele her grupta sekiz hayvan olacak şekilde Tablo 1'de belirtildiği şekilde üç gruba ayrıldı.

Tablo 1. Deney grupları.

Gruplar	Uygulamalar
Grup 1	Tek doz 10 Gy RT ve yağ grefti uygulandı.

Grup 2	Tek doz 10 Gy RT, yağ grefti ve 10,32 µg VEGF uygulandı.
Grup 3	Tek doz 10 Gy RT, yağ grefti ve 11,12 µg CBD-VEGF uygulandı.

CBD-VEGF: Kolajen bağlanma bölgesi içeren vasküler endotelyal büyüme faktörü
Gy: Gray, VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

3.5. Deney Planı

Sıçan gruplarına analjezi sağlanması amacıyla işlemden 1 gün önce, operasyon günü ve post op 1. günde 1 mg/kg meloksikam subkutan olarak uygulanmıştır. Ardından sıçanlara ketamin (Ketalar, 100 mg/kg) ve ksilazin (Rompun, 10 mg/kg) ile genel anestezi altında ve uygun pozisyonda sırt bölgelerine tek doz 10 Gr radyoterapi uygulanacaktır.

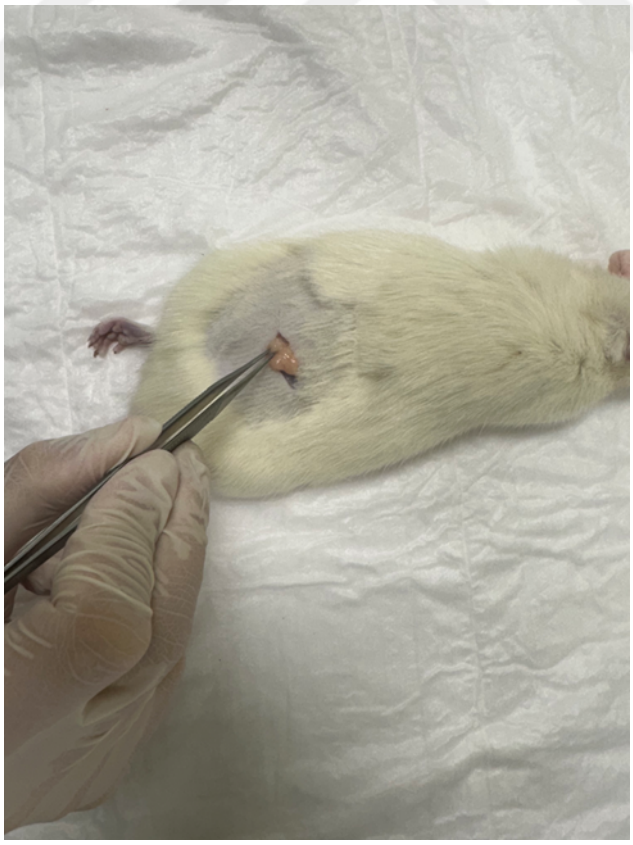
Sıçanlar bir ay takip edildikten sonra yukarıda bahsedilen uygun analjezi protokolü sağlanıp ketamin ve ksilazin altında genel anestezi uygulanıp inguinal bölgeye yapılan kesi ile cilt altı dokular geçilerek inguinal yağ yastıkçığına ulaşıldı. Sonrasında kanama kontrolüne dikkat edilerek yağ̆ grefti olarak verilmek üzere yağ yastıkçığı eksize edildi. Donör alan primer olarak kapatıldı. Ardından inguinal bölgeden alınan yağ̆ grefti RT uygulanmış sırt bölgesinde cilt altı plana implante edildi. Sonrasında hayvanlar rastgele şekilde Tablo 1'de belirtilen uygulamalara maruz bırakıldı. Cerrahiden iki ay sonra genel anestezi altında uygulanmış olan yağ greftleri eksize edilip sıçan sakrifiye edildi. Eksize edilmiş olan yağ greftlerinin ağırlıkları hassas terazide değerlendirilip histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi.

3.6. Anestezi Uygulaması

Genel anestezi 100mg/kg Ketamin hidroklorid (Ketalar) ve 10mg/kg ksilazin (Rompun) karışımı intraperitoneal olarak uygulanarak sağlandı. Anestezi derinliği cilt ya da parmak kıstırma yanıtlarına bakılarak değerlendirildi.

3.7. Cerrahi Teknik

Anestezi ve analjezi uygulamasını takiben inguinal ve sırt bölgesi tıraşlandı. Lokal povidon iyot ile cerrahi alan temizliği sağlandı. İnguinal bölgeye yaklaşık 1 cm boyutunda kesi sonrası cilt ve cilt altı dokular geçilerek inguinal yağ yastıkçığına ulaşıldı. Yağ yastıkçığının pedikülü dikkatlice koterize edildikten sonra yağ grefti inguinal bölgeden elde edildi. Sonrasında hassas terazide tartılarak 24 gram yağ grefti hazırlandı ve nemli gazlı beze sarıldı. Ardından sıçana prone pozisyon verildi. Povidon iyotla tekrar cerrahi saha temizliği yapıldıktan sonra önceki radyoterapi almış sırt bölgesine yaklaşık 1 cm boyutunda kesi yapıldı ve makas kullanılarak cilt ve cilt altı dokular geçildi. Sonrasında yağ greftinin implante edilebilmesi için cilt altında uygun cep oluşturuldu. Greft oluşturulan cebe yerleştirildi (Şekil 2). Grup 1'de herhangi bir madde enjeksiyonu yapılmadı, yalnızca yağ grefti uygulandı. Grup 2'de yağ grefti içeren cep bölgesine 1 ml (10,32 µg) VEGF uygulandı. Grup 3'de yağ grefti içeren cep bölgesine 1 ml (11.12 µg) CBD-VEGF enjekte edildi ve insizyonlar 4-0 Vıcryl sütur ile onarıldı.



Şekil 2. Yağ greftinin sırtta oluşturulan cebe yerleştirilmesi

3.8. Radyoterapi Uygulanması

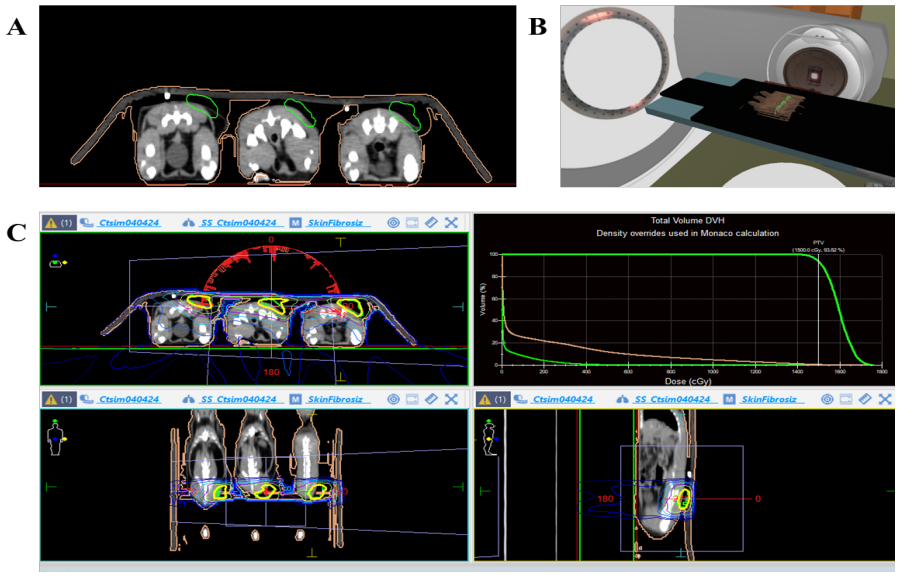
3.8.1. Simülasyon ve Planlama

Sedasyon 100mg/kg Ketamin hidroklorid (Ketalar) ve 10mg/kg ksilazin (Rompun) karışımı ile sağlandıktan sonra kliniğimizde tasarlanan fantom ile 3 sıçan birlikte ışınlanacak şekilde pozisyonlandırılan sıçanlara GE Discovery RT bilgisayarlı tomografi aygıtında 1.25 mm kesit kalınlığında bilgisayarlı tomografi (BT) çekimi yapıldı. Sıçanların fantoma yerleşimi sonrasında ciltte ışınlanacak bölge üzerine 5 mm kalınlıklı bolus koyarak çekimler gerçekleşti. Şekilde (Şekil 3A ve B) rat yerleşimleri ve çekilen BT kesitleri gösterilmektedir. Bu işlem tüm 3'lü gruplar için tekrar yapıldı. Her gruba kendi içerisinde isim verildi. Her gruba ayrı ayrı radyoterapi protokolleri planlandı.

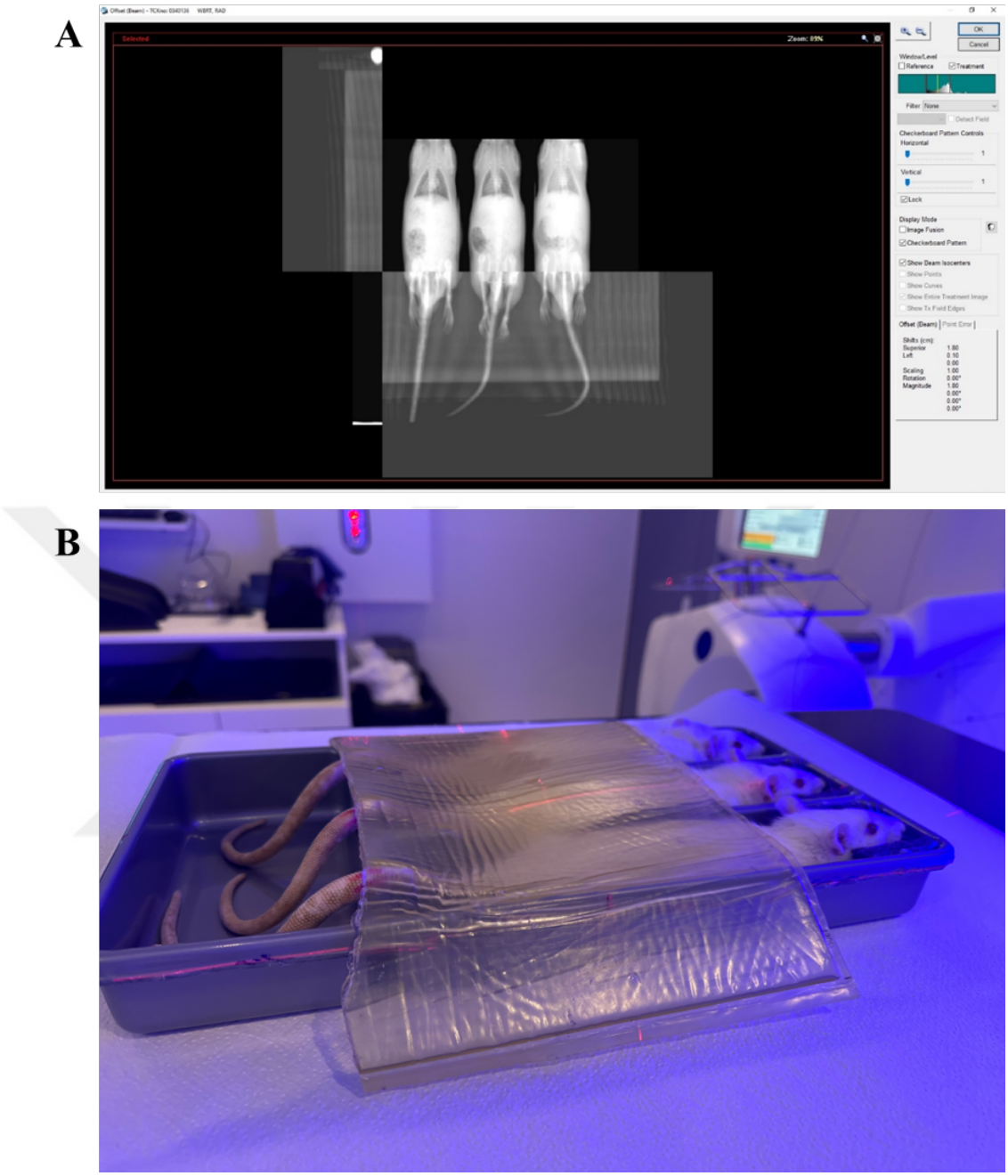
BT görüntüleri Monaco tedavi planlama sistemine nakledilerek, her bir guruptaki her bir sıçan için sırt bölgesinde ışınlayacağımız bölgeyi belirleyerek cilt dokusunu da hedef hacim içine alan lezyonlar belirlendi. Lezyonların konturlanması sırasında boyutlarının 1x5x5 cm olmasına dikkat edildi. Hedef hacim her bir rat için cilt dokusunu içene alınıp 5mm kalınlığı olan bolus ise ekternal kontur olarak tedavi planlama sisteminde işaretlendi. Böylelikle cilt dokusunun tanımlanan doz ile kapsanması hedeflendi. Lezyon olarak adlandırılan bölge Gross Tümör Hacmi (GTV) olarak konturlandı. Tüm sıçanlarda Planlanan Hedef Hacim (PTV) GTV hacmine her yönden 1 mm marj verilerek elde edildi. Daha sonra her bir sıçan için PTV_1, PTV_2 ve PTV_3 olarak isimlendirilen hacim marj verilmeden birleştirilerek PTV_{Total} elde edildi. Bu yöntem ile aynı anda 3 sıçanın ışınlaması ve anestezi ile bekleme süresinin kısaltılması amaçlandı. İsomerkez olarak PTV_{Total} merkezi seçilen 6 MV foton enerjili doz hızı maksimum 600 Gy/MU değerine sahip tek demette 180 derece rotasyon olan Volumetrik Ark Radyoteapi (VMAT) tekniği ile PTV hacimlerine tek fraksiyonda 10 Gy doz hedeflenerek radyoterapi planlandı (Şekil 3C). Doz hesaplamasıda Monte Carlo algoritması kullanıldı ve 2 mm doz grid boyutu tercih edildi. Doz tanımlamaları yapılırken PTV hacimlerin %90-95'nin belirtilen 10 Gy dozun alınması amaçlanırken, lezyonun hemen altındaki organların radyasyon dozlarını düşürmek için planlamada lezyon harici bölge olarak tanımlanan kritik organ için PTV kapsanmasını bozmayacak doz kısıtlaması denenerek en iyi organ koruması ve PTV kapsanması

sağlanan planlar tedavi planı olarak tercih edildi. Tüm 3'lü sıçan grupları için planlama yinelenerek her bir guruba ayrı VMAT planı aynı medikal fizik uzmanı tarafından yapıldı. Işınlama eşmerkezde lif kalınlığı 5mm olan Agility MLC kolimatör sistemini içeren Elekta Versa HD cihazında yapıldı. Sıçan ışınlamalarından önce, her bir planlamanın kalite kontrol ölçümleri yapıldı ve Gamma İndex değerlendirme yönteminde doz ve DTA gamma index değerleri sırasıyla 2%/2mm kriterlerine göre değerlendirildi. %90 geçme oranı sağlandığında tedavi planı uygulandı. Hiçbir plan %90 altına düşmedi.

Hedef Hacim pozisyonlanmasında görüntü rehberli radyoterapi ve Radyoterapi: Sonraki gün, aynı gruptaki 3'lü sıçanlar sedasyon altında planlama sırasına göre aynı fantoma aynı pozisyonda yerleştirildi. Tedavi öncesinde 3 Boyutlu Cone Beam Computed Tomography (CBCT) ile görüntülenerek planlama BT görüntüleri ile karşılaştırıldı ve pozisyon doğruluğu doğrulandı. (Şekil 4). Pozisyon doğrulaması aynı radyasyon onkoloğı ve medikal fizik uzmanı tarafından her üçlü grup için yinelendi ve ardından RT uygulandı. Her bir 3'lü grup için rehberli RT süresi en fazla 14 dakika sürdü.



Şekil 3. A. Aksiyel BT kesitleri. **B.** 3 boyutlu ışınlama görüntüsü ve **C.** Tedavi Planlaması ve Doz-Volum Histogramı



Şekil 4. (A) Tedavi öncesi pozisyonlamanın CBCt ile belirlenmesi. **(B)** Sıçanların ışınlanması.

3.9. Sakrifikasyon ve Örneklerin Alınması

Deney gruplarındaki sıçanlar ketamin ve ksilazin anestezisi altında eksanguinasyon (kansızlaştırma) yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Sırt bölgesinde bulunan yağ grefti örnekleri çıkarılıp hassas terazide tartıldıktan sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilmiştir.

3.10. Histolojik Analizler

Tüm deney gruplarına ait hayvanlardan elde edilen yağ doku örnekleri diseke edildikten sonra %10 formalin içerisinde oda sıcaklığında fikse edildi. Örnekler daha sonra %70, %80, %96, %100'lük etanol serisinden geçirildi, ksilene alınarak şeffaflandırıldı, sıvı parafine emdirildi ve parafine gömülerek blok elde edildi. Parafin bloklardan histokimyasal ve immunohistokimyasal analizler için döner mikrotom (Leica RM2125 RTS) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler bir gece oda ısısında kurutulduktan sonra 580C etüvde iki saat deparafinizasyon gerçekleştirildi ve ardından hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyandı. Preparatlar kamera eklentili (Olympus DP 72, Tokyo, Japonya) ışık mikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve bilgisayar programı aracılığıyla fotoğraflar alındı. Tüm çalışma gruplarındaki yağ doku örnekleri fibrozis, nekrozis ve inflamasyon parametreleri üzerinden semikantitatif olarak 0 ile 3 arasında (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli) skorlandı (150) ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

3.11. İmmünohistokimyasal Analizler

Tüm gruplara ait bloklardan alınan 5 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. 58 ^{0}C etüvde iki saat ve ksilende 45 dakika deparafinize edildi. Azalan etanol serisinde (%100, %96, %80, %70) rehidrate edildi ve distile suda yıkandı. Antijen geri kazanımı için örnekler mikrodalgada sitrat tamponunda (pH: 6.0) (Bio-Optica, San Faustino, İtalya) tutuldu ve ardından 20 dakika süresince soğutuldu. Endojen peroksidaz aktivitesi %3 hidrojen peroksit ile 10 dakika bloke edildi ve kesitler fosfat tamponlu salinde (PBS) 3 defa 5'er dakika yıkandı. Non-spesifik reaksiyonu engellemek için örnekler 10 dakika oda ısısında bloklama solüsyonunda inkübe edildi. Ardından, yıkama yapılmadan solüsyon uzaklaştırıldı. Adiposit canlılığının değerlendirilmesi için perilipin 1 (Cell Signaling, cat. no: 9349T, USA) ve anjiyogenezisin değerlendirilmesi için CD31 (Cell Marque, cat. no: 131R-24, USA) primer antikorları sırasıyla 1:100 ve 1:200 dilüsyonda damlatılarak bir gece +4 °C de inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 kez yıkanan kesitlere, sensitek HRP (Anti-polyvalent) kit (ScyTek, cat. no: SHP125, USA) üreticinin protokolüne göre uygulanarak biyotinli sekonder antikor damlatıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 3 kere PBS ile yıkanan kesitlere Streptavidin/HRP 20 dakika

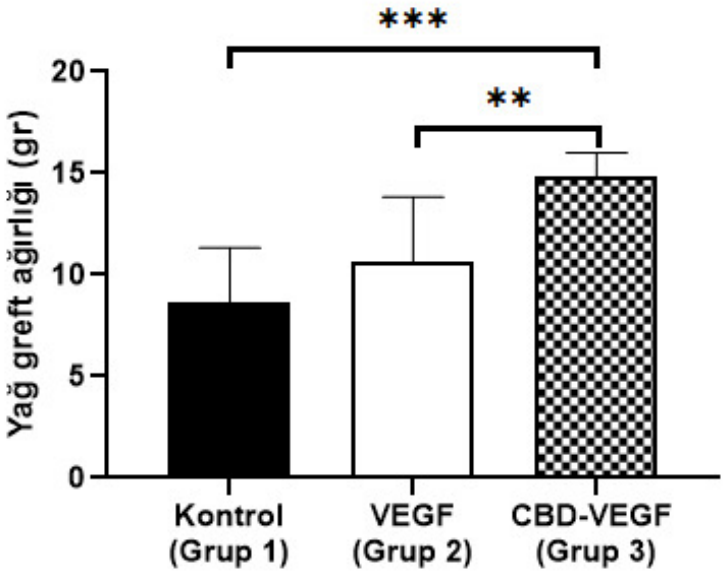
uygulandı. Kromojenik reaksiyonu elde etmek için diamimobenzidine (DAB) (ScyTek, cat. No: ACK500, USA) ile 5 dakika boyandı ve oluşan reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla örnekler aralıklarla mikroskop altında gözlendi. Daha sonra, zemin boyaması için örnekler Harris hematoksilen ile bir dakika boyandı ardından distile suda 5 dakika yıkanarak entellan ile kapatıldı. Dokulardaki perilipin 1 ve CD31 immunoreaktiviteleri bilgisayar donanımlı, kamera eklentili ışık mikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve reaksiyon gözlenen alanlardan bilgisayar programı aracılığıyla fotoğraflar alındı. Ekspresyon yoğunlukları için negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve şiddetli (3) olmak üzere tüm örneklere semikantitatif skorlama yapıldı.

3.13. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism (versiyon 8.0; GraphPad Software, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Aykırı değerler (uç değerler) ROUT yöntemiyle (Q=1) ile belirlendi (151). Verilerin analizleri Kruskal-Wallis testini takiben Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. Veriler ortalama ± standart sapma (s.s.) olarak ifade edildi. $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

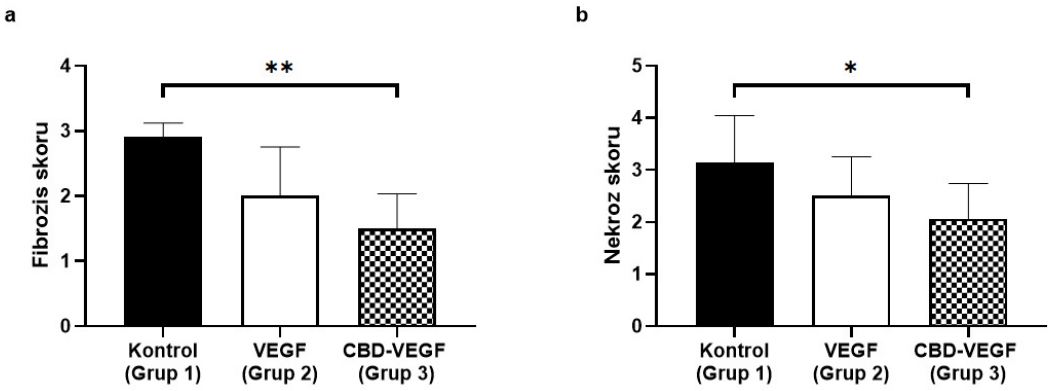
4. BULGULAR

Kontrol grubundan iki hayvan anestezi kaynaklı komplikasyonlar nedeniyle öldü. Diğer hayvanlar sakrifiye edildikten sonra greftler eksize edildi ve tartıldı. Kontrol grubundan elde edilen yağ greftlerinin ortalama ağırlığı 8,6 gram, VEGF grubundan elde edilen yağ greftlerinin ortalama ağırlığı 10,6 gram ve CBD-VEGF grubundan elde edilen yağ greftlerinin ortalama ağırlığı 14,8 gram ölçüldü. CBD-VEGF grubundaki hayvanların greftlerinin ağırlıkları hem kontrol ($p<0,001$) hem de VEGF grubuna kıyasla ($p<0,01$) daha yüksek bulundu (Şekil 5).



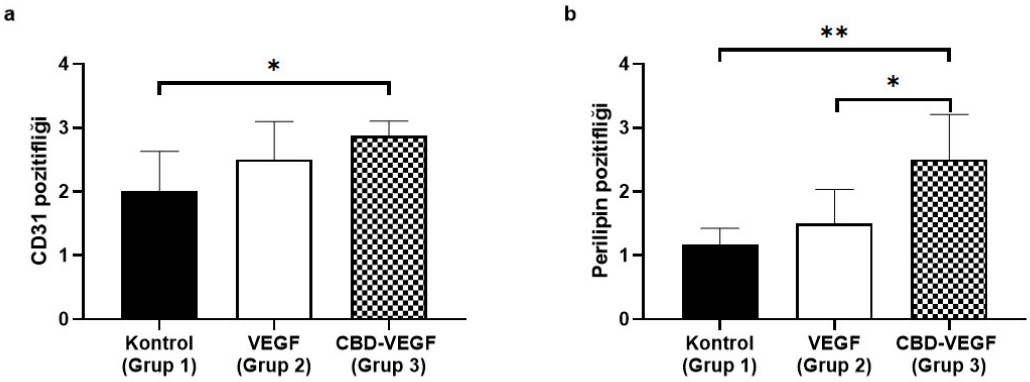
Şekil 5. Yağ greftlerinin ağırlıkları.

Greftlerde meydana gelen fibrozis ve nekroz H&E boyaması ile değerlendirildi. Kontrol grubunun fibrozis skoru 2,92 ± 0,20, nekroz skoru 3,14 ± 0,90 olarak gözlemlendi. VEGF grubunun fibrozis skoru 2,00 ± 0,75, nekroz skoru 2,50 ± 0,76 olarak gözlemlendi. CBD-VEGF grubunda fibrozis skoru 1,50 ± 0,53, nekroz skoru ise 2,06 ± 0,68 olarak gözlemlendi. Analizlerde CBD-VEGF uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla hem fibrozis ($p<0,01$) hem de nekroz skorunda ($p<0,05$) anlamlı düşüş gözlendi (Şekil 6a ve b).



Şekil 6. Grupların **(a)** fibrozis ve **(b)** nekroz skorlama sonuçları.

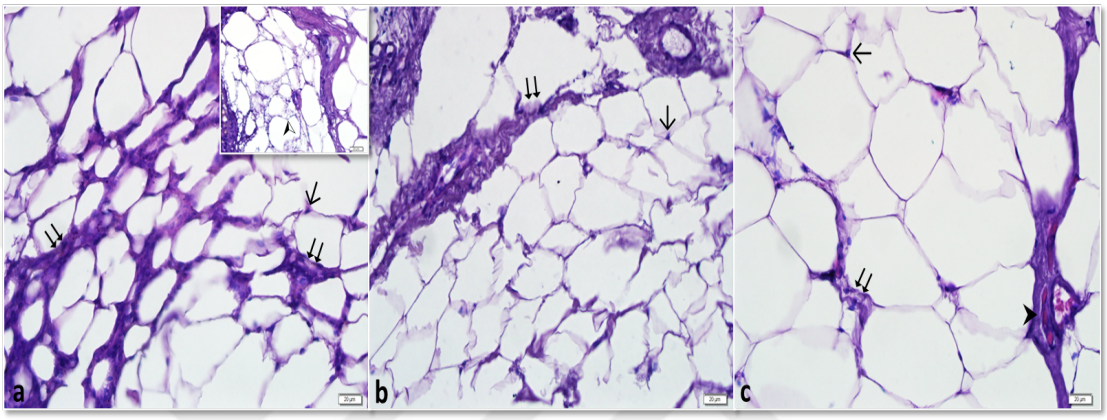
CD31 ve Peripilin boyamalarında ise kontrol grubunun CD31 pozitiflik skoru 2,00 ± 0,63, peripilin pozitiflik skoru 1,17 ± 0,26 olarak gözlemlendi. VEGF grubunun CD31 pozitiflik skoru 2,40 ± 0,59, peripilin pozitiflik skoru 1,50 ± 0,53 olarak gözlemlendi. CBD-VEGF grubunda CD31 pozitiflik skoru 2,87 ± 0,23, peripilin pozitiflik skoru ise 2,50 ± 0,70 olarak gözlemlendi. CD31 pozitifliği CBD-VEGF grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$; Şekil 7a). Ek olarak, perilipin pozitifliği, CBD-VEGF grubunda hem VEGF hem de kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek gözlendi (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,05$; Şekil 7b).



Şekil 7. Grupların **(a)** CD31 ve **(b)** perilipin pozitifliği skorlama sonuçları.

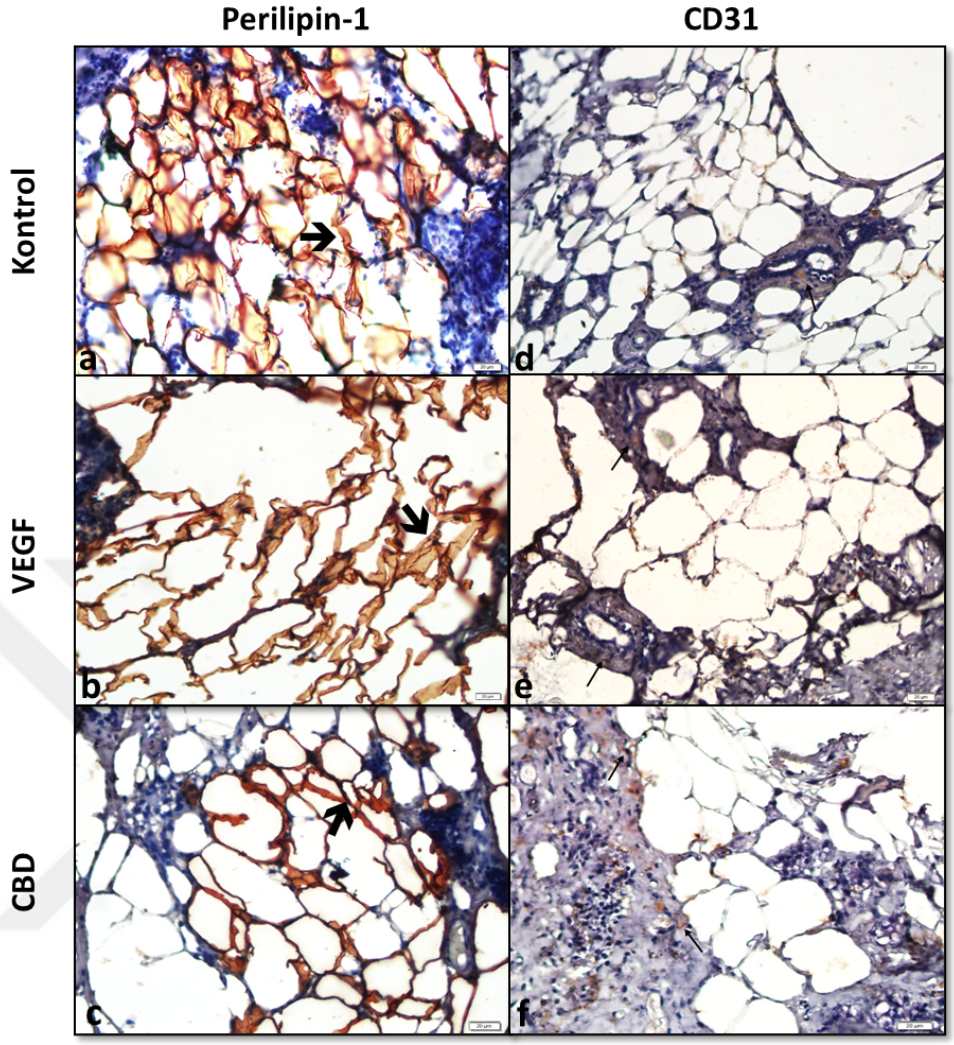
Kontrol grubunda yapılan ışık mikroskobik değerlendirmede adiposit hücre membranlarının yoğun bağ doku ile çevrelendiği, hücre morfolojilerinin bozulduğu,

çekirdek içermeyen hücrelerin varlığı ve yer yer hücre membranında vakuolizasyon gözlenmiştir (Şekil 8a). VEGF grubunda bağ doku yoğunluğunun bir miktar azaldığı, hücre morfolojilerindeki anormalliğin sürdüğü, yer yer çekirdek içermeyen adipositlerin varlığı izlenmiştir (Şekil 8b). CBD-VEGF grubunda intakt hücre çekirdeği içeren, normal görünümde, çevre bağ doku miktarı daha azalmış adipositler izlenmekte ve kapiller miktarında belirgin artış dikkati çekmektedir (Şekil 8c).



Şekil 8. Hematoksilen ve eozin boyaması ile **(a)** grup 1, **(b)** grup 2 ve **(c)** grup 3'ün ışık mikroskobik değerlendirmesinde; adiposit hücre sitoplazmasında vakuolizasyon (⮝), hücrelerin çevresindeki bağ doku (⇊), intakt adiposit hücre çekirdeği (↓) ve kan damarları (➤) görülmektedir. Ölçekler: X20 µm.

Yağ dokularında yapılan perilipin-1 immunohistokimyasal boyamasında kontrol grubuna ait adiposit sitoplazmalarında zayıf immunoreaktivite izlenirken (Şekil 9a), VEGF uygulanan grupta tutulumun orta düzeyde olduğu (Şekil 9b) ve VEGF+CBD grubunda immunoreaktivitenin diğer gruplara göre oldukça yoğun olduğu izlenmiştir (Şekil 9c). Damar duvarlarında gözlenen CD31 ekspresyonu kontrol grubunda orta düzeydeyken (Şekil 9d), VEGF grubunda hafifçe arttığı (Şekil 9e), CBD-VEGF grubunda ise yaygın immunoreaktivite saptanmıştır (Şekil 9f).



Şekil 9. Perilipin-1 immunoreaktivitesinin (🡻) **(a)** kontrol grubunda hafif, **(b)** VEGF grubunda orta ve **(c)** CBD+VEGF grubunda yoğun olduğu görülmektedir. CD31 immunoreaktivitesinin (←) **(d)** kontrol grubunda orta, **(e)** VEGF ve **(f)** CBD+VEGF gruplarında orta ila şiddetli düzeyde olduğu görülmektedir. Ölçekler: X20 µm.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, yağ grefti sağkalımını artırmak amacıyla kolajen bağlanma bölgesi içeren vasküler endotelyal büyüme faktörünün (CBD-VEGF) etkisi araştırılmıştır. Bulgularımız, CBD-VEGF'nin, yağ grefti sağkalımını olumlu yönde etkileyerek hem greft ağırlığında hem de histolojik parametrelerde anlamlı iyileşmelere yol açtığını göstermektedir.

Bu çalışmada önceki literatür çalışmalarında sıkça sıçan kullanılması ve maliyeti uygun olması nedeniyle sıçanlar üzerinde çalışılmıştır. Yağ grefti donör alanı inguinal yağ yastıkçığı belirlenmiş olup alıcı saha ise sırt bölgesi olarak tercih edilmiştir. Sıçanların sırt bölgesine 10 gray RT verildikten sonra önceki literatür çalışmalarına dayanarak 1 ay süre ile fibrozis gelişimi için takip edildi (152). Sonrasında yağ greftleri,CBD-VEGF,VEGF, RT'li bölgeye nakledildi. VEGF ve CBD-VEGF dozlarına karar verilirken önceki yapılan çalışmalardan yararlanıldı (152). Tekrar literatüre bilgileri gözden geçirilerek yağ greftinin sağkalımının değerlendirilmesi için adipogenezisin tamamlanacağı süre olan 8 hafta (2 ay) süre olacak şekilde belirlendi (153).

Yağ enjeksiyonunun en temel amacı, hacim kaybını gidererek doku hacmini artırmak ve estetik konturları düzeltmektir. Yağ enjeksiyonu, yüz gençleştirme, meme büyütme, kontur düzeltme,gluteal augmentasyon, skar tedavisi gibi çeşitli estetik ve medikal uygulamalarda kullanılabilir (2, 20). Özellikle yağ greftlerinin doku rejuvenasyonu ve skar dokusunu iyileştirme potansiyelinin, dokuda elastikiyet artışının içerdiği adiposit kaynaklı kök hücreler ve diğer kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (154-156). Bu hücrelerin dokuda anjiogenezisi ve hücre yenilenmesini arttırdığı düşünülmektedir. Yağ grefti, tamamen hastanın kendi vücudundan elde edildiği için biyolojik olarak uyumludur ve yabancı madde reaksiyonu riskini en aza indirir ve elde edilmesi kolay bir üründür. (3). Yağ dokusunun kullanımının bir diğer avantajı, vücudun farklı bölgelerinden elde edilebilmesi ve bu nedenle hastanın estetik beklentilerine uygun şekilde özelleştirilebilmesidir (23).

Greft sağ kalımı ile ilgili kabul gören günümüzde 2 teori mevcuttur. Bunlardan ilki Peer tarafından öne sürülen transplantasyon sonrası alıcı sahada viabl hücrelerin

yeterli revaskülarizyonu sağladığı takdirde sağkalmayı başardığını belirttiği "hücre sağkalım teorisidir" (46). Diğer teori ise Yoshimura ve arkadaşlarının öne sürdüğü, adipoz kaynaklı kök hücrelerin erken adiposit ölümüyle adipogenez sürecini başlattığı gösterilen "Greft Dönüşüm Teorisidir" (154, 157, 158).

Yağ greftinin rekonstrüktif ve estetik cerrahilerde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, greftin başarısını ve uzun ömürlülüğünü etkileyebilecek birçok zorluk bulunmaktadır (3). Bu zorlukları anlamak, sonuçları iyileştirmek ve greftin sağkalımını artırmak için stratejiler geliştirmek açısından kritiktir. Başlıca zorluklar arasında yüksek rezorpsiyon oranları, öngörülemeyen hacim kaybı ve greft sağkalımını etkileyen faktörler, özellikle de vaskülarizasyon süreçleri, yer almaktadır (38). Bugüne kadar yağ grefti sağ kalımını arttırmaya yönelik çalışmaların odağı Platelet kökenli büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü, VEGF, endotelyal büyüme faktörü, plateletten zengin plazma, aktive edilmiş M2 makrofajlar, matrix metalloproteinase-2, insülin, Vitamin E, eritropoetin, deferoksamin olumuştur (159).

Yapılan çalışmalarda yağ greftlerinin revaskülarizasyonunda VEGF'nin önemli olduğu bulunmuştur (58). VEGF, yağ hücresi apoptoz oranını azaltır ve yağ hücresinin hayatta kalmasını artırır. Topçu ve ark. yaptığı çalışmada VEGF'nin hem vaskülarizasyonu arttırması hem de adipogenezi indüklemesi nedeniyle yağ greftinin canlılığını artırdığını gösterdi (160).VEGF proteini kullanımının sonuçlarının yağ grefti sağ kalımını arttırdığı literatürdeki birçok yayın tarafından belirtilse de VEGF proteininin yarı ömrü yaklaşık 30-45 dakika olduğundan etkileri geçici olabilir (133). VEGF'nin uzun süreli salınımı, alıcı bölge vasküler ağı önemli ölçüde artırır ve daha kaliteli yağ greftlerine katkıda bulunur (134). Ayrıca VEGF'in dokuda lokal olarak etkisinin uzatılmasının sistemik yan etkilerinin engellenmesi üzerine de olumlu etkileri vardır.

CBD-VEGF kollajen bağlanma CBD içeren modifiye edilmiş bir versiyonudur (135). Bu füzyon proteini, VEGF'nin kollajene, yani dokulardaki ekstraselüler matriksin ana bileşenine, spesifik olarak bağlanmasını sağlayarak stabilitesini ve lokal aktivitesini artırmak için tasarlanmıştır (135). CBD eklenmesi, VEGF'in greft

bölgesinde tutulmasını uzatmayı, böylece anjiyojenik etkilerini sürdürebilmeyi ve terapötik sonuçları iyileştirmeyi amaçlar.

Bu kısa süreli aktivite, özellikle yara iyileşmesi, doku mühendisliği veya yağ grefti hayatta kalması gibi kan damarlarının uzun süreli büyümesinin gerekli olduğu durumlarda, VEGF'nin anjiyogenezi teşvik etme etkinliğini azaltabilir.

CBD-VEGF, VEGF'nin ekstraselüler matrikste bulunan kollajen I liflerine bağlanmasını sağlar (135). Bu bağlanma, VEGF'nin ihtiyaç duyulan bölgelerde, örneğin doku hasarı veya implantasyon bölgelerinde lokalize kalmasını sağlar. CBD-VEGF'nin bu bölgelerde kalıcı varlığı, endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve yeni kan damarlarının oluşumunu artırır (137, 138). Bu süreçler, yeterli kan temini ve besinlerin sağlanmasını garanti ederek dokunun yenilenmesi ve greft dokularının hayatta kalması için oldukça önemlidir. Susu Wei ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada CBD-VEGF'in karaciğer hücreleri üzerinde VEGF'in etkilerini potansiyalize ettiğini gösterdi (161). Jia Yin ve arkadaşlarının Mayıs 2022 tarihinde yaptığı çalışmada CBD-VEGF'in serebral iskemi üzerine olumlu etkileri olduğunu gösterdi (161). Chunying Shi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ise kronik iskemiye maruz kalmış domuz myokard hücrelerinin rejenerasyonuna CBD-VEGF'in katkı sağladığı gösterilmiştir (161). Yanni Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise aselüler dermal matrikse emdirilmiş CBD-VEGF'in Beagle türü köpeklerde üretral hasar onarımında etkisi olduğu gösterilmiştir (162). Yapılan çalışmalar CBD-VEGF'in anjiogenez ve hücre rejenerasyonunu arttırdığı, apoptozu engellediği gösterilse de literatürde CBD-VEGF'in yağ grefti üzerine yapılan bir çalışmasına rastlanmadı.

Öncelikle, CBD-VEGF uygulanan grupta yağ grefti ağırlığının hem kontrol grubuna hem de sadece VEGF uygulanan gruba göre anlamlı derecede daha yüksek bulunması, CBD-VEGF'nin greft sağkalımını desteklediğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, VEGF'nin anjiyogenez üzerindeki bilinen etkileri ile tutarlıdır (160); ancak, kolajen bağlanma bölgesinin eklenmesi ile bu etkinin daha da güçlendiği görülmektedir. Bu durum, CBD-VEGF'nin greft bölgesinde daha stabilize olmuş ve etkin bir anjiyogenez yanıtı oluşturabileceğini düşündürmektedir. Kolajen bağlanma bölgesinin VEGF'ye eklenmesi, proteinin greft bölgesinde kolajene bağlanarak daha uzun süreli stabil kalmasına olanak tanıyabilir (135). Bu, VEGF'nin biyoyararlanımını

artırarak greft bölgesinde daha güçlü bir anjiyogenez yanıtı oluşturur. Literatürde, CBD-VEGF gibi modifiye edilmiş büyüme faktörlerinin, yara iyileşmesi ve doku mühendisliği gibi uygulamalarda, standart VEGF'ye kıyasla daha üstün performans gösterdiği bildirilmiştir (163, 164). Özellikle, CBD-VEGF'nin kollajen içeren dokularda daha uzun süreli etkinlik sağlayarak anjiyogenezi desteklediği ve böylece greft sağkalımını artırdığı gösterilmiştir (135, 165).

Histolojik analizlerde alınan sonuçlar da CBD-VEGF'nin greft sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir. CBD-VEGF grubunun nekroz ve fibrozis skorlarının kontrol grubuyla yapılan kıyaslamasından elde edilen sonuçlar, CBD-VEGF'nin yağ grefti sonrası oluşan fibrozis ve nekroz düzeylerini anlamlı şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, CBD-VEGF'nin doku iyileşmesi ve yağ greftlerinin uzun vadeli sağkalımını destekleyici bir etkiye sahip olduğunu öne sürmektedir. Fibrozis, yağ greftlemenin yaygın bir komplikasyonu olup, greftin mekanik ve fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkileyebilir (166, 167). Çalışmamızda, CBD-VEGF ile tedavi edilen grupta gözlenen düşük fibrozis skorları, CBD-VEGF'nin greft bölgesinde daha etkin bir doku entegrasyonu sağladığını ve fibrotik yanıtı baskıladığını göstermektedir. Literatürde, VEGF'nin anjiyojenik etkileri iyi bilinmektedir (168, 169) ancak kolajen bağlanma bölgesinin eklenmesiyle bu etkinin güçlendiği ve doku rejenerasyonunun optimize edildiği görülmektedir (170-172).

Benzer şekilde, nekroz skorlarının CBD-VEGF grubunda anlamlı derecede düşük bulunması, bu grubun daha iyi bir vaskülarizasyon sağlayarak greftin sağkalımını desteklediğini göstermektedir. Nekroz, yetersiz kanlanma sonucu hücre ölümüne yol açarak greft başarısızlığına neden olabilir (166, 173). CBD-VEGF'nin endotel hücrelerine bağlanma ve yeni damar oluşumunu teşvik etme yeteneği, greftin merkezi bölgelerinde dahi yeterli oksijen ve besin sağlanmasını mümkün kılmaktadır (135, 165). Bu sonuçlar, CBD-VEGF'nin greft sağkalımını iyileştirme potansiyelini desteklemekte ve bu modifiye edilmiş büyüme faktörünün klinik uygulamalarda kullanımı için güçlü bir temel sunmaktadır.

Çalışmada elde edilen bulgular, CBD-VEGF ile tedavi edilen grupta CD31 ve perilipin pozitiflik oranlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, CBD-VEGF'nin hem vaskülarizasyonu artırarak anjiyogenezi desteklediğini hem de adipositlerin sağkalımını iyileştirdiğini

düşündürmektedir. CD31, endotel hücrelerinde yoğun olarak eksprese edilen ve mikrodamar yoğunluğunu değerlendirmek için kullanılan bir belirteçtir (174, 175). CBD-VEGF grubunda gözlenen yüksek CD31 pozitiflik skoru (287 ± 0.23), bu grupta artmış anjiyogenez sürecine işaret etmektedir. VEGF'nin yeni kan damarı oluşumunu teşvik etme rolü iyi bilinmektedir; ancak, CBD-VEGF'nin greft bölgesinde daha stabil ve lokalize olmasını sağlayan kolajen bağlanma bölgesinin eklenmesi, bu anjiyojenik yanıtın daha etkili ve uzun süreli olmasına katkıda bulunmuş olabilir (170-172).

Perilipin, adipositlerde lipid damlacıklarının oluşumu ile ilişkili bir proteindir ve adiposit canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (176, 177). CBD-VEGF grubunda perilipin pozitiflik skorunun daha yüksek bulunması (2,50 ± 0,70), bu grupta adiposit sağkalımının ve fonksiyonunun iyileştiğini göstermektedir. Artan CD31 pozitifliğiyle işaret edilen gelişmiş vaskülarizasyon, greft bölgesine yeterli oksijen ve besin maddelerinin taşınmasını sağlamakta ve bu durum da adipositlerin sağkalımını ve fonksiyonunu desteklemektedir (178, 179). Literatür verilerine dayanarak VEGF uygulanan grupta kontrol grubuna göre nekroz ve fibrozisin anlamlı olarak düşük olması beklenirdi. CD31 ve peripilin boyamaları ise istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek çıkması beklenirdi.Çalışmamızda sonuçların literatür verileriyle korele ancak istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması VEGF'in yarı ömrünün kısa olması sebebiyle sırt bölgesinde RT'li dokuda etkisinin kısa sürmesine veya çalışmamızda uygulanan doz olan 0,5nmol'ün (10,32 µg) düşük olmasına bağlanabilir.

İnsan yağ grefti uygulamalarında greft materyali minimum travmaya maruz kalarak steril koşullarda transfer edilmektedir. Sıçan modelinde bu koşulların sağlanamaması çalışmayı kısıtlayan faktörlerden birtanesidir. Ayrıca günümüz pratiğinde yağ grefti enjektör veya kanül ile küçük parçalar şeklinde transfer edilirken çalışmamızda yağ greftleri tek parça halinde uygulanmıştır. Çalışmamızın bir diğer kısıtlılığı olarak görülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, CBD-VEGF'nin yağ greftlerinin sağkalımını ve kalitesini artırmada önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Histolojik analizler, CBD-VEGF uygulamasının greft bölgesinde fibrozis ve nekroz gibi istenmeyen doku reaksiyonlarını anlamlı derecede azalttığını ve aynı zamanda anjiyogenezi ve adiposit sağkalımını artırdığını ortaya koymuştur. Özellikle, CBD-VEGF'nin kolajen bağlanma bölgesi aracılığıyla greft bölgesinde daha uzun süre stabilize olması, bu proteinin lokal biyolojik aktivitelerini artırarak doku rejenerasyonunu ve greft entegrasyonunu desteklemektedir. Bu bulgular, CBD-VEGF'nin yağ greftleme prosedürlerinde daha etkili sonuçlar elde etmek amacıyla kullanılabilecek bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Bununla birlikte, bu çalışmanın sonuçları, CBD-VEGF'nin klinik uygulamalarda nasıl en iyi şekilde kullanılabileceği konusunda daha fazla araştırma gerektirdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle, CBD-VEGF'nin farklı dozajları, uygulama yöntemleri ve greftleme süreçlerinin sonuçlar üzerindeki etkisi değerlendirilmelidir. Ayrıca, bu yaklaşımın uzun vadeli etkinliğini ve güvenliğini belirlemek amacıyla geniş ölçekli klinik öncesi ve klinik çalışmaların yapılmalıdır.

Sonuç olarak, CBD-VEGF'nin yağ greftlerinin sağkalımını artırmadaki potansiyeli göz önüne alındığında, bu modifiye büyüme faktörünün, yağ greftleme işlemlerinde kullanılan mevcut protokollere dahil edilmesi, greft başarı oranını ve hasta memnuniyetini artırabilecek yenilikçi bir tedavi stratejisi olarak öne çıkmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, bu stratejinin optimizasyonuna ve geniş klinik uygulamalarda kullanımına yönelik ayrıntılı değerlendirmeler yaparak, CBD-VEGF'nin terapötik potansiyelini en üst düzeye çıkarmayı hedeflemelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Toplu G, Altınel D. Facial Contouring and Rejuvenation with the Use of Fat Injection. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2021;11(1):61-6.

2. Shauly O, Gould DJ, Ghavami A. Fat Grafting: Basic Science, Techniques, and Patient Management. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2022;10(3):e3987.

3. Abu-Ghname A, Perdanasari AT, Reece EM. Principles and Applications of Fat Grafting in Plastic Surgery. Semin Plast Surg. 2019;33(3):147-54.

4. Rao AYN, Reddy SN, Chandrappa AB, Vasudevan S, Batth R. A Study of Aesthetic and Functional Outcome Following Structural Fat Grafting for Facial Scars and Contour Deformity. Craniomaxillofac Trauma Reconstr. 2020;13(4):305-12.

5. Sinna R, Delay E, Garson S, Delaporte T, Toussoun G. Breast fat grafting (lipomodelling) after extended latissimus dorsi flap breast reconstruction: a preliminary report of 200 consecutive cases. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(11):1769-77.

6. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. Aesthet Surg J. 2009;29(5):360-76.

7. Missana MC, Laurent I, Barreau L, Balleyguier C. Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. Eur J Surg Oncol. 2007;33(6):685-90.

8. Khouri R, Del Vecchio D. Breast reconstruction and augmentation using pre-expansion and autologous fat transplantation. Clin Plast Surg. 2009;36(2):269-80, viii.

9. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. Laryngoscope. 2000;110(8):1333-8.

10. Smith P, Adams WP, Jr., Lipschitz AH, et al. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. Plast Reconstr Surg. 2006;117(6):1836-44.

11. Herold J, Kalucka J. Angiogenesis in Adipose Tissue: The Interplay Between Adipose and Endothelial Cells. Front Physiol. 2020;11:624903.

12. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. Nat Rev Drug Discov. 2016;15(6):385-403.

13. Pérez-Gutiérrez L, Ferrara N. Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A. Nat Rev Mol Cell Biol. 2023;24(11):816-34.

14. Rohner E, Yang R, Foo KS, Goedel A, Chien KR. Unlocking the promise of mRNA therapeutics. Nat Biotechnol. 2022;40(11):1586-600.

15. Spałek M. Chronic radiation-induced dermatitis: challenges and solutions. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2016;9:473-82.

16. Bray FN, Simmons BJ, Wolfson AH, Nouri K. Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. Dermatol Ther (Heidelb). 2016;6(2):185-206.

17. Kim JH, Kolozsvary AJ, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced skin injury and implications for future clinical trials. Int J Radiat Biol. 2013;89(5):311-8.

18. Feng J, Doi K, Kuno S, et al. Micronized cellular adipose matrix as a therapeutic injectable for diabetic ulcer. Regen Med. 2015;10(6):699-708.

19. Vasavada A, Raggio BS. Autologous Fat Grafting for Facial Rejuvenation. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

20. Riyat H, Touil LL, Briggs M, Shokrollahi K. Autologous fat grafting for scars, healing and pain: a review. Scars Burn Heal. 2017;3:2059513117728200.

21. Fiedler LS, Saleh DB, Mukrowsky A. Autologous fat grafting in the face and neck: Multinational trends and knowledge of the safety, applications, and indications considering oncologic risk potential. Laryngoscope Investig Otolaryngol. 2021;6(5):1024-30.

22. Vermeersch N, De Fré M, Verhoeven V, Hunter JE, Tondu T, Thiessen FEF. Autologous fat transfer for hand rejuvenation: A systematic review on technique and outcome. JPRAS Open. 2022;32:182-94.

23. Livaoğlu M, Yavuz E. Soft tissue augmentation with autologous fat graft: the dissected pouch technique. J Cutan Aesthet Surg. 2009;2(1):21-5.

24. Bellini E, Grieco MP, Raposio E. The science behind autologous fat grafting. Ann Med Surg (Lond). 2017;24:65-73.

25. Kononas TC, Bucky LP, Hurley C, May JW, Jr. The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in the rabbit. Plast Reconstr Surg. 1993;91(5):763-8.

26. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. Plast Reconstr Surg. 1990;85(3):378-86; discussion 87-9.

27. Fagrell D, Eneström S, Berggren A, Kniola B. Fat cylinder transplantation: an experimental comparative study of three different kinds of fat transplants. Plast Reconstr Surg. 1996;98(1):90-6; discussion 7-8.

28. Gause TM, 2nd, Kling RE, Sivak WN, Marra KG, Rubin JP, Kokai LE. Particle size in fat graft retention: A review on the impact of harvesting technique in lipofilling surgical outcomes. Adipocyte. 2014;3(4):273-9.

29. Rajan S, Ajayakumar K, Sasidharanpillai S, George B. Autologous Fat Graft for Soft Tissue Camouflage in Craniofacial Microsomia. J Cutan Aesthet Surg. 2019;12(4):223-6.

30. Lamblet H, Ferreira LM. Fat obtained from plastic surgery procedures-stem cells derived from adipose tissue and their potential in technological innovation: a narrative literature review and perspective on dissociative methods. Eur J Plast Surg. 2022;45(5):701-31.

31. Tunca M, Süslü NS, Karaosmanoğlu AA. Fat transfer after parotidectomy: fat resorption rates, aesthetic and functional outcomes of en-bloc fat graft versus lipofilling technique. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2021;278(10):3933-40.

32. Simonacci F, Bertozzi N, Grieco MP, Raposio E. From liposuction to adipose-derived stem cells: indications and technique. Acta Biomed. 2019;90(2):197-208.

33. Urbonas T, Kievišas M, Petrikaitė V, et al. Assessing Adipocyte Viability and Surgeons' Work Efficiency by Comparing Different Liposuction Methods. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2023;11(8):e5190.

34. Cheriyan T, Kao HK, Qiao X, Guo L. Low harvest pressure enhances autologous fat graft viability. Plast Reconstr Surg. 2014;133(6):1365-8.

35. Fontes T, Brandão I, Negrão R, Martins MJ, Monteiro R. Autologous fat grafting: Harvesting techniques. Ann Med Surg (Lond). 2018;36:212-8.

36. Hoareau L, Bencharif K, Girard AC, et al. Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013;66(5):712-9.

37. Harris LLS, Shew TM, Skinner JR, Wolins NE. A single centrifugation method for isolating fat droplets from cells and tissues. J Lipid Res. 2012;53(5):1021-5.

38. Ferroni L, De Francesco F, Pinton P, Gardin C, Zavan B. Chapter 12 - Methods to isolate adipose tissue-derived stem cells. In: Vitale I, Manic G, Galluzzi L, editors. Methods in Cell Biology. 171: Academic Press; 2022. p. 215-28.

39. Toledo LS, Mauad R. Fat injection: a 20-year revision. Clin Plast Surg. 2006;33(1):47-53, vi.

40. Hajimortezayi Z, Daei N, Gholizadeh N, et al. Fat transplant: Amazing growth and regeneration of cells and rebirth with the miracle of fat cells. J Cosmet Dermatol. 2024;23(4):1141-9.

41. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. Plast Reconstr Surg. 2006;118(3 Suppl):108s-20s.

42. Romeo M, Elmeligy A, Elsherbeny K. Fat grafting in body contouring. Body Contour Sculpt. 2016;167.

43. Ramon Y, Shoshani O, Peled IJ, et al. Enhancing the take of injected adipose tissue by a simple method for concentrating fat cells. Plastic and reconstructive surgery. 2005;115(1):197-201.

44. Shaaban A, Anwar M, Ramadan R. The role of platelet rich plasma enriched fat graft for correction of deformities after conservative breast surgery. Breast Dis. 2024;43(1):111-8.

45. Khouri RK, Jr., Khouri RE, Lujan-Hernandez JR, Khouri KR, Lancerotto L, Orgill DP. Diffusion and perfusion: the keys to fat grafting. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2014;2(9):e220.

46. Peer LA. Cell survival theory versus replacement theory. Plast Reconstr Surg (1946). 1955;16(3):161-8.

47. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: a comprehensive study. Ann Plast Surg. 2005;54(3):288-92; discussion 92.

48. Guyuron B, Majzoub RK. Facial augmentation with core fat graft: a preliminary report. Plast Reconstr Surg. 2007;120(1):295-302.

49. Alessandri-Bonetti M, Egro FM, Persichetti P, Coleman SR, Peter Rubin J. The Role of Fat Grafting in Alleviating Neuropathic Pain: A Critical Review of the Literature. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2019;7(5):e2216.

50. Kølle SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2013;382(9898):1113-20.

51. Gabriel A, Champaneria MC, Maxwell GP. Fat grafting and breast reconstruction: tips for ensuring predictability. Gland Surg. 2015;4(3):232-43.

52. Trivisonno A, Alexander RW, Baldari S, et al. Intraoperative Strategies for Minimal Manipulation of Autologous Adipose Tissue for Cell- and Tissue-Based Therapies: Concise Review. Stem Cells Transl Med. 2019;8(12):1265-71.

53. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. Clin Plast Surg. 1997;24(2):347-67.

54. Shiffman MA. Autologous fat transfer: art, science, and clinical practice: Springer Science & Business Media; 2009.

55. Brown K, McCoskey M, Nakra T. Complications of facial autologous fat grafting. 2024.

56. Evans BGA, Gronet EM, Saint-Cyr MH. How Fat Grafting Works. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2020;8(7):e2705.

57. Vyas KS. The Role of Fat Grafting and Adipose-Derived Stem Cells in Breast Reconstruction. 2016.

58. Sarkarat F, Kahali R. Fat Graft with Growth Factors. Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2018;26(1):33-9.

59. Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. Madame Curie Bioscience Database [Internet]: Landes Bioscience; 2013.

60. Wang Y, Kankala RK, Ou C, Chen A, Yang Z. Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening. Bioact Mater. 2022;9:198-220.

61. Elomaa L, Yang YP. Additive Manufacturing of Vascular Grafts and Vascularized Tissue Constructs. Tissue Eng Part B Rev. 2017;23(5):436-50.

62. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. Angiogenesis. 2018;21(3):425-532.

63. Keshavarz M, Smith Q. Gelatin-Mediated Vascular Self-Assembly via a YAP-MMP Signaling Axis. Advanced Functional Materials. 2024;n/a(n/a):2402360.

64. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. Genes Cancer. 2011;2(12):1117-33.

65. Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. Biochem Pharmacol. 2000;59(1):47-53.

66. Zhang F, King MW. Immunomodulation Strategies for the Successful Regeneration of a Tissue-Engineered Vascular Graft. Advanced Healthcare Materials. 2022;11(12):2200045.

67. Dang J, Yang J, Yu Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells enhance angiogenesis and promote fat retention in fat grafting via polarized macrophages. Stem Cell Res Ther. 2022;13(1):52.

68. Whiteford JR, De Rossi G, Woodfin A. Chapter Six - Mutually Supportive Mechanisms of Inflammation and Vascular Remodeling. In: Jeon KW, Galluzzi L, editors. International Review of Cell and Molecular Biology. 326: Academic Press; 2016. p. 201-78.

69. Mata R, Yao Y, Cao W, et al. The Dynamic Inflammatory Tissue Microenvironment: Signality and Disease Therapy by Biomaterials. Research (Wash D C). 2021;2021:4189516.

70. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. Genes Cancer. 2011;2(12):1097-105.

71. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. FEBS Lett. 2006;580(12):2879-87.

72. Cabaj A, Moszyńska A, Charzyńska A, Bartoszewski R, Dąbrowski M. Functional and HRE motifs count analysis of induction of selected hypoxia-responsive genes by HIF-1 and HIF-2 in human umbilical endothelial cells. Cell Signal. 2022;90:110209.

73. Zhao Y, Xing C, Deng Y, Ye C, Peng H. HIF-1α signaling: Essential roles in tumorigenesis and implications in targeted therapies. Genes Dis. 2024;11(1):234-51.

74. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. Mol Cells. 2010;29(5):435-42.

75. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. Blood. 2005;105(2):659-69.

76. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. J Cell Physiol. 2009;219(2):449-58.

77. Losordo DW, Isner JM. Estrogen and angiogenesis: A review. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(1):6-12.

78. Huijbers EJM, Khan KA, Kerbel RS, Griffioen AW. Tumors resurrect an embryonic vascular program to escape immunity. Sci Immunol. 2022;7(67):eabm6388.

79. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. Rom J Morphol Embryol. 2018;59(2):455-67.

80. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003;9(6):669-76.

81. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2002;282(5):C947-C70.

82. Dakowicz D, Zajkowska M, Mroczko B. Relationship between VEGF Family Members, Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2022;23(6).

83. Weddell JC, Chen S, Imoukhuede PI. VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLCγ and PI3K pathways. NPJ Syst Biol Appl. 2018;4:1.

84. Ceci C, Atzori MG, Lacal PM, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. Int J Mol Sci. 2020;21(4).

85. Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. Biochem Soc Trans. 2003;31(Pt 6):1171-7.

86. Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, Durán WN. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. Microvasc Res. 2001;62(3):252-62.

87. Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. Exp Cell Res. 2013;319(9):1348-55.

88. Mabeta P. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase is associated with reduced angiogenesis and an altered expression of angiogenic markers in endothelioma cells. Biomed Pharmacother. 2014;68(5):611-7.

89. Qi JH, Claesson-Welsh L. VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. Exp Cell Res. 2001;263(1):173-82.

90. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Cell. 2019;176(6):1248-64.

91. Grassot J, Gouy M, Perrière G, Mouchiroud G. Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains. Mol Biol Evol. 2006;23(6):1232-41.

92. White AL, Bix GJ. VEGFA Isoforms as Pro-Angiogenic Therapeutics for Cerebrovascular Diseases. Biomolecules. 2023;13(4).

93. Wang K, Wang B, Wang Z, Yang R. Alginic acid inhibits non-small cell lung cancer-induced angiogenesis via activating miR-506 expression. J Nat Med. 2021;75(3):553-64.

94. Wang L, Zhao L, Zhang L, et al. [Vascular endothelial growth factor promotes cancer stemness of triple-negative breast cancer via MAPK/ERK pathway]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2021;41(10):1484-91.

95. Watari K, Shibata T, Fujita H, et al. NDRG1 activates VEGF-A-induced angiogenesis through PLCγ1/ERK signaling in mouse vascular endothelial cells. Commun Biol. 2020;3(1):107.

96. Zhou Y, Zhu X, Cui H, et al. The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. Front Cardiovasc Med. 2021;8:738325.

97. Wiszniak S, Schwarz Q. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. Biomolecules. 2021;11(1).

98. Zhou H, Geng F, Chen Y, et al. The mineral dust-induced gene, mdig, regulates angiogenesis and lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma by modulating the expression of VEGF-A/C/D via EGFR and HIF-1α signaling. Oncol Rep. 2021;45(5).

99. Koizumi K, Shintani T, Hayashido Y, et al. VEGF-A promotes the motility of human melanoma cells through the VEGFR1-PI3K/Akt signaling pathway. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2022;58(8):758-70.

100. Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Pooshang Bagheri K, et al. Expression and purification of functional human vascular endothelial growth factor-a121; the most important angiogenesis factor. Adv Pharm Bull. 2014;4(4):323-8.

101. Nakatsu MN, Sainson RC, Pérez-del-Pulgar S, et al. VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. Lab Invest. 2003;83(12):1873-85.

102. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. Br J Cancer. 2000;83(1):63-8.

103. Zhang Y, Furumura M, Morita E. Distinct signaling pathways confer different vascular responses to VEGF 121 and VEGF 165. Growth Factors. 2008;26(3):125-31.

104. Tsai JL, Lee YM, Pan CY, Lee AY. The Novel VEGF121-VEGF165 Fusion Attenuates Angiogenesis and Drug Resistance via Targeting VEGFR2-HIF-1α-VEGF165/Lon Signaling Through PI3K-AKT-mTOR Pathway. Curr Cancer Drug Targets. 2016;16(3):275-86.

105. Wild R, Dhanabal M, Olson TA, Ramakrishnan S. Inhibition of angiogenesis and tumour growth by VEGF121-toxin conjugate: differential effect on proliferating endothelial cells. Br J Cancer. 2000;83(8):1077-83.

106. Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ, et al. VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. Br J Cancer. 2009;101(7):1183-93.

107. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. Cancer Res. 2004;64(21):7822-35.

108. Konopatskaya O, Churchill AJ, Harper SJ, Bates DO, Gardiner TA. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. Mol Vis. 2006;12:626-32.

109. Magnussen AL, Rennel ES, Hua J, et al. VEGF-A165b is cytoprotective and antiangiogenic in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51(8):4273-81.

110. Yue X, Tomanek RJ. Effects of VEGF(165) and VEGF(121) on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;280(5):H2240-7.

111. Usui T, Ishida S, Yamashiro K, et al. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45(2):368-74.

112. Ganta VC, Choi M, Kutateladze A, Annex BH. VEGF165b Modulates Endothelial VEGFR1-STAT3 Signaling Pathway and Angiogenesis in Human and Experimental Peripheral Arterial Disease. Circ Res. 2017;120(2):282-95.

113. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell. 1993;4(12):1317-26.

114. Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. Am J Pathol. 2008;172(1):167-78.

115. Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, et al. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(9):6023-8.

116. Vintonenko N, Pelaez-Garavito I, Buteau-Lozano H, et al. Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions. Cell Adh Migr. 2011;5(4):332-43.

117. Lee C, Chen R, Sun G, et al. VEGF-B prevents excessive angiogenesis by inhibiting FGF2/FGFR1 pathway. Signal Transduct Target Ther. 2023;8(1):305.

118. Zhang F, Tang Z, Hou X, et al. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(15):6152-7.

119. Robciuc MR, Kivelä R, Williams IM, et al. VEGFB/VEGFR1-Induced Expansion of Adipose Vasculature Counteracts Obesity and Related Metabolic Complications. Cell Metab. 2016;23(4):712-24.

120. Bower NI, Vogrin AJ, Le Guen L, et al. Vegfd modulates both angiogenesis and lymphangiogenesis during zebrafish embryonic development. Development. 2017;144(3):507-18.

121. Gore AV, Swift MR, Cha YR, et al. Rspo1/Wnt signaling promotes angiogenesis via Vegfc/Vegfr3. Development. 2011;138(22):4875-86.

122. Villefranc JA, Nicoli S, Bentley K, et al. A truncation allele in vascular endothelial growth factor c reveals distinct modes of signaling during lymphatic and vascular development. Development. 2013;140(7):1497-506.

123. Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, et al. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. Nat Cell Biol. 2011;13(10):1202-13.

124. Nagai N, Minami T. Emerging Role of VEGFC in Pathological Angiogenesis. EBioMedicine. 2015;2(11):1588-9.

125. Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med. 2002;8(8):831-40.

126. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. Nat Med. 2001;7(5):575-83.

127. Yang X, Zhang Y, Yang Y, et al. Vascular endothelial growth factor-dependent spatiotemporal dual roles of placental growth factor in modulation of angiogenesis and tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(34):13932-7.

128. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of

the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. Hum Gene Ther. 2005;16(12):1422-8.

129. Bais C, Wu X, Yao J, et al. PlGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth. Cell. 2010;141(1):166-77.

130. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. Exp Mol Med. 2012;44(1):1-9.

131. Hong SJ, Lee JH, Hong SM, Park CH. Enhancing the viability of fat grafts using new transfer medium containing insulin and beta-fibroblast growth factor in autologous fat transplantation. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(7):1202-8.

132. Yi CG, Xia W, Zhang LX, et al. VEGF gene therapy for the survival of transplanted fat tissue in nude mice. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2007;60(3):272-8.

133. Hazama K, Nishibe T, Shimada T, et al. Effects of omental wrap on performance of small-caliber high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts. J Surg Res. 1999;81(2):174-80.

134. Li L, Pan S, Ni B, Lin Y. Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF-PLA nano-sustained release microspheres. Cell Biol Int. 2014;38(8):962-70.

135. Zhang J, Ding L, Zhao Y, et al. Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction. Circulation. 2009;119(13):1776-84.

136. Shi C, Zhao Y, Yang Y, et al. Collagen-binding VEGF targeting the cardiac extracellular matrix promotes recovery in porcine chronic myocardial infarction. Biomater Sci. 2018;6(2):356-63.

137. Bang FS, Leeberg V, Ding M, Dreyer CH. The effect of VEGF stimulation in diabetic foot ulcers: A systematic review. Wound Repair Regen. 2024;32(4):384-92.

138. Wu K, Huang R, Wu H, et al. Collagen-binding vascular endothelial growth factor attenuates CCl4-induced liver fibrosis in mice. Mol Med Rep. 2016;14(5):4680-6.

139. Ramia P, Bodgi L, Mahmoud D, et al. Radiation-Induced Fibrosis in Patients with Head and Neck Cancer: A Review of Pathogenesis and Clinical Outcomes. Clin Med Insights Oncol. 2022;16:11795549211036898.

140. Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. J Cancer Res Clin Oncol. 2015;141(11):1985-94.

141. Tsimponis A, Dionyssiou D, Papamitsou T, Demiri E. The effect of host tissue and radiation on fat-graft survival: A comparative experimental study. JPRAS Open. 2023;38:134-46.

142. Valente DS, Ely PB, Kieling L, et al. Breast fat grafting and cancer: a systematic review of the science behind enhancements and concerns. Transl Breast Cancer Res. 2024;5:14.

143. Choi DH, Oh D, Na K, et al. Radiation induces acute and subacute vascular regression in a three-dimensional microvasculature model. Front Oncol. 2023;13:1252014.

144. Yildiran G, Akdağ O, Cicek G, et al. Increased fat graft survival with mesenchymal stem cell recruiting effect of PRP: in vitro and in vivo study of application techniques. Genel Tıp Dergisi. 2022;32(2):207-14.

145. Purkayastha A, Sharma N, Sarin A, et al. Radiation Fibrosis Syndrome: the Evergreen Menace of Radiation Therapy. Asia Pac J Oncol Nurs. 2019;6(3):238-45.

146. Garza RM, Paik KJ, Chung MT, et al. Studies in fat grafting: Part III. Fat grafting irradiated tissue--improved skin quality and decreased fat graft retention. Plast Reconstr Surg. 2014;134(2):249-57.

147. Doren EL, Parikh RP, Laronga C, et al. Sequelae of fat grafting postmastectomy: an algorithm for management of fat necrosis. Eplasty. 2012;12:e53.

148. Fracol M, Allison S, Chu Y, et al. The Palpable Nodule after Autologous Fat Grafting: Distinguishing Benign versus Malignant Lesions in Breast Reconstruction. Plast Reconstr Surg. 2022;150:20s-9s.

149. Lin JY, Song P, Pu LLQ. Management of Fat Necrosis after Autologous Fat Transplantation for Breast Augmentation. Plast Reconstr Surg. 2018;142(5):665e-73e.

150. Qu Y, Wang Q, Fu S, Guo X, Luan J, Mu D. The Effect of Thymosin beta4 on the Survival of Autologous Fat Grafting: A Preliminary Study. Aesthet Surg J. 2020;40(9):Np519-np29.

151. Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. BMC Bioinformatics. 2006;7:123.

152. Chen X, Qin W, Wang L, Jin Y, Tu J, Yuan X. Autophagy gene Atg7 regulates the development of radiation-induced skin injury and fibrosis of skin. Skin Res Technol. 2023;29(6):e13337.

153. Hamed S, Egozi D, Kruchevsky D, Teot L, Gilhar A, Ullmann Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. PLoS One. 2010;5(11):e13986.

154. Eto H, Kato H, Suga H, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. Plast Reconstr Surg. 2012;129(5):1081-92.

155. Eto H, Suga H, Inoue K, et al. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis. Am J Pathol. 2011;178(5):2322-32.

156. Kato H, Mineda K, Eto H, et al. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3 months. Plast Reconstr Surg. 2014;133(3):303e-13e.

157. Suga H, Eto H, Aoi N, et al. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. Plast Reconstr Surg. 2010;126(6):1911-23.

158. Mashiko T, Yoshimura K. How does fat survive and remodel after grafting? Clin Plast Surg. 2015;42(2):181-90.

159. Temiz G, Sirinoglu H, Yesiloglu N, Filinte D, Kaçmaz C. Effects of Deferoxamine on Fat Graft Survival. Facial Plast Surg. 2016;32(4):438-43.

160. Topcu A, Aydin OE, Ünlü M, Barutcu A, Atabey A. Increasing the viability of fat grafts by vascular endothelial growth factor. Archives of facial plastic surgery. 2012;14(4):270-6.

161. Wei S, Li Z, Shi Q, et al. Collagen-binding vascular endothelial growth factor (CBD-VEGF) promotes liver regeneration in murine partial hepatectomy. Mol Med Rep. 2022;26(5).

162. Wang Y, Wang G, Hou X, et al. Urethral Tissue Reconstruction Using the Acellular Dermal Matrix Patch Modified with Collagen-Binding VEGF in Beagle Urethral Injury Models. Biomed Res Int. 2021;2021:5502740.

163. Yan X, Chen B, Lin Y, et al. Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. Diabetes Res Clin Pract. 2010;90(1):66-72.

164. Gao J, Liu J, Gao Y, et al. A myocardial patch made of collagen membranes loaded with collagen-binding human vascular endothelial growth factor accelerates healing of the injured rabbit heart. Tissue Eng Part A. 2011;17(21-22):2739-47.

165. Tan Q, Chen B, Yan X, et al. Promotion of diabetic wound healing by collagen scaffold with collagen-binding vascular endothelial growth factor in a diabetic rat model. J Tissue Eng Regen Med. 2014;8(3):195-201.

166. Liu X, Yao Y, Zhu Y, Lu F, Chen X. Inhibition of Adipocyte Necroptosis Alleviates Fat Necrosis and Fibrosis After Grafting in a Murine Model. Aesthet Surg J. 2024;44(8):Np585-np605.

167. Chen X, Deng Z, Feng J, Chang Q, Lu F, Yuan Y. Necroptosis in Macrophage Foam Cells Promotes Fat Graft Fibrosis in Mice. Front Cell Dev Biol. 2021;9:651360.

168. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004;25(4):581-611.

169. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280(6):C1358-66.

170. Park SH, Uzawa T, Hattori F, et al. "All-in-one" in vitro selection of collagen-binding vascular endothelial growth factor. Biomaterials. 2018;161:270-8.

171. Ishikawa T, Eguchi M, Wada M, et al. Establishment of a functionally active collagen-binding vascular endothelial growth factor fusion protein in situ. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(9):1998-2004.

172. Chan TR, Stahl PJ, Yu SM. Matrix-Bound VEGF Mimetic Peptides: Design and Endothelial Cell Activation in Collagen Scaffolds. Adv Funct Mater. 2011;21(22):4252-62.

173. Chang CS, Lanni MA, Mirzabeigi MN, Bucky LP. Large-Volume Fat Grafting: Identifying Risk Factors for Fat Necrosis. Plast Reconstr Surg. 2022;150(5):941e-9e.

174. Rekha T, Krishnamurthy J. Value of endothelial markers in accurate assessment of microvessel density (MVD) and thus angiogenesis in invasive ductal breast carcinoma. Int J Sci Res Pub. 2018;8(9):534-43.

175. Cheung KCP, Fanti S, Mauro C, et al. Preservation of microvascular barrier function requires CD31 receptor-induced metabolic reprogramming. Nat Commun. 2020;11(1):3595.

176. Xu C, He J-H, Xu G-H. Perilipin associated with lipid droplets regulates lipolysis. Sheng li ke xue jin Zhan [Progress in Physiology]. 2006;37(3):221-4.

177. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017;1862(10 Pt B):1221-32.

178. Luo X, Cao W, Xu H, et al. Coimplanted endothelial cells improve adipose tissue grafts' survival by increasing vascularization. J Craniofac Surg. 2015;26(2):358-64.

179. Harris WM, Plastini M, Kappy N, et al. Endothelial Differentiated Adipose-Derived Stem Cells Improvement of Survival and Neovascularization in Fat Transplantation. Aesthet Surg J. 2019;39(2):220-32.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onay formu