TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

HEPARİN VE METAMİZOL SODYUMUN YAĞ GREFTİ YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

DR. MURAD AUMEED HAMEED

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇENT DR. SAVAŞ SEREL

ANKARA
2015

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında ihtisasım boyunca eğitimimde çok büyük emekleri olan hocalarım Prof. Dr. Serdar Mehmet GÜLTAN, Prof. Dr. Mustafa Rıza ÖZBEK, Prof. Dr. Kutlu SEVİN, Prof. Dr. Zeki CAN, Prof. Dr. Murat EMİROĞLU, Yard. Doçent. Dr. Burak KAYA'ya bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek en iyi şekilde yetişmemde çok büyük pay sahibi olduklarını ve onlara her zaman minnettar kalacağımı belirtmek isterim.

Uzmanlık eğitimim boyunca gösterdiği emeklerden dolayı ve bu tezin başlangıcından bitimine kadar benden yardımını esirgemeyen, bildiklerini herzaman benimle paylaşan ve gösterdiği değerli katkılarından dolayı özellikle tez danışmanım Doç. Dr. Savaş SEREL'e çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi olarak bu seviyeye gelmemde çok büyük emeği olan aileme teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım, hemşireler ve personele teşekkür ederim.

Ayrıca bu tezin oluşmasında büyük yardım ve emeği olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Belgin CAN ve Yard. Doç. Dr. Deniz BİLLUR'a ve asistanlarına Arş. Gör. Dr. Pınar BAYRAM'a, ayrıca Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi olan Yard. Doç. Dr. Hilal GÖKTÜRK'e ve de Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında görevli olan sayın Zeynep GENÇTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER iii
KISALTMALAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
TABLOLAR DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Otolog yağ grefti kullanımı 3
2.2 Otolog yağ grefti yaşayabilirliği 4
2.3 Heparinin kullanımı ve etki mekanizması 4
2.4 Metamizol sodyumun kullanımı ve etki mekanizması 5
3. GEREÇ ve YÖNTEM 7
3.1 Deney Hayvanları 7
3.2 Gereçler 7
3.3 Yöntem 9
3.3.1 Çalışma grupları 9
3.3.2 Cerrahi Teknik 9
3.4 Değerlendirme Yöntemleri 24
3.4.1 Genel Değerlendirme 24
3.4.2 Yağ greftlerinin ağırlığı 24
3.4.3 Yağ greftlerinin hacmi 25
3.4.4 Histopatolojik değerlendirme 25
3.4.5 İstatistiksel değerlendirme 27
BULGULAR 28
4.1 Genel Bulgular 28
4.2 Yağ grefti ağırlık ölçümü bulguları 28

4.3 Yağ grefti hacim ölçümü bulguları 29
4.4 Histopatolojik bulgular 29
TARTIŞMA 51
SONUÇLAR 58
ÖZET 59
SUMMARY 60
KAYNAKLAR 61

KISALTMALAR DİZİNİ

COX-1 **:** Siklooksijenaz-1

COX-2 **:** Siklooksijenaz-2

COX-3 **:** Siklooksijenaz-3

Faktor IIa **:** Trombin

Faktor IXa **:** Aktif olan koagülasyon faktörü no 9 (Serine protease)

Faktor Xa **:** Aktif olan koagülasyon faktörü no 10 (Serine proteaz)

Faktor XIa **:** Aktif olan koagülasyon faktörü no 11 (Serine proteaz)

Faktor XIIa **:** Aktif olan koagülasyon faktörü no 12 (Serine proteaz)

FGF2 **:** Temel fibroblast büyüme faktörü

H-E **:** Hematoksilen Eozin histolojik boya

MA **:** Mallory Azan histolojik boya

Met. Na, met. NA **:** Metamizol sodyum

MMP **:** Matriks metaloproteazları

PRP **:** Platelet Rich Plasma (Trombositten Zengin Plazma)

SF **:** Serum fizyolojik

$t_{1/2}$ **:** Biyolojik yarı ömür

VEGF **:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Heparin sodyum (standart heparin) 5
Şekil 2.2: Metamizol sodyum 6
Şekil 3.1: İnguinal bölgenin hazırlanması 11
Şekil 3.2: İnguinal insizyon 12
Şekil 3.3: İnguinal insizyon 12
Şekil 3.4: İnguinal yağ dokusu 13
Şekil 3.5: İnguinal yağ dokusu 13
Şekil 3.6: İnguinal yağ dokusu eksiziyon sonrası 14
Şekil 3.7: Hassas tartı (yağ grefti ağırlık ölçümü için) 15
Şekil 3.8: Yağ dokusu steril olarak ağırlık ölçümü 15
Şekil 3.9: Yağ dokusu steril olarak ağırlık ölçümü 16
Şekil 3.10: Yağ dokusu hacim ölçümü 16
Şekil 3.11: Donör saha primer sütürle onarılması 17
Şekil 3.12: Alıcı sahanın hazırlanması 17
Şekil 3.13: Alıcı saha insizyonu 18
Şekil 3.14: Alıcı saha insizyonu 18
Şekil 3.15: Alıcı saha insizyonu 19
Şekil 3.16: Yağ dokusunun alıcı sahaya yerleştirilmesi 19
Şekil 3.17: Yağ dokusu yerleştirildikten sonra alıcı saha primer sütür ile onarılması 20
Şekil 3.18: Sekiz hafta sonra alıcı sahanın hazırlanması 20
Şekil 3.19: Alıcı saha insizyonun yapılması 21
Şekil 3.20: Sekiz hafta sonra yağ grefti eksizyonu 21
Şekil 3.21: Yağ grefti eksizyonu sonrası alıcı saha 22
Şekil 3.22: Sekiz hafta sonra yağ dokusunun ağırlık ölçümü 22
Şekil 3.23: Eksize edilen yağ grefti 23
Şekil 3.24: Yağ greftinin hacim ölçümü 23
Şekil 3.25: Yağ greftinin hacim ölçümü 24

Şekil 4.1: Sf grubuna ait mikrografta yağ nekrozu alanları içinde yağ kistleri (yıldız), genişlemiş lipid vakuollerini kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler) (kuyruklu ok), yaygın hyalurinize stroma içinde mononükleer hücre infiltrasyonu (kıvrık ok) izlenmektedir. H-E. x 100 34
Şekil 4.2: Sf grubuna ait mikrografta mononükleer hücre infiltrasyonu gösteren hyalurinize stroma (siyah yıldız) içinde kılcal kan damarları (ok), yağ kistleri (beyaz yıldız) ile belirgin yağ nekrozu izlenmektedir. H-E. x 200 35
Şekil 4.3: Sf grubuna ait mikrografta fibrozis (F) ve yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks) görülmektedir. H-E. x 400 36
Şekil 4.4: Sf grubuna ait mikrografta yağ kistlerini kuşatan mononükleer hücreler (kıvrık ok) ile köpüksü görünümde histiyositler (ok başı) dikkat çekmektedir. Az sayıda kılcal damar (ok) hiyalurinize görünümdeki stromada izlenmektedir. H-E. x 400 37
Şekil 4.5: Sf grubuna ait mikrografta, yağ vakuolleri etrafında köpük hücreleri (ok başı) ve fibrozis (F) izlenmektedir. MA x 400 38
Şekil 4.6: Heparin grubuna ait mikrografta yaşayabilirliğini koruyan çekirdekli adipositler (A), yağ vakuollerinin yakınında yerleşim gösteren köpük hücreleri (ok başı), kan damarları (ok), çok küçük bir alanda gözlenen fibrozis (F) ile lipid vakuolünü çepeçevre kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler) (kuyruklu ok) izlenmektedir. H-E. x 100 39
Şekil 4.7.:Heparin grubuna ait mikrografta ince bir fibrozis septa (F), yaşayabilirliğini koruyan çekirdekli adipositler (A), yağ vakuollerinin yakınında yerleşim gösteren köpük hücreleri (ok başı), farklı büyüklükte kan damarları (ok) görülmekte olup kılcal damarlanmada diğer gruplara göre artış olduğu söylenebilir. H-E. x 200 40
Şekil 4.8: Heparin grubuna ait mikrografta lipid vakuolünü çepeçevre kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler) (kuyruklu ok), çok sayıda kılcal kan damarı (ok) ve hücre infiltrasyonu izlenmektedir. H-E. x400 41

Şekil 4.9: Heparin grubuna ait mikrografta yaşayabilirliğini koruyan çekirdekli adipositlerin (A) yer aldığı alanlar izlenmektedir. Bazı yağ vakuollerinin yakınında yerleşim gösteren köpük hücreleri (ok başı) ile hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonu ve kılcal kan damarlarının (ok) bulunduğu gözlenmiştir. H-E. x 400 42

Şekil 4.10: Heparin grubuna ait mikrografta kan damarları (ok) , yağ vakuolleri etrafında köpük hücreleri (köpüksü histiyositler (ok başı) izlenmektedir. MA x 400 43

Şekil 4.11: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta genişlemiş yağ vakuolleri etrafında yerleşim gösteren köpük hücreleri (köpüksü histiyositler) (ok başı) ile mononükleer hücre infiltrasyonu (kıvrık ok) izlenmektedir. Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks)'nin yanı sıra normal görünümlü, çekirdekli adipositler (A), yer yer lipid vakuollerini çepeçevre kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler)(kuyruklu ok) ile kan damarları (ok) dikkat çekmektedir. H-E. x 100 44

Şekil 4.12: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta yağ nekrozu alanları içinde yağ kistleri (yıldız), genişlemiş lipid vakuolleri, yaygın hyalurinize stroma kılcal kan damarları (ok) , genişlemiş yağ vakuolleri etrafında yoğunlaşan köpük hücreleri (köpüksü histiyositler (ok başı) izlenmektedir. Mikrografın sağ alt köşesinde izlenen fibrozis (F) dikkat çekmektedir. H-E. x 200 45

Şekil 4.13: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta yağ nekrozu alanları içinde yağ kistleri (yıldız), genişlemiş yağ vakuolleri etrafında yoğunlaşan köpük hücreleri (köpüksü histiyositler)(ok başı) ile yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks)'nin yanı sıra normal görünümlü, çekirdekli adipositler (A) izlenmektedir. Yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu (kıvrık ok) görülmektedir H-E. x 200 46

Şekil 4.14: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks)'nin yanı sıra normal görünümlü, çekirdek içeren yağ hücreleri (A) izlenmektedir. H-E. x 400 47

Şekil 4.15: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta kan damarı (ok) , yağ vakuolleri etrafında yoğunlaşan köpük hücreleri (köpüksü histiyositler (ok başı) izlenmektedir. MA x 400 48
Şekil 4.16: Gruplar arasında ilk 5 parametrenin karşılaştırılması 49
Şekil 4.17: Gruplar arası yağ ağırlığı ve hacmin karşılaştırılması (ilk ve son ölçüm) 49
Şekil 4.18: Gruplar arası ilk 5 parametrenin dataları.....50

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: (Kontrol grubu parametrelerinin skorlama sonuçları) 31
Tablo 2: (Heparin grubu parametrelerinin skorlama sonuçları).....31
Tablo 3: (Metamizol sodyum grubunun parametrelerinin skorlama sonuçları).....32
Tablo 4: (Tüm grupların neoanjiogenez sayım sonuçları) 32

1. GİRİŞ

Otolog yağ enjeksiyonunun son yıllarda hızla kullanımı artmaktadır (1), yağ enjeksiyonunun çoğu klinik alanda kullanımı vardır, otolog yağ enjeksiyonu tıpta özellikle de plastik cerrahide yaygın kullanım alanı bulmuş bir yöntemdir.

Otolog yağ grefti ideal bir dolgu maddesinde olması gereken; biyouyumluluk, stabilite, immujenik olmama, karsinojenik ve teratojenik olmama gibi birçok özelliği taşımaktadır (2).

Otolog yağ grefti ilk defa 1893 yılında Neuber tarafından yapılmış (3), daha sonra da Czerny (4), Lexer (5) ve Rehn'i de (6) uygulamaları ile otolog yağ dokusu tanımı da yaygınlaşmıştır.

Enjektör kullanılarak yağ toplama yöntemi ise, ILLouz (7,8) ve Fournier (9) tarafından 1980'li yıllarda kullanılmaya başlamıştır.

Yağ greftlerinde en büyük sorun, tutma oranlarının %10-90 arasında değişkenlik göstermesidir (10). Bu oranları arttırmak amacıyla çeşitli yöntem ve maddeler kullanılmıştır. Alınan yağ greftlerinin serum fizyolojik ile yıkanması en sık uygulanan yöntemlerden biridir (11). Büyüme faktörlerinin de bu tutma oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (12).

Bu tezde klinik uygulamada sıkça kullanılan heparin ve metimazol sodyumun yağ grefti tutma oranlarına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Heparin bir antikoagülandır ve tromboembolik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (13). Heparinin yanıkda neoanjiogenez ile yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (14).

Düşük molekül ağırlıklı heparin olan Fragmin'in Protam ile karışımı temel fibroblast büyüme faktörü (FGF-2)'nin etkisini arttırarak yağ grefti tutma oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (15).

Bu çalışmada kullanılan diğer ilaç metamizol sodium (met Na); bir metamizol (dipyron) türevidir. Klinikte yaygın olarak ağrı kesici, ateş düşürücü ve spazmolitik olarak kullanılan bu ilaç vazorelaksan amaçlı da kullanılır (16).

Metamizolun vazorelaksan özelliği tavşan baziller arter modeli üzerinde denendiğinde metamizolun lokal veya sistemik olarak verildiğinde her iki durumda da spazmolitik etkisi olduğu görülmüştür (17,18). Düz kaslarda gevşeme etkisi çoğu dokularda görülmüştür (18,19).

Metamizol bu etkiyi vasküler düz kaslarda da göstermiştir. Bunu da bu düz kaslarda fenilefrin (phenylephrine) gibi aktif kardiyovasküler maddelerin kontraksiyon etkisini inhibe ederek ortaya çıkarmıştır. Metamizolun spzmolitik etkisinden yararlanarak yağ grefti uygulanan yerde kanlamayı arttırdığını düşünüyoruz, dolayısıyla yağ grefti yaşayabilirliğini arttıracağını düşünmekteyiz.

Bu temel bilgiler ışığında klinikte yaygın olarak kullanılan dolayısıyla kolay erişilebilen bu iki ilacın etkilerinden (heparinin neoanjiogenez etkisi ve metamizol sodyumun spazmolitik etkisi) faydalanılarak yağ greftlerinin tutma oranlarını arttırması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Otolog yağ grefti kullanımı

Otolog yağ enjeksiyonunun son yıllarda hızla kullanımı artmaktadır (1), özelikle plastik cerrahide olmak üzere tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Otolog yağ grefti; vücut kontürü düzeltilmesi (20), skar revizyonu (2), yüze hacim kazandırma (21), meme büyütme (22), meme rekonstrüksiyonu (23,24), gerekli yerlerde cilt kalitesini arttırmak (25) ve mastektomi sonrası kronik ağrı tedavisinde kullanılır (26).

Yağ grefti ilk olarak 1893 yılında Neuber tarafından kullanılmıştır (3). Neuber'in yüzdeki defekti düzeltmek için üst ekstremiteden aldığı yağ dokusunu transfer etmesinden sonra farklı endikasyonlarda da yararlı olduğu görülmüştür. Laubier (27) kaviteleri düzeltmek, Koll ise (28) ürolojik cerrahide yağ grefti kullanmıştır.

Literatürde yağ grefti yaşayabilirliğini araştırmak için donör saha olarak deney hayvanlarında sıklıkla inguinal bölge (29,30) kullanılmış, ayrıca yağ grefti için alıcı bölge olarak skalp (30,31) bölgesi kullanılmaktadır. Literatürde yağ grefti yaşayabilirliğini araştırmak için donör sahaya yerleştirilen yağ greftleri 4-12 hafta beklenmiştir (28,31).

Yağ greftinin tutmasının oranını araştırmak için histolojik olarak neoanjiogenez (yeni damar oluşumu), yaşayan adipositler ve nekroz bulguları incelenmiştir (32,33). Ayrıca yağ greftinin hacmi (32) ve ağırlığı (1,34) ölçülmüştür.

2.2 Otolog yağ grefti yaşayabilirliği

Yağ greftinin en büyük sorunu tutma oranlarının değişken olmasıdır, bu oranlar %10-%90 arasında değişiklik göstermektedir (10). Tutma oranlarını arttırmak amacıyla çeşitli yöntem ve maddeler kullanılmıştır. En sık ve basit olarak uygulanan iki yöntem yağ greftini el ile düşük basınç altında toplamak ve alınan yağ dokusunun serum fizyolojik ile yıkanmasıdır (11).

Ayrıca büyüme faktörlerinin de bu oranı arttırdığı kanıtlanmıştır (12). Bazı literatürlerde yağ greftinin tutma oranlarını arttırmak amacıyla Trombositten Zengin Plazma (PRP) kullanıldığı gösterilmiştir (10).

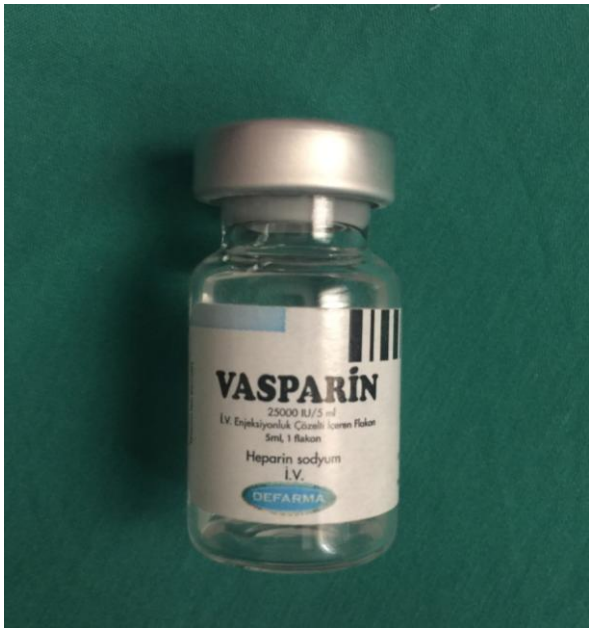
2.3 Heparinin kullanımı ve etki mekanizması

Heparin (şekil 2.1) bir antikoagülan ilaçtır ve tromboembolik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (13). Ayrıca yanık tedavisinde endotel hücrelerinin migrasyonunu hızlandırarak Neoanjiogenezi arttırdığı (35,36) ve yanık iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (14).

Heparin pıhtılaşma sistemindeki etkisini, hem interensik hem de ekstrensik yolda temel olarak Antitrombin III'ün inhibisyon etkisini arttırarak gösterir. Bu etkisini Antirombin III 'in faktör IIa (thrombin), IXa, Xa, Xia ve XIIa üzerine inhibitor etkisini güçlendirerek göstermektedir. Heparin antitrobin III ile bağlanır ve molekülü değişime uğratır.

Heparinin aktif olan faktör Xa üzerine inhibitör etkisi trombin üretimini engeller ve böylece trombinin pıhtılaşmadaki etkilerini engeller. Ayrıca heparin antitrombin III–trombin kompleksinin üretimini hızlandırarak trombini etkisiz hale getirir ve böylece fibrinojeni fibrine dönüşmesini engeller ve bu etkiler mevcut pıhtıların artmasını engeller (37).

Heparin dozu sistemik olarak sıçanlara 320 – 517 u/kg olarak verilmiştir ve yarı ömürü ($t_{1/2}$) 49-66 dakikadır (38).



Şekil 2.1: Heparin sodyum (standart heparin)

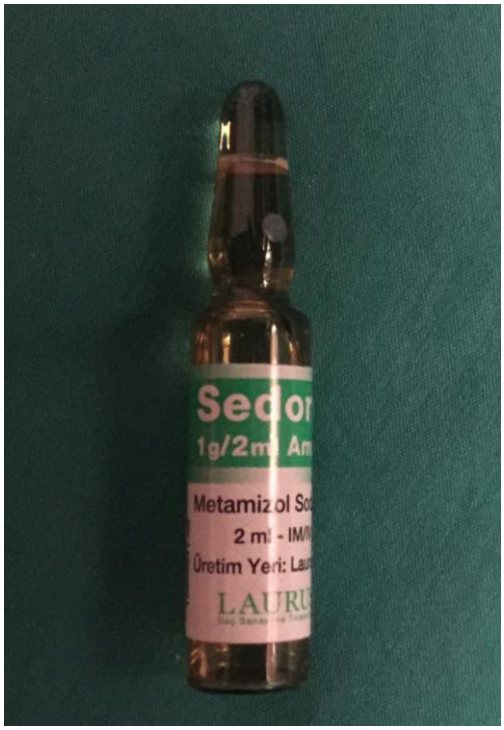
2.4 Metamizol sodyumun kullanımı ve etki mekanizması

Metamizolun (şekil 2.2) vazorelaksan özelliği tavşan baziller arter modeli üzerinde denendiğinde metamizolun lokal veya sistemik olarak verildiğinde her iki durumda da spazmolitik etkisi olduğu görülmüştür (20,21). Düz kaslarda gevşeme etkisi çoğu dokularda görülmüştür (21, 22). Metamizolun yarılanma ömrü (t1/2) 14 dakikadır. Ancak metamizol vücutta metabolitlerine dönüşerek etkisini devam ettirmektedir ve metamizolun metabolitlerinin ($t_{1/2}$) 2.5 – 5.5 saat arasındadır (39) .

Sıçanlarda deri fleplerinin kanlanmasını arttırmak için literatürde önerilen metimazol dozu 100 m/kg/ gün'dür. Metimazol 200/kg/ gün dozunda kullanıldığında ise

analjezik etkisi de vardır (40). Sıçanlarda metimazolun güvenli sistemik dozu 150 mg/kg/gün'dür (41).

Metamizol 90 yıldan fazla başarılı bir ilaç olarak kullanılmakta olmasına rağmen halen bu ilacın etki mekanizması kesin olarak çözülememiştir (42).Uzun zaman bu ilacın COX-1 ve COX-2 inhibitörü olduğu düşünülüyordu (43,44,45), ancak günümüzde metamizolun ağrı kesici etkisinin COX-3 'ü bloke ederek yaptığı düşünülüyor (43,46), buna ek olarak ağrı kesici etkisi santral sinir sisteminde mevcut olan kannabinoid reseptörlerine (47) ve endojen opioiderjik sistemi aktive ederek ortaya çıktığı düşünülmektedir (48).



Şekil 2.2: Metamizol sodyum

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması için Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 08.04.2015 tarih ve 2015-6-110 karar numaralı onay alınmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalın'nın olanakları kullanılarak, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilmiş toplam 24 adet, ağırlıkları 178-236 gram arasında değişen Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı.

Sıçanlar hayvan laboratuvarında uygun kafeslerde, 21 ± 2 °C sıcaklıkta ve ışıkların saat 08:00' da yakılıp, saat 20:00' da söndürülmesiyle 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık ritminin sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi bir diyet ya da su kısıtlaması yapılmadı.

3.2 Gereçler

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar:

1-Heparin sodyum (Vasparin 25000IU/5 ml, DEFARMA®)

2-Metamizol Sosyum (Sedoral 1g/2ml, LAURUS®)

3- Temel cerrahi aletler (pens, penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)

4- Steril cerrahi gazlı bez

5- Steril enjektörler (1, 2.5, 5, 10 cc)

6- Steril cerrahi eldiven

7- Cerrahi deney masası

8- Povidone iodine

9- Traş bıçağı

10- Serum Fizyolojik

11- Ksilazin (ALFAZYNE ®%2, Alfasan)

12- Formalin

13- Ketamin baz (Ketalar®, Pfizer)

14- Dijital fotoğraf makinesi (Samsung® WB150F)

15- Zeiss® Axio Scope A1 marka ışık mikroskobu

16- Hematoksilen Eozin (H-E) ve Mallory Azan (MA) histolojik boyaları

17- Parafin

18- Etanol

19- 3/0 ve 4/0 cerrahi ipek sütür

20- İnce uçlu taşınabilir koter (Bovie Medical Corporation)

21- Hassas tartı 0.01-500 gram (I200, NECK®)

22- Kombi stoper (enjektör ucunu kapatmak için)(BIÇAKCILAR®)

23- Leica® sliding mikrotom (RM 2125RT model)

3.3 Yöntem

3.3.1 Çalışma grupları

Bu çalışmada deney hayvanları her grupta 8 hayvan olacak şekilde randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak (yağ greftinin serum fizyolojikte (sf) bekletildiği grup), ikinci grup heparin grubu (yağ greftinin heparin solüsyonunda bekletildiği grup), üçüncü grup metamizol sodyum grubu (yağ greftinin metamizol sodyum solüsyonunda bekletildiği grup) olarak belirlendi.

3.3.2 Cerrahi Teknik

Yağ grefti içeren araştırmalarda çoğunlukla sıçan (49) model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada ağırlıkları 178-236 gr arasında değişen 24 adet dişi Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları her grupta 8 hayvan olacak şekilde randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak (yağ greftinin serum fizyolojikte (sf) bekletildiği grup), ikinci grup heparin grubu (yağ greftinin heparin solüsyonunda bekletildiği grup), üçüncü grup metamizol sodyum grubu (yağ greftinin metamizol sodyum solüsyonunda bekletildiği grup) olarak belirlendi.

Sıçanlara genel anestezi uygulandıktan sonra (preanestezik olarak Ksilazin 10 mg/kg intramüsküler olarak ve anestezik olarak Ketamin 90 mg/kg intramüsküler olarak) verildi, deney tablasında uygun pozisyon verildi, sol inguinal bölgeden yağ dokusunu aseptik şartlarda almak için povidone-iodine ile silinip tıraşlandı. İnguinal bölgedeki yağ dokusuna ulaşmak için 15 numara bistüri ile 2-3 cm'lik cilt insizyonu yapılarak cilt altı yağ dokusuna ulaşıldı. Yağ dokusu etraf dokudan diseke edilerek koter ile hemostaz sağlandı ve yaklaşık 0,3-0,8 gram yağ dokusu greft olarak alındı (şekil 3.1-3.6).

Greft alındıktan sonra steril bir şekilde greftin ağırlığı ve hacmi ölçüldü (şekil 3.7-3.10), bu arada greftin alındığı bölge uygun sütürlerle primer olarak kapatıldı (şekil 3.11). Daha sonra alınan yağ grefti dahil edildiği gruba göre hazırlanan uygun solüsyonlarda 20 dk bekletildi.

Heparin grubu yağ grefti 100 U/3ml solüsyonda 20 dk bekletildi, metamizol sodyum grubu yağ grefti 30 mg/3ml solüsyonda 20 dk bekletildi, kontrol grubu yağ grefti 3ml sf 'te 20 dk bekletildi.

Daha sonra yağ greftini sıçanın kafa derisi altına yerleştirmek için kafa derisi aseptik şartlarda povidone-iodine ile silinip bistüri yardımıyla uygun 1-2 cm'lik insizyonla cilt altı doku planında hazırlanan cebe yağ grefti steril olarak yerleştirildi (şekil 3.12-3.16). Kafa derisndeki insizyon uygun sütürlerle primer kapatıldı (şekil 3.17). Daha sonra bu hayvanlar 8 hafta herhangi bir cerrahi işlem yapılmadan Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında uygun olarak günlük bakımı yapıldı ve uygun şartlarda muhafaza edildi.

Deneyden 8 hafta sonra yağ greftlerini almak için öncelikle hayvanlara genel anestezi altında ve deney tablasında uygun pozisyon verildi, povidone-iodine ile kafa derisi temizlenip uygun insizyon ile cilt altı doku planına girilerek titiz hemostaz sağlandı. Daha önce yerleştirilen yağ grefti eksize edildi (şekil 3.18-3.21). Daha sonra hayvanlara intrakardiyak yüksek doz anestezi verilerek ötanazi işlemi uygulandı.

Eksize edilen yağ dokusu makroskopik olarak değerlendirildi ve greft ağırlığı ve hacmi tekrar ölçüldü (şekil 3.22-3.25). Histopatolojik inceleme amacıyla Histoloji-Embriyoloji AD'a gönderildi. Tüm aşamalar fotoğraflandı.



Şekil 3.1: İnguinal bölgenin hazırlanması



Şekil 3.2: İnguinal insizyon



Şekil 3.3: İnguinal insizyon



Şekil 3.4: İnguinal yağ dokusu



Şekil 3.5: İnguinal yağ dokusu



Şekil 3.6: İnguinal yağ dokusu eksiziyon sonrası



Şekil 3.7: Hassas tartı (yağ grefti ağırlık ölçümü için)



Şekil 3.8: Yağ dokusu steril olarak ağırlık ölçümü



Şekil 3.9: Yağ dokusu steril olarak ağırlık ölçümü



Şekil 3.10: Yağ dokusu hacim ölçümü



Şekil 3.11: Donör saha primer sütürle onarılması



Şekil 3.12: Alıcı sahanın hazırlanması



Şekil 3.13: Alıcı saha insizyonu



Şekil 3.14: Alıcı saha insizyonu



Şekil 3.15: Alıcı saha insizyonu



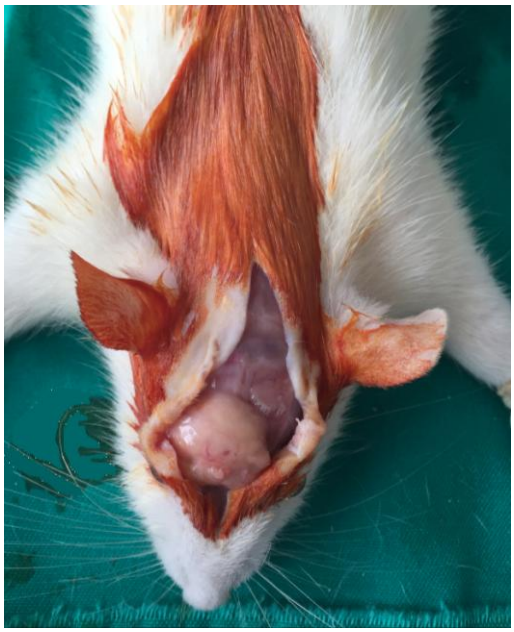
Şekil 3.16: Yağ dokusunun alıcı sahaya yerleştirilmesi



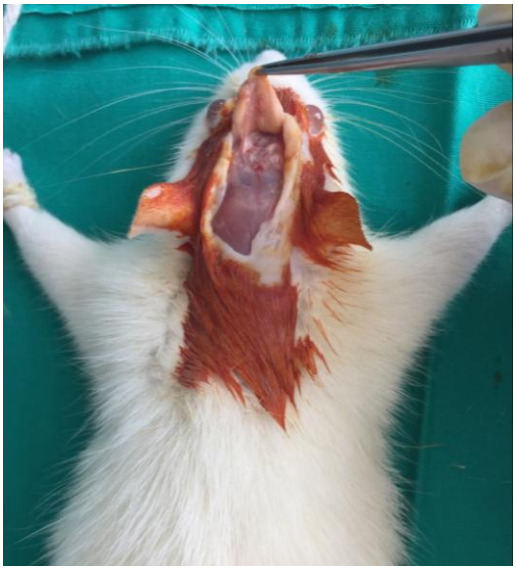
Şekil 3.17: Yağ dokusu yerleştirildikten sonra alıcı saha primer sütür ile onarılması



Şekil 3.18: Sekiz hafta sonra alıcı sahanın hazırlanması



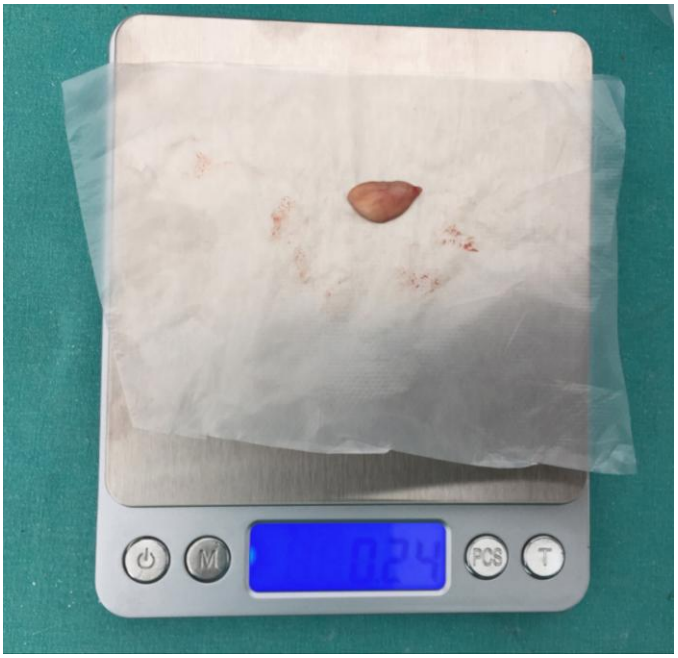
Şekil 3.19: Alıcı saha insizyonun yapılması



Şekil 3.20: Sekiz hafta sonra yağ grefti eksizyonu



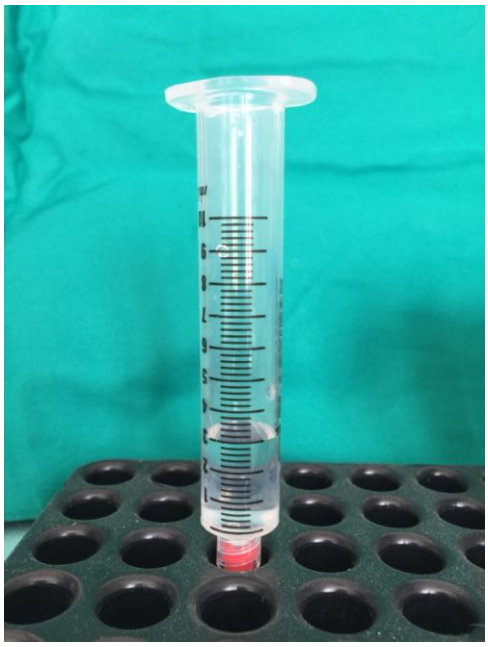
Şekil 3.21: Yağ grefti eksizyonu sonrası alıcı saha



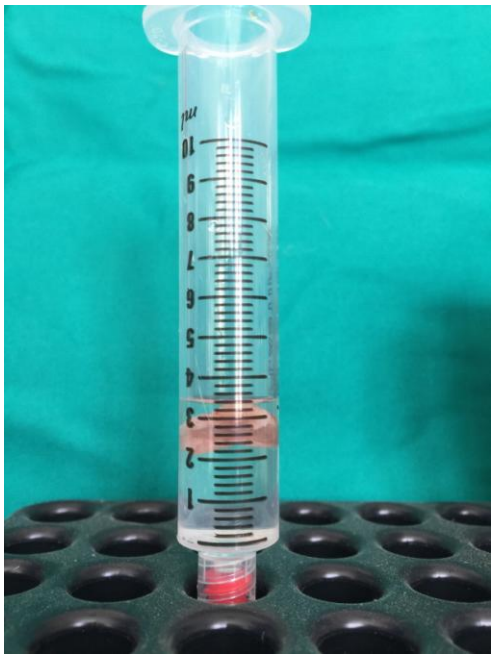
Şekil 3.22: Sekiz hafta sonra yağ dokusunun ağırlık ölçümü



Şekil 3.23: Eksize edilen yağ grefti



Şekil 3.24: Yağ greftinin hacim ölçümü



Şekil 3.25: Yağ greftinin hacim ölçümü

3.4 Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1 Genel Değerlendirme

Deneyde kullanılan hayvanlarının cerrahi işlem uygulanmadan önce ve ikinci cerrahi işlem uygulanmadan önce toplam iki defa olmak üzere ağırlıkları ölçüldü.

3.4.2 Yağ greftlerinin ağırlığı

Yağ greftleri hazırlandığında ve eksizyon sonrası yağ greftine herhangi bir müdahale yapılmadan önce tüm alınan yağ greftlerin tek tek ağırlıklarını hassas tartı kullanarak tartıldı ve kayıt edildi. Aynı işlem 8 hafta bekleme süresi sonrasında da yağ

grefti alıcı sahadan eksize edildikten hemen sonra yine hassas tartı kullanarak tartıldı ve kayıt edildi. Tüm sonuçlar gruplar arasında ve gruplar içinde karşılaştırıldı.

3.4.3 Yağ greftlerinin hacmi

Yağ greftleri hazırlandığında ve eksizyon sonrası yağ greftlerinin ağırlığını ölçtükten hemen sonra tüm alınan yağ greftlerinin tek tek hacimlerini bir enjektöre 3 ml sf koyarak yağ grefti eklendiğinde yağ greftinin hacmi kadar sıvı seviyesinin arttığı görüldü ve kayıt edildi. Aynı işlem 8 hafta bekleme süresi sonrasında da yağ grefti alıcı sahadan eksize edildikten hemen sonra yine ağırlıkları ölçüldü ve tek tek hacimlerini bir enjektöre 3 ml sf koyarak yağ grefti eklendiğinde yağ greftinin hacmi kadar sıvı seviyesinin arttığı görüldü ve kayıt edildi.

3.4.4 Histopatolojik değerlendirme

Kontrol ve çalışma gruplarından alınan dokular tespit amacıyla %10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonunda 72 saat süreyle fikse edildi. Fikse olan dokuların takip işlemleri aşağıdaki protokole göre yapıldı.

Fiksasyon sonrası formalin solüsyonu içinden alınan doku örnekleri çeşme suyu altında yıkandıktan sonra sırasıyla %75, %96 ve %100 etanol serisi ile dehidrate edildi.

Dehidratasyon işleminden sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular iki değişim sıvı parafinle 60 ºC'lik etüvde 3 saat inkübasyonu takiben sert parafin bloklara gömüldü.

Parafin bloklardan Leica® RM 2125RT model sliding mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Doku kesitlerine Hematoksilen-Eozin ve Mallory Azan boyaları uygulandı.

Boyanan preparatlar, Zeiss® Axio Scope A1 marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğraflandı.

Yağ dokusunun morfolojisi ve histolojik parametrelerin değerlendirilmesi için bir skor sistemi kullanıldı. Buna göre 6 histolojik parametre; 1) yaşayan adipositler, 2) nekroz 3) kist oluşumu, 4) fibrozis oluşumu 5) enflamasyon ve 6) kan damarlarının varlığı olarak belirlendi. Bunlardan ilk 5 parametre için yüzde değerleri %0 (-) Yok, %1-20 (1+) az, %21-40(+2) azdan ortaya, %41-60 (+3) orta, %61-80 (+4) ortadan şiddetliye ve %81-100 (+5) şiddetli olarak kaydedildi.

Damarların sayımı için Gundersen ve arkadaşları (50) tarafından geliştirilen, 100 nokta ve 50 çizgiden oluşan tablo üzerinde nokta sayım tekniği kullanıldı. Buna göre her bir preparat x400 büyütme ile birbirinden bağımsız 10 farklı alanda incelendi ve her bir örnek için toplamda 1000 noktada , 81 225 μm^2 alan içinde sayım yapıldı. Noktalar ile çakışan damarlar sayıldı Pi değeri olarak kaydedildi. Alanda parankima bölgesine karşılık gelen alanlarla örtüşen noktalar da sayılarak P parankima değeri olarak kaydedildi. Düzeltilmiş P değerini bulmak için elde edilen değerler *P nokta = (Pi x 100) / P* parankima formülünde belirlenen yerlere konarak P nokta değeri elde edildi.

3.4.5 İstatistiksel değerlendirme

Verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama ± standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için median (min – maks), nominal değişkenler ise vaka sayısı ve (%) olarak gösterilmiştir.

Grup sayısı iki olduğunda gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği t testi ile ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Mann Whitney testi ile araştırılmıştır. Grup sayısı ikiden fazla olduğunda gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği ANOVA varyans analizi testi ile ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testi ile araştırılmıştır. Nominal değişkenler Pearson Ki-Kare veya Fisher exact testi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

4.1 Genel Bulgular

Bu çalışmada 24 adet dişi Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları her grupta 8 hayvan olacak şekilde randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Üç gruba ayrılan hayvanların tümü 8 hafta bekleme süresi sonrası ve yağ greftlerini alıcı sahadan eksize edilip tüm hayvanlar sakrifiye edilinceye kadar yaşamlarını sürdürdüler. Tüm grupların deney önceki hayvan ağırlıkları benzerdi (kontrol grubu: 200,5±22,5 g, heparin grubu: 211±25 g, metamizol sodyum grubu: 211,5±23,5 g, p=0,210). Sekiz hafta sonra her üç grupta da hayvan ağırlıklarında bir miktar artış görüldü (kontrol grubu: 225±32 g, heparin grubu: 231,5±18,5 g, metamizol sodyum grubu: 233,5±25,5 g, p=0,286). Ancak bu ağırlık artışı gruplar arasında istatistik olarak anlamlı bulunmadı (p=0,785).

4.2 Yağ grefti ağırlık ölçümü bulguları

Yağ greftleri hazırlandığında ve 8 hafta sonra eksizyon sonrası yağ greftine herhangi bir müdahale yapılmadan önce tüm alınan yağ greftlerinin tek tek ağırlıkları hassas tartı kullanılarak ölçüldü ve kayıt edildi.

Tüm grupların yağ greftinin donör bölgeden alınan ağırlıkları benzerdi (kontrol grubu: 0,405±0,065 g, heparin grubu: 0,565±0,235 g, metamizol sodyum grubu: 0,435±0,065 g, p=0,069), 8 hafta sonra her üç grupta da eksize edilen yağ grefti ağırlıklarında bir miktar azalma görüldü (kontrol grubu: 0,16±0,1 g, heparin grubu: 0,18±0,09 g, metamizol sodyum grubu: 0,24±0,1 g, p=0,231). Ancak bu ağırlıkta görülen azalma gruplar arasında istatistik olarak sınırda anlamsız bulundu (p=0,055).

Yağ grefti ağırlığının azalması her grubun kendisi içinde 8 hafta sonra ölçülen azalma istatistik olarak anlamlı bulundu. Kontrol grubunda ($p<0,001$), heparin grubunda ($p<0,001$) ve metamizol sodyum grubunda ($p<0,001$).

4.3 Yağ grefti hacim ölçümü bulguları

Yağ greftleri hazırlandığında ve 8 hafta sonra eksizyon sonrası ağırlıkları ölçüldükten sonra, tüm alınan yağ greftlerinin tek tek hacmi bir enjektöre 3 ml sf koyarak yağ grefti eklendiğinde hacmi kadar sıvı seviyesinin arttığı görüldü ve kayıt edildi.

Tüm grupların yağ greftinin donör bölgeden alınan hacimleri benzerdi (kontrol grubu: 0,4±0,1 cc, heparin grubu: 0,59±0,21 cc, metamizol sodyum grubu: 0,5±0,1 cc, $p=0,190$). Sekiz hafta sonra her üç grupta da eksize edilen yağ grefti hacminde bir miktar azalma görüldü (kontrol grubu: 0,3±0,1 cc, heparin grubu: 0,25±0,15 cc, metamizol sodyum grubu: 0,3±0,1 cc, $p=0,472$), bu hacimde azalma gruplar arasında istatistik olarak sınırda anlamsız bulundu ($p=0,057$). Ancak 8 hafta sonunda hacimde görülen azalmanın her grubun kendisi içinde istatistik olarak anlamlı bulundu, kontrol grubunda ($p=0,001$), heparin grubunda ($p<0,001$) ve metamizol sodyum grubunda ($p<0,001$).

4.4 Histopatolojik bulgular

Yağ greftinin tutma oranlarında ve yaşayabilirliğinde artışı ölçmek için yağ greftinde mikroskop altında 6 farklı parametreye bakıldı, bunlar; yaşayan adiposit oranı (çekirdekli adiposit), nekroz, kist oluşumu, fibrozis oluşumu, enflamasyon miktarları ve yeni damarların oluşum miktarı (neoanjiogenez) ölçüldü.

Yaşayan adiposit oranı (çekirdekli adiposit) ve yeni damarların oluşumu (neoanjiogenez) greft yaşayabilirliğini olumlu etkilerken diğer parametreler greft yaşayabilirliğini olumsuz etkilemektedir.

İlk 5 parametre skorlama yöntemiyle değerlendirildi, neoanjiogenez ise damarların sayımı için Gundersen ve arkadaşları (50) tarafından geliştirilen, 100 nokta ve 50 çizgiden oluşan tablo üzerinde nokta sayım tekniği kullanıldı.

Işık mikroskobu ile yapılan histolojik incelemede sf grubuna ait yağ grefti örnekleri incelendi. Kistik oluşumlarla karakterize, hiyaluranize görüntülü stroma içinde mononükleer hücre infiltrasyonu gösteren nekrotik alanlar son derece yaygındı.

Bu alanlarda genişlemiş lipid vakuolleri çevresinde bulunan köpük görünümlü hücreler nekrotik doku artıklarını ortamdan uzaklaştırmak üzere bölgede toplanan doku makrofajlarının (histiyositlerin) ışık mikroskobu gözlemi olarak belirlendi.

Fibrozis alanları belirgindi. Fibrozis alanlarında kalın kaba seyirli kollajen tel demetleri ve fibroblastlar dikkat çekti. Adipositler yaşayabilirlik açısından çekirdek içermeleri ve içlerinde trigliserid kristallerinin çözülmesiyle oluşan ışınsal tarzda dağılım gösteren iğne şekilli fissür oluşumlarının varlığına bakılarak değerlendirildi. Bu parametre açısından sf grubunda ki yağ grefti örneklerinde adiposit yaşayabilirliğinin diğer gruplardan düşük olduğu saptandı. Neoanjiogenez için yapılan ışık mikroskobu gözlemlerinde az sayıda kapiller oluşumları gözlendi (şekil 4.1-4.5).

Heparin grubuna ait örneklerin ışık mikroskobu ile değerlendirilmesi sonucu nekrotik alanların tüm greft alanında diğer iki gruba göre daha az bir alan kapladığı izlendi.

Nekrotik alanlarda kistik oluşumların varlığı son derece az iken, yağ vakuollerinin çevresinde yoğunlaşan mononükleer hücreler dikkat çekiciydi.

Adipositlerin yaşayabilirliği açısından değerlendirildiğinde yaygın olarak çekirdek içeren, duvar bütünlüğünü koruyan adipositlerin çekirdeğini yitirmiş adipositlere oranla üstün olduğu gözlendi.

Heparin grubuna ait doku örneklerinde bol miktarda kapiller izlendi (şekil 4.6-4.10).

Metamizol sodyum grubunda nekrotik alanlarda, kistik oluşumlardan daha çok hiyalüranize stroma ile çevrili yağ vakuollerinin hakim olduğu izlendi. Yağ vakuollerini çevreleyen köpük hücrelerinin varlığı (histiyositler) dikkat çekiciydi.

Mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrozis alanları sf grubuna oranla daha az olarak değerlendirildi. Adipositlerin yaşayabilirliği açısından sf grubundan daha iyi oldukları gözlendi. Neoanjiogenezi değerlendirmek için yapılan gözlemde sıkça kapillerlere rastlandı (şekil 4.11-4.15).

Her grubun ilk 5 parametresinin skorlama sonuçları tablo şeklinde gösterilmiştir (tablo 1-3). Neoanjiogenez sonuçları ise (tablo 4)'te gösterilmiştir.

Tablo 1: (Kontrol grubu parametrelerinin skorlama sonuçları)

	1.rat	2.rat	3.rat	4.rat	5.rat	6.rat	7.rat	8.rat
Adiposit yaşayabilirliği	2	1	2	2	1	2	1	1
Nekroz	1	4	3	2	5	3	4	4
Kist oluşumu	2	2	2	4	1	1	2	1
Fibrozis oluşumu	1	3	2	3	2	2	4	2
Enflamasyon	1	2	2	3	1	2	3	2

Tablo 2: (Heparin grubu parametrelerinin skorlama sonuçları)

	1.rat	2.rat	3.rat	4.rat	5.rat	6.rat	7.rat	8.rat
Adiposit yaşayabilirliği	5	4	3	5	2	3	4	4
Nekroz	1	2	2	1	2	1	1	2
Kist oluşumu	1	0	2	1	3	1	1	1
Fibrozis oluşumu	1	1	1	1	2	2	3	1
Enflamasyon	0	1	1	1	2	1	2	1

Tablo 3: (Metamizol sodyum grubunun parametrelerinin skorlama sonuçları)

	1.rat	2.rat	3.rat	4.rat	5.rat	6.rat	7.rat	8.rat
Adiposit yaşayabilirliği	2	1	2	5	4	3	3	2
Nekroz	2	2	2	1	1	1	2	3
Kist oluşumu	1	2	1	1	0	2	2	3
Fibrozis oluşumu	1	2	2	1	1	2	1	2
Enflamasyon	2	2	2	1	1	1	1	2

Tablo 4: (Tüm grupların neoanjiogenez sayım sonuçları)

	1.rat	2.rat	3.rat	4.rat	5.rat	6.rat	7.rat	8.rat
Sf (kontrol)	6,6	7,79	13,4	7	5,9	6,95	6,7	6,91
Heparin	16,29	14,44	12,14	16,15	14,5	17,92	17,94	12,87
Metamizol sodyum	11,84	10,85	12,29	9,97	17,8	10,4	11,5	8,1

İstatistiksel olarak tüm bu parametreler değerlendirildi, öncelikle adiposit yaşayabilirliği değerlendirildi. Kontrol grubunda median 1,5. Minimum değer 1 ve maksimum değer 2 olarak görüldü. Heparin grubunda median 4, minimum değer 2 ve maksimum değer 5 olarak görüldü. Metamizol sodyum grubunda ise median 2,5.

Minimum değer 1 ve maksimum değer 5 olarak görüldü. Bu değerler gruplar arasında değerlendirildiğinde heparin grubunun diğer gruplara göre adiposit yaşayabilirliği olumlu şekilde artmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,002). Ancak metamizol sodyum grubunda da artış görüldü, bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,136).

İkinci parametre ise nekroz bulgusudur. Kontrol grubunda median 3,5. Minimum değer 1 ve maksimum değer 5 olarak görüldü. Heparin grubunda median 1,5. Minimum değer 1 ve maksimum değer 2 olarak görüldü. Metamizol sodyum grubunda ise median 2, minimum değer 1 ve maksimum değer 3 olarak görüldü. Bu değerler gruplar arasında

değerlendirildiğinde heparin grubunun diğer gruplara göre nekroz bulgusu olumlu şekilde daha az görüldü (greft yaşayabilirliğini olumlu destekleyen sonuç), heparin grubunun sonuçları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,012), bu parametre metamizol sodyum grubunda da kontrol grubuna göre daha az görüldü, ancak bu bulguda metamizol sodyum grubunun sonuçları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,136).

Üçüncü parametre ise kist oluşumu bulgusudur. Bu bulgu greftin nekroza gittiğini gösteren başka bir bulgudur. Kontrol grubunda median 2, minimum değer 1 ve maksimum değer 4 olarak görüldü. Heparin grubunda median 1, minimum değer 0 ve maksimum değer 3 olarak görüldü. Metamizol sodyum grubunda ise median 1,5. Minimum değer 0 ve maksimum değer 3 olarak görüldü. Bu değerler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,383).

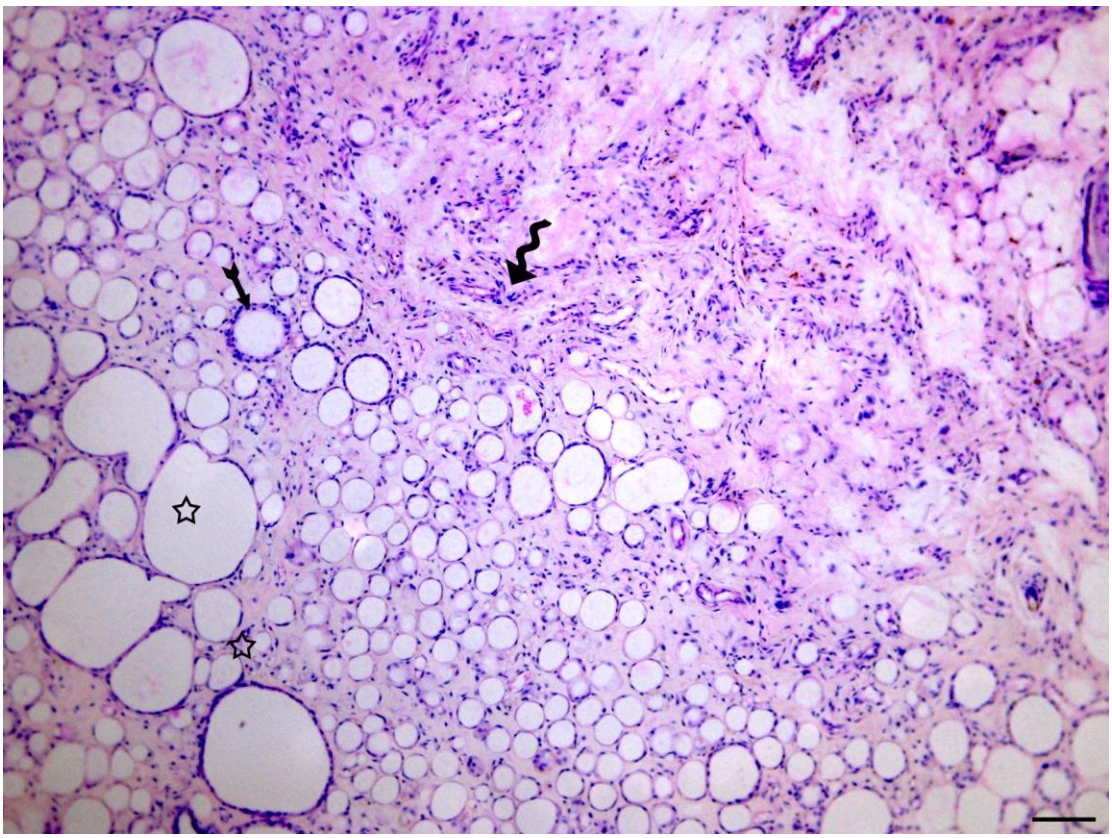
Dördüncü parametre ise fibrozis oluşumudur. Bu bulguda greftin nekroza gittiğini gösteren başka bir bulgudur. Kontrol grubunda median 2, minimum değer 1 ve maksimum değer 4 olarak görüldü. Heparin grubunda median 1, minimum değer 1 ve maksimum değer 3 olarak görüldü. Metamizol sodyum grubunda ise median 1,5.

Minimum değer 1 ve maksimum değer 2 olarak görüldü. Bu değerler gruplar arasında istatistiksel olarak sınırda anlamsız olarak görüldü (p=0,062).

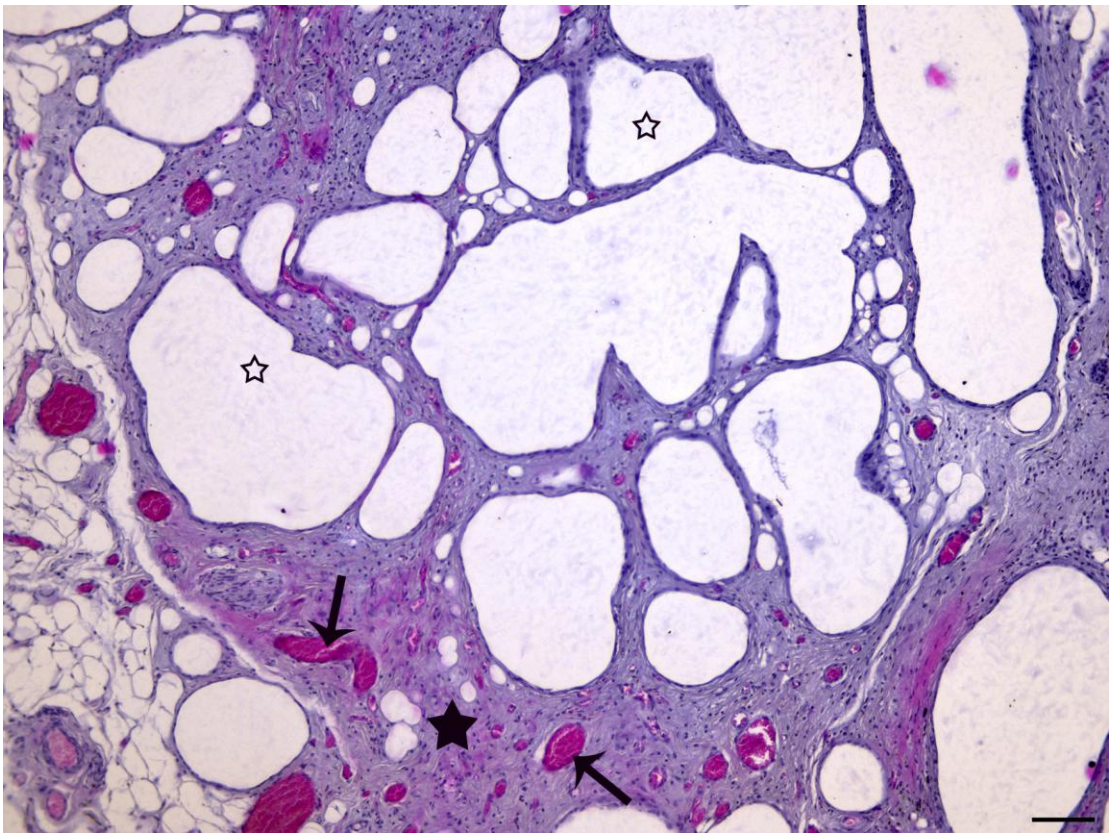
Beşinci parametre ise enflamasyon bulgusudur. Bu bulguda greftin nekroza gittiğini gösteren başka bir bulgudur. Kontrol grubunda median 2, minimum değer 1 ve maksimum değer 3 olarak görüldü. Heparin grubunda median 1, minimum değer 0 ve maksimum değer 2 olarak bulundu. Metamizol sodyum grubunda ise median 1,5 olarak görüldü, minimum değer 1, maksimum değer ise 2 idi. Bu değerler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,066).

Altıncı parametre ise neoanjiogenez bulgusudur. Kontrol grubunda median 6,930 iken, minimum değer 5,9 ve maksimum değer 13,4 olarak görüldü. Heparin grubunda median 15,281 olarak bulundu, minimum değer 12,1 ve maksimum değer 17,9 olarak

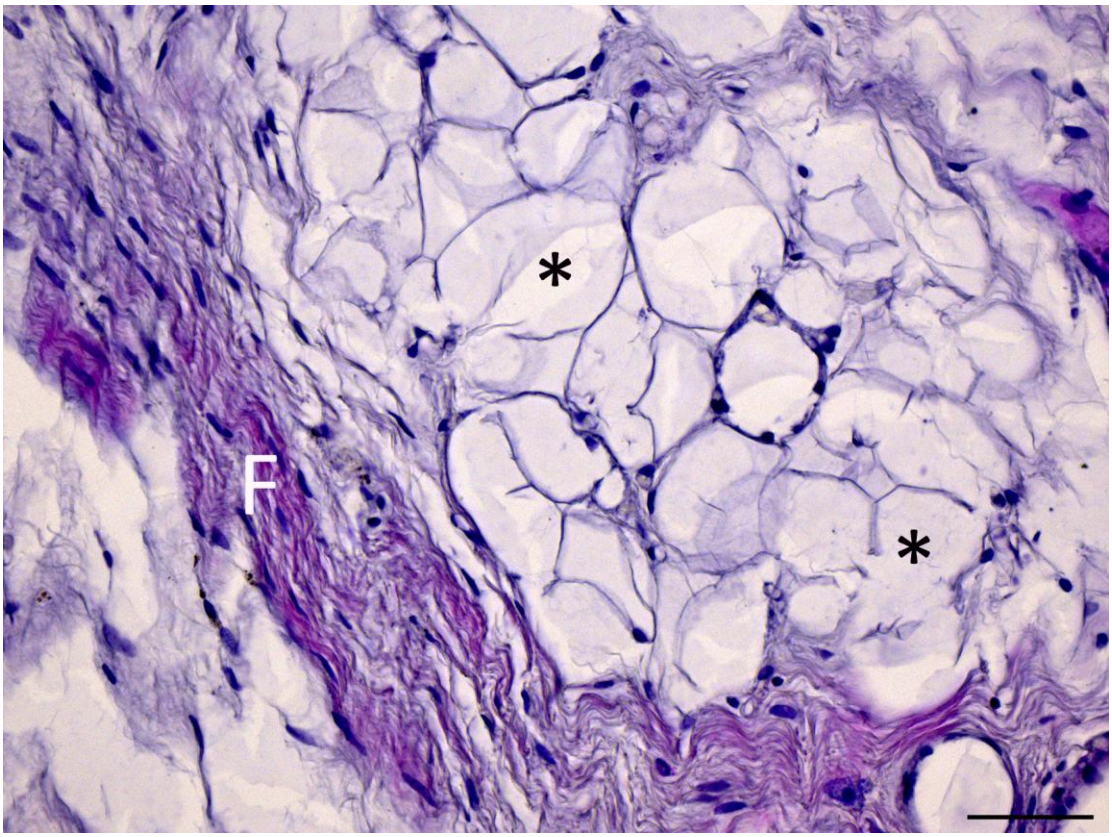
görüldü. Metamizol sodyum grubunda ise median 11,175 idi, minimum değer 8,1 ve maksimum değer 17,8 olarak görüldü. Bu değerler gruplar arasında değerlendirildiğinde heparin grubunun diğer gruplara göre neoanjiogenez bulgusu olumlu şekilde artmış olarak görüldü (greft yaşayabilirliğini olumlu destekleyen sonuç). Heparin grubunun sonuçları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,001), ancak metamizol sodyum grubunda da kontrol grubuna göre yine artmış görüldü, ancak bu bulgu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,155).



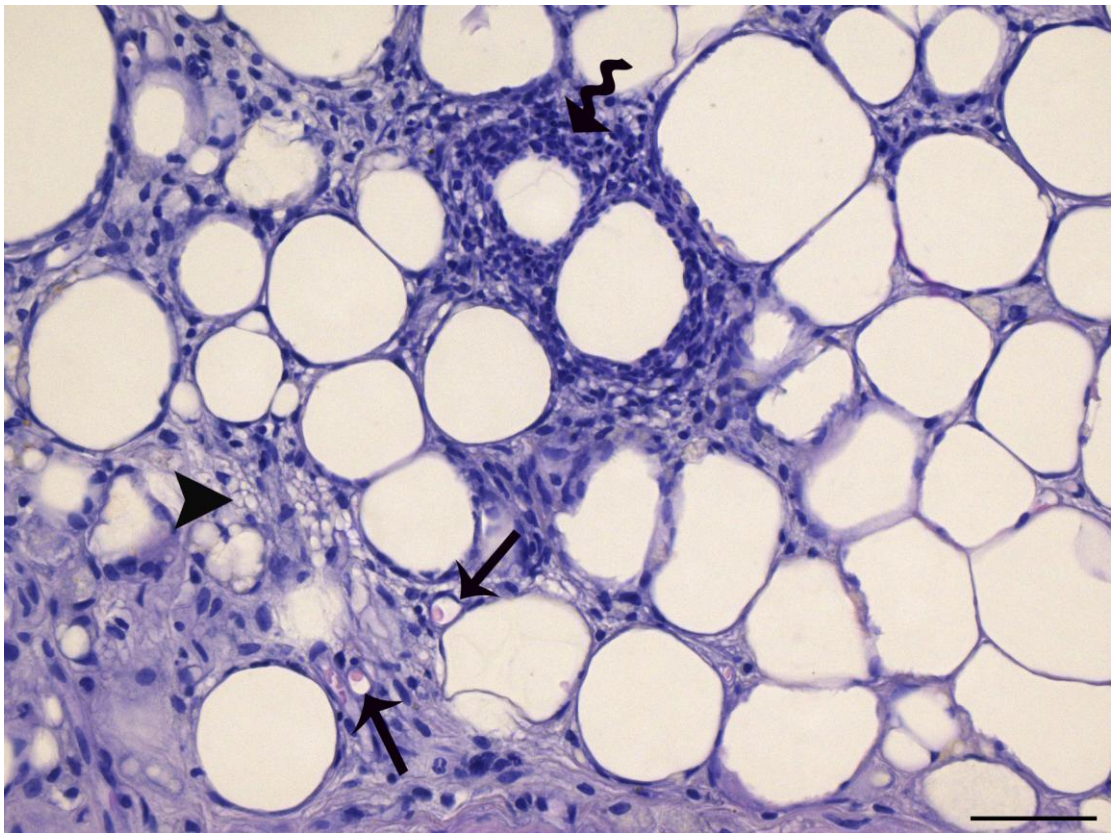
Şekil 4.1: Sf grubuna ait mikrografta yağ nekrozu alanları içinde yağ kistleri (yıldız), genişlemiş lipid vakuollerini kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler)(kuyruklu ok), yaygın hyalurinize stroma içinde mononükleer hücre infiltrasyonu (kıvrık ok) izlenmektedir. H-E. x 100



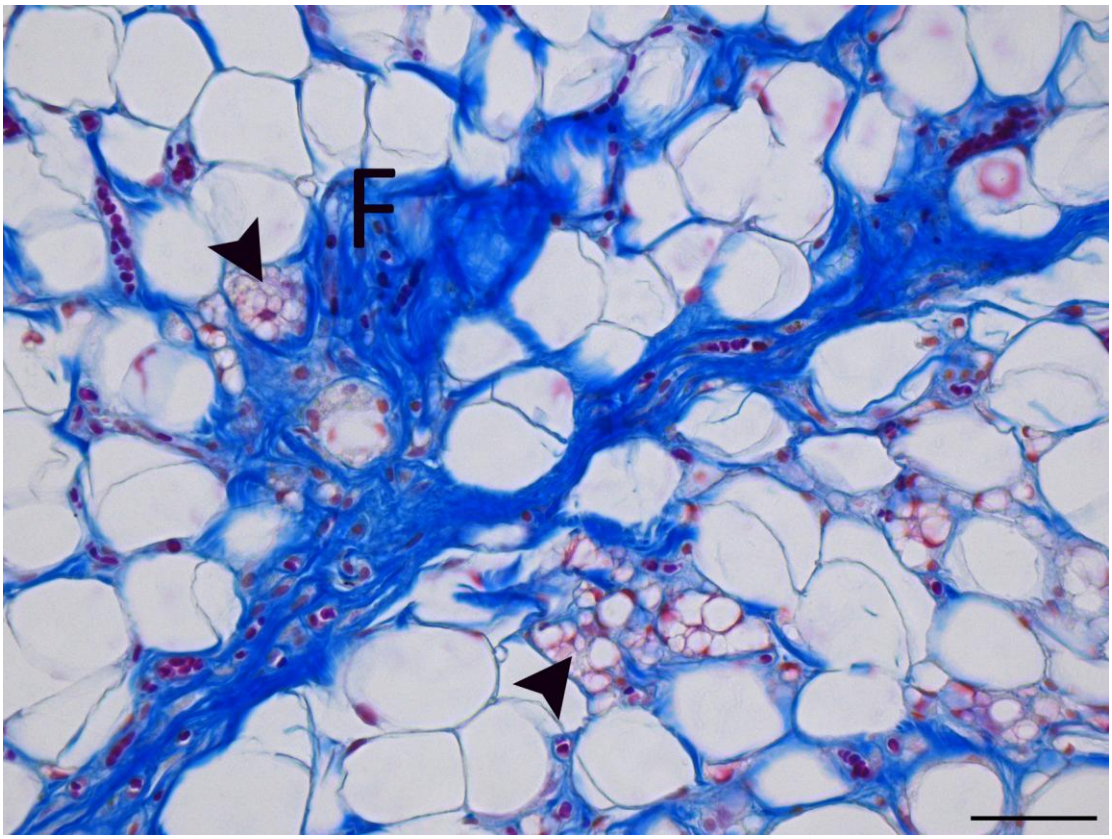
Şekil 4.2: Sf grubuna ait mikrografta mononükleer hücre infiltrasyonu gösteren hyalurinize stroma (siyah yıldız) içinde kılcal kan damarları (ok), yağ kistleri (beyaz yıldız) ile belirgin yağ nekrozu izlenmektedir. H-E. x 200



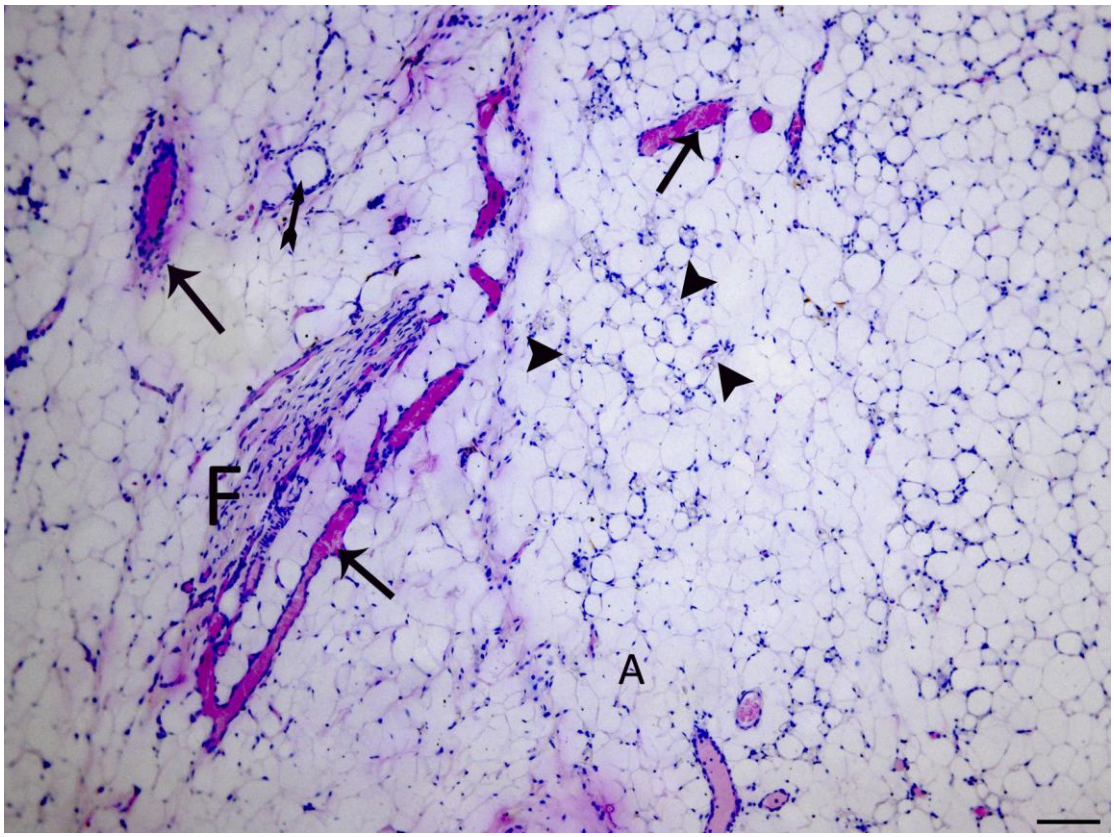
Şekil 4.3: Sf grubuna ait mikrografta fibrozis (F) ve yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks) görülmektedir. H-E. x 400



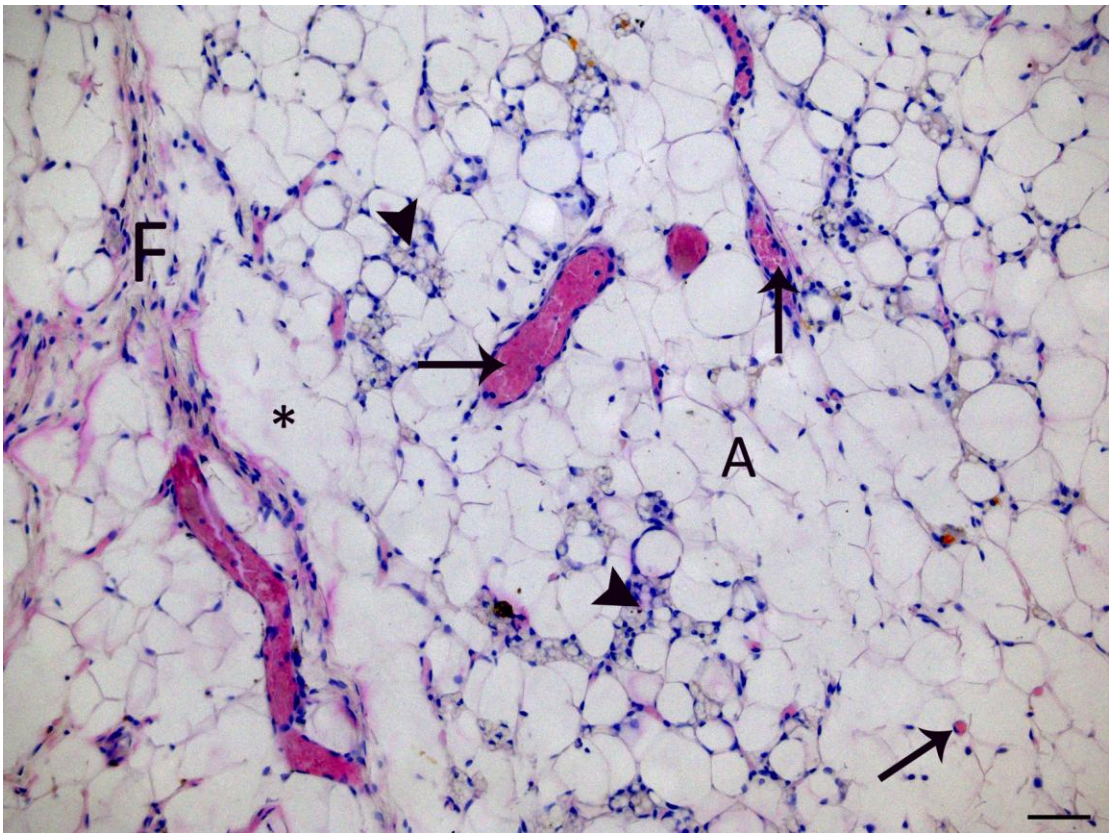
Şekil 4.4: Sf grubuna ait mikrografta yağ kistlerini kuşatan mononükleer hücreler (kıvrık ok) ile köpüksü görünümde histiyositler (ok başı) dikkat çekmektedir. Az sayıda kılcal damar (ok) hiyalurinize görünümdeki stromada izlenmektedir. H-E. x 400



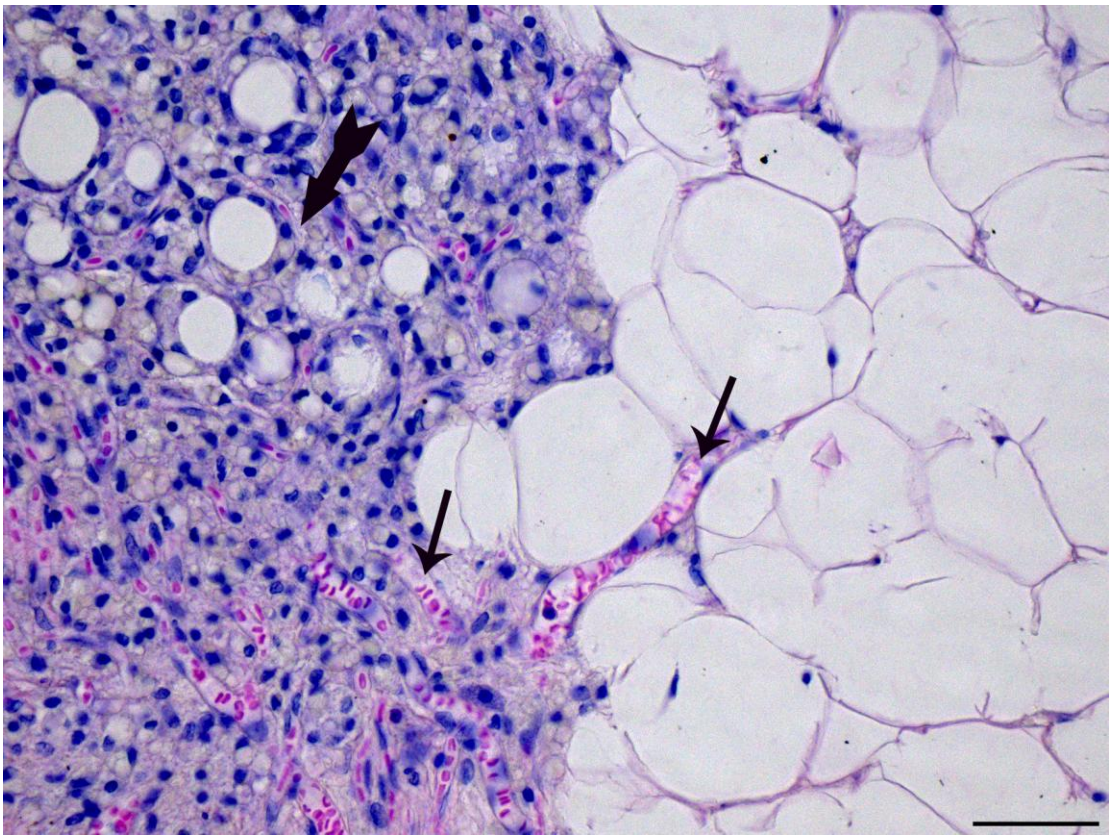
Şekil 4.5: Sf grubuna ait mikrografta, yağ vakuolleri etrafında köpük hücreleri (ok başı) ve fibrozis (F) izlenmektedir. MA x 400



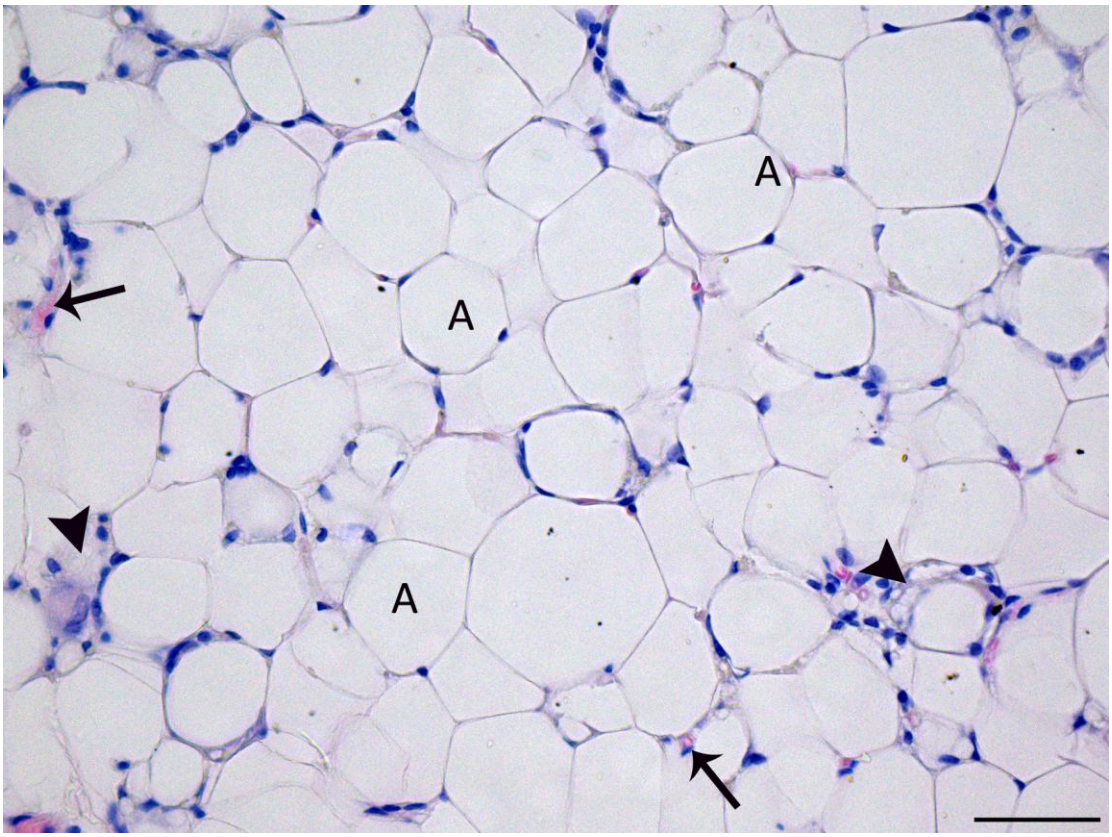
Şekil 4.6: Heparin grubuna ait mikrografta yaşayabilirliğini koruyan çekirdekli adipositler (A), yağ vakuollerinin yakınında yerleşim gösteren köpük hücreleri (ok başı), kan damarları (ok), çok küçük bir alanda gözlenen fibrozis (F) ile lipid vakuolünü çepeçevre kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler) (kuyruklu ok) izlenmektedir. H-E. x 100



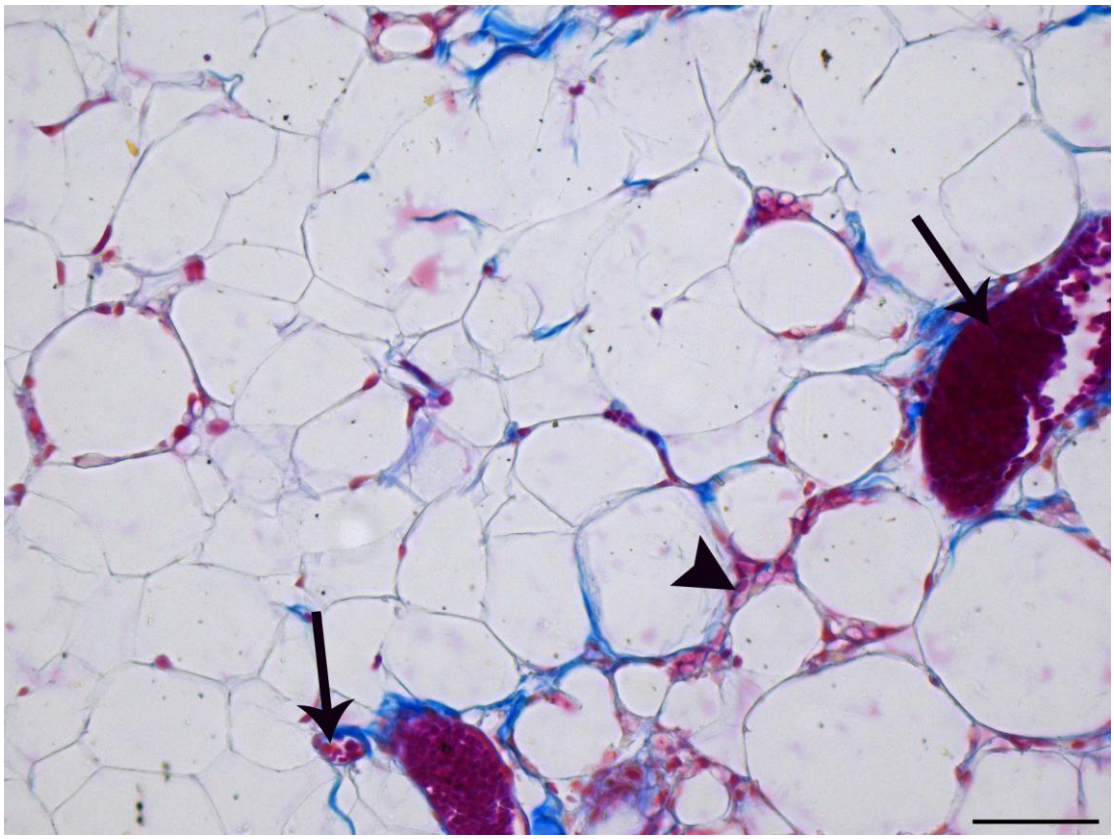
Şekil 4.7.:Heparin grubuna ait mikrografta ince bir fibrozis septa (F), yaşayabilirliğini koruyan çekirdekli adipositler (A), yağ vakuollerinin yakınında yerleşim gösteren köpük hücreleri (ok başı), farklı büyüklükte kan damarları (ok) görülmekte olup kılcal damarlanmada diğer gruplara göre artış olduğu söylenebilir. H-E. x 200



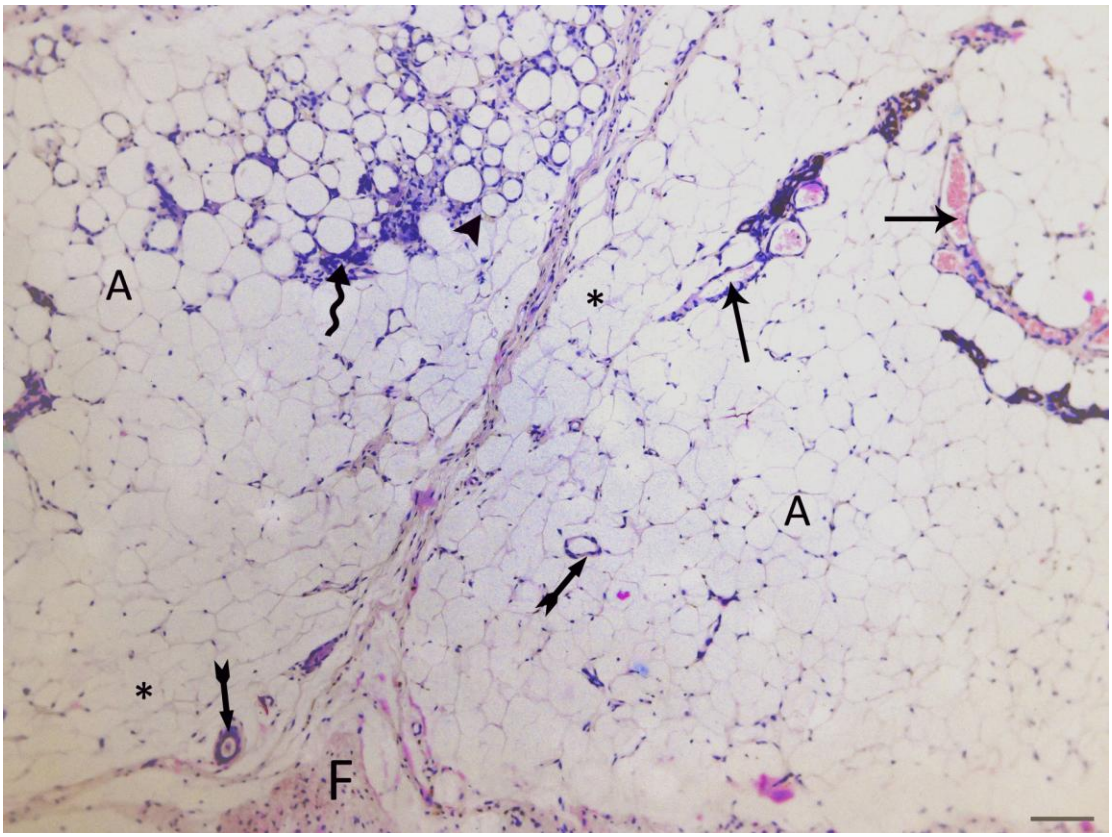
Şekil 4.8: Heparin grubuna ait mikrografta lipid vakuolünü çepeçevre kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler) (kuyruklu ok), çok sayıda kılcal kan damarı (ok) ve hücre infiltrasyonu izlenmektedir. H-E. x400



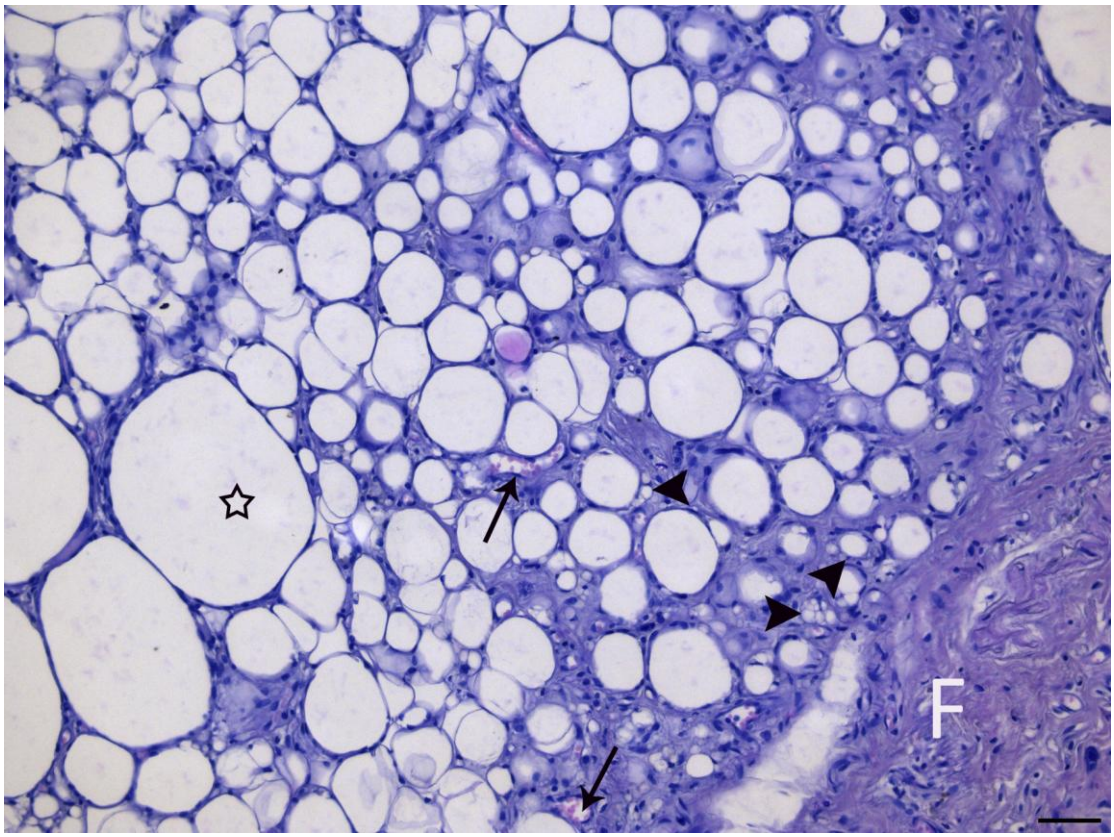
Şekil 4.9: Heparin grubuna ait mikrografta yaşayabilirliğini koruyan çekirdekli adipositlerin (A) yer aldığı alanlar izlenmektedir. Bazı yağ vakuollerinin yakınında yerleşim gösteren köpük hücreleri (ok başı) ile hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonu ve kılcal kan damarlarının (ok) bulunduğu gözlenmiştir. H-E. x 400



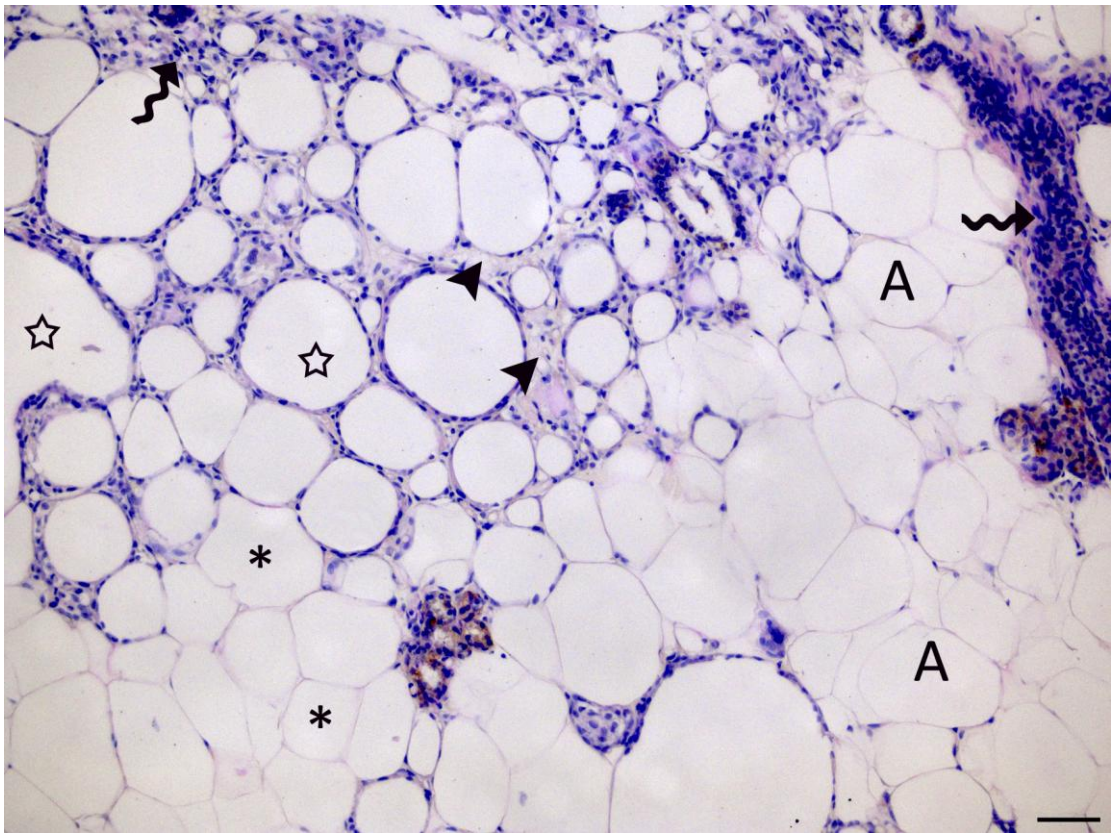
Şekil 4.10: Heparin grubuna ait mikrografta kan damarları (ok) , yağ vakuolleri etrafında köpük hücreleri (köpüksü histiyositler (ok başı) izlenmektedir. MA x 400



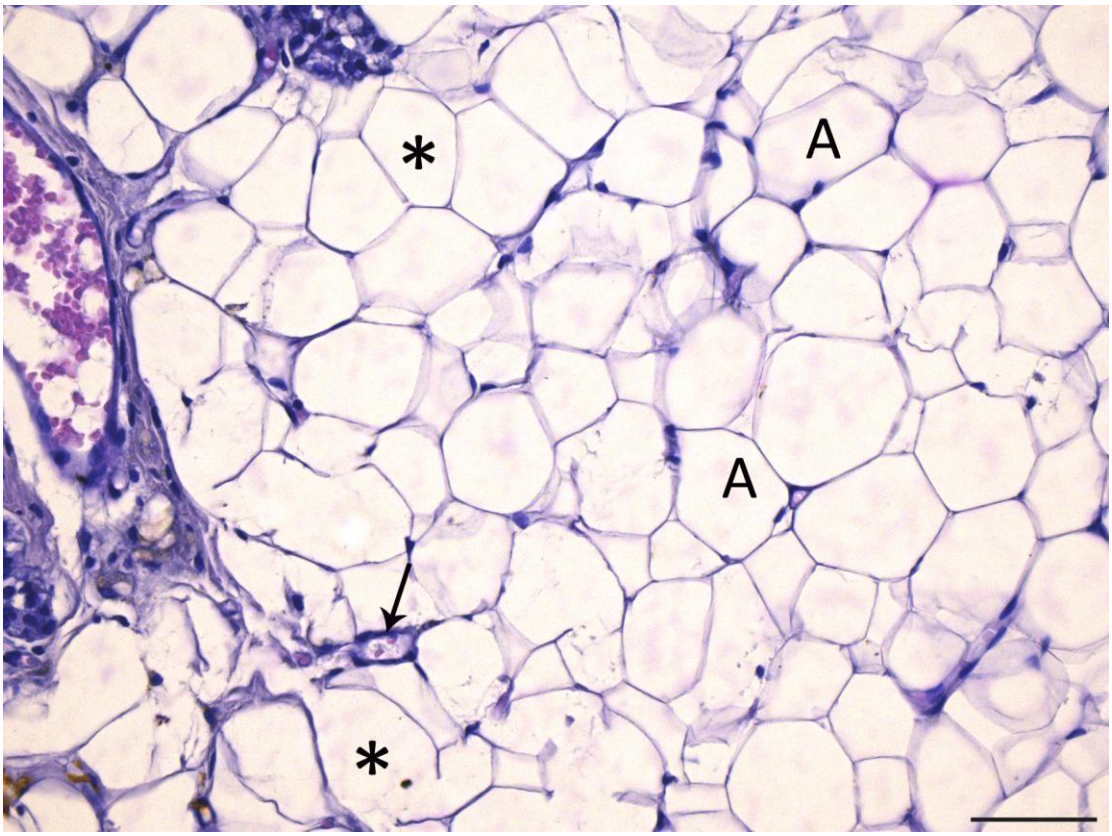
Şekil 4.11: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta genişlemiş yağ vakuolleri etrafında yerleşim gösteren köpük hücreleri (köpüksü histiyositler) (ok başı) ile mononükleer hücre infiltrasyonu (kıvrık ok) izlenmektedir. Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks)'nin yanı sıra normal görünümlü, çekirdekli adipositler (A), yer yer lipid vakuollerini çepeçevre kuşatan mononükleer hücreler (histiyositler)(kuyruklu ok) ile kan damarları (ok) dikkat çekmektedir. H-E. x 100



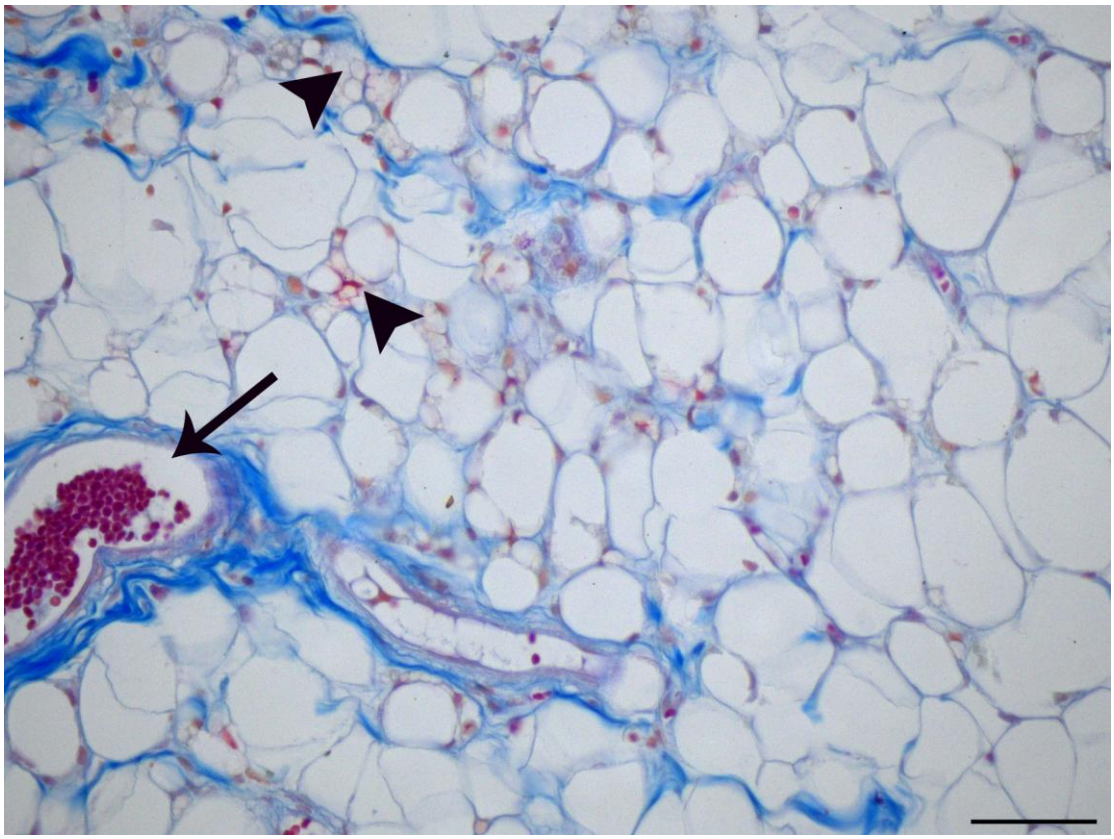
Şekil 4.12: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta yağ nekrozu alanları içinde yağ kistleri (yıldız), genişlemiş lipid vakuolleri, yaygın hyalurinize stroma kılcal kan damarları (ok) , genişlemiş yağ vakuolleri etrafında yoğunlaşan köpük hücreleri (köpüksü histiyositler (ok başı) izlenmektedir. Mikrografın sağ alt köşesinde izlenen fibrozis (F) dikkat çekmektedir. H-E. x 200



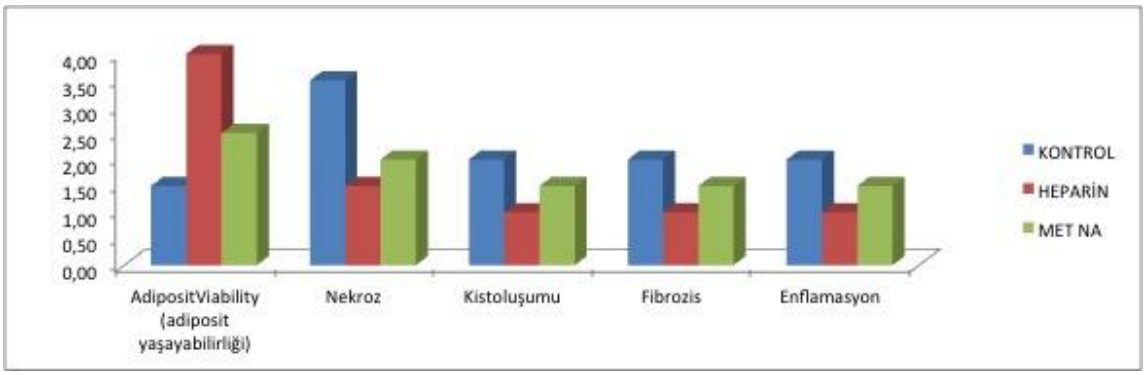
Şekil 4.13: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta yağ nekrozu alanları içinde yağ kistleri (yıldız), genişlemiş yağ vakuolleri etrafında yoğunlaşan köpük hücreleri (köpüksü histiyositler)(ok başı) ile yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks)'nin yanı sıra normal görünümlü, çekirdekli adipositler (A) izlenmektedir. Yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu (kıvrık ok) görülmektedir.. H-E. x 200



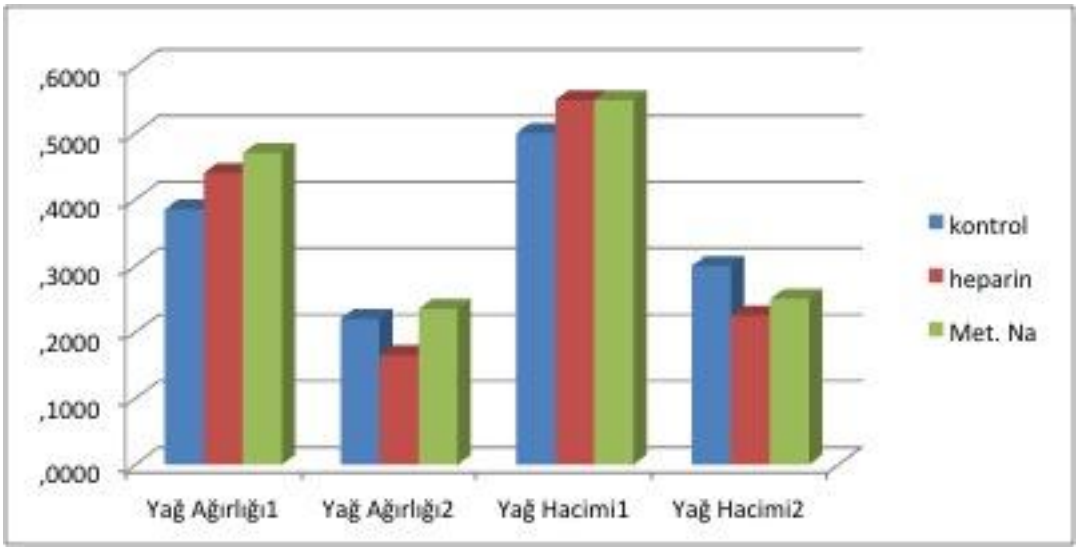
Şekil 4.14: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (asteriks)'nin yanı sıra normal görünümlü, çekirdek içeren yağ hücreleri (A) izlenmektedir. H-E. x 400



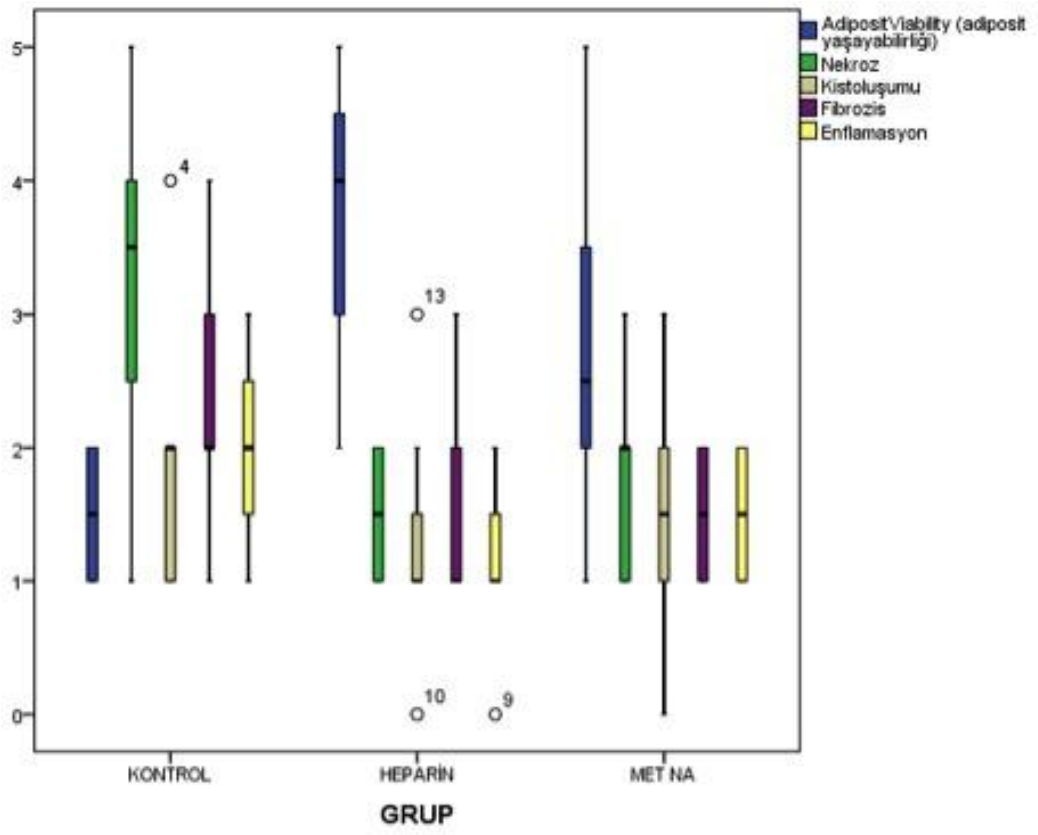
Şekil 4.15: Metamizol sodyum grubuna ait mikrografta kan damarı (ok) , yağ vakuolleri etrafında yoğunlaşan köpük hücreleri (köpüksü histiyositler (ok başı) izlenmektedir. MA x 400



Şekil 4.16: Gruplar arasında ilk 5 parametrenin karşılaştırılması



Şekil 4.17: Gruplar arası yağ ağırlığı ve hacmin karşılaştırılması (ilk ve son ölçüm)



Şekil 4.18: Gruplar arası ilk 5 parametrenin dataları

TARTIŞMA

Yağ greftlerinde en büyük sorun tutma oranlarının %10-90 arasında değişkenlik göstermesidir (10). Bu oranları arttırmak amacıyla çeşitli yöntem ve maddeler kullanılmıştır. Alınan yağ greftlerinin serum fizyolojik ile yıkanması en sık uygulanan yöntemlerden biridir (11). Büyüme faktörlerinin de bu tutma oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (12).

Literatürde yağ greftinin tutma oranlarını arttırmak amacıyla PRP (Platelet Rich Plasma)(Trombositten Zengin Plazma) kullanıldığı gösterilmiştir (10).

SR Coleman'ın santrifüj yaparak yağ greftinin kullanımının daha faydalı olduğunu göstermesiyle, yağ grefti kullanımı ile ilgili güven artmıştı. Fournier'in ise yağ grefti transferi ile ilgili tanımladığı en önemli temel, yağ greftine en az travma uygulayarak liposakşın (liposuction) ile yağı toplamaktı, daha sonra da enjektör yardımıyla grefti uygulamaktır (51,52).

Çoğu yazarlar trokanterik yağ dokusunun diğer bölgelerdeki yağ dokularına göre daha dayanıklı olduğunu görmüşler (53,54,55), bazı yazarlar ise herhangi bir fark görmemişlerdir (56,57).

Coleman yağ greftinin havaya maruz kaldığı zaman oksidasyon nedeniyle yağ greftinin %50 hücre nekrozuna uğradığını gördü (58). Bu nedenle topladığı yağ greftini 0.5 ml serumda bırakırdı.

Ayrıca yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan biri; arıtma yöntemidir. Bu yöntem bir kaç şekilde uygulanır.

Bunlardan biri yağ greftini yıkamaktır, bazı yazarlar (8,59,60) yağ greftini serum fizyolojik ile yıkayarak ve kan kalıntılarından temizleyerek zararlı olan makrofaj reaksiyonlarını da azalttığını belirtmiştir (61). Bazı yazarlar ise grefti (Ringer lactate®) ile yıkıyorlar (62,63).

Başka bir yöntem ise süzmedir (53,63,64,65). Bu yöntemdeki amaç, hücresel kalıntıları ve yağ dokuların parçalanmaları sonrası oluşan sıvı yağ damlalarını enjekte edilen yağdan ayırmaktır. Böylece enjekte edilecek olan yağ dokusu saf yağ dokusu olarak kullanılır. Ancak havaya maruziyetin artması nedeniyle adipositlerin oksidasyon riskini arttırır.

Yine santrifüj yardımıyla yağ greftinin daha yoğun ve saf olduğu ve enjeksiyon sonuçlarının daha iyi olduğu görülmüştür.

Bazı yazarlar yağ dokusuna belirli maddeler veya ilaçlar katarak yağ greftinin yaşayabilirliğini arttırmayı denemişlerdir.

Bu maddelerden biri insulindir; insulinin adipositlerin metabolik aktivitesini arttırdığını (66), lipolizi azalttığını (67,68) ve dolayısıyla yağ grefti yaşayabilirliğini arttırdığı görülmüştür.

Ancak Chajchir (69) 1993 yılında insulinin yağ yaşayabilirliğine etkisinin olmadığını söylemiştir. Aynı sonucu Moscona (70) 1994 yılında dile getirmiştir.

Fulton yağ greftinin daha sert ve kıvamlı olması için demineralize kemik pudrası kullanmıştır (71). Ayrıca yağ greftini, otolog plazma trombositlerini, trombin ve kalsiyumu karıştırdığında yağ yaşayabilirliğini %65'ten %77 ye çıkarmıştır.

Ayhan ise (72), yağ greftine beta-bloker olan Metoprolol'u kullanarak yağ grefti yaşayabilirliğinin 9 aya kadar uzadığını görmüştü.

Chajchir yağ greftinin yaşayabilirliği için alıcı bölgenin çok iyi vaskularize olmasını gerektiğini söylemişti (65,73).

Piasecki ve arkadaşları yağ greftinin yaşayabilirliği ve saflık derecesinin cerrahi eksizyonla alınan yöntemde, diğer iğne ile alınan yöntemlere göre daha iyi olduğunu görmüştür. Bu değişiklikler muhtemelen yağ greftine daha az travma olduğu nedeniyle ortaya çıkmıştır (74).

Bu tezde klinik uygulamada sıkça kullanılan heparin ve metimazol sodyumun yağ grefti tutma oranlarına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Heparin (şekil 2.1) bir antikoagülandır ve tromboembolik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (13). Heparinin yanıkda neoanjiogenez ile yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (14).

Düşük molekül ağırlıklı heparin olan Fragmin ile Protamin'in karışımı temel fibroblast büyüme faktörü (FGF-2)'nin etkisini arttırarak yağ grefti tutma oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (15).

Bu çalışmada kullanılan diğer ilaç metamizol sodium (met Na) (şekil 2.2); bir metamizol (dipyron) türevidir. Klinikte yaygın olarak ağrı kesici, ateş düşürücü ve spazmolitik ve dolayısıyla vazorelaksan amaçlı kullanılır (16). Bu ilacın vasküler düz kaslar üzerine kas gevşetici etkisi olduğu düşünülmüştür (16,75).

Bu çalışmada her iki ilacın yağ greftinin yaşayabilirliğini araştırmak için bu iki ilacın 8 hafta sonunda yağ grefti üzerine kontrol grubuna göre etkileri araştırıldı. Bu etkiler yağ greftinin ağırlığı, hacmi, nekroz bulguları, yaşayan adiposit sayıları, nekroz bulgusu olan kist, fibrozis oluşumu, enflamasyon ve yağ grefti yaşayabilirliğini arttırdığını gösteren neoanjiogenez bulgusu olan kriterler araştırıldı.

İstatiksel olarak ve beklendiği gibi, yağ greftlerin hacmi ve ağırlığı her grubun kendi bulgularına göre anlamlı olarak azalma gösterdiği görüldü. Bu da yağ greftinin zamanla bir kısmının eridiği ve yaşayabilirliğinin azaldığını kanıtlayan bir bulgudur.

Ancak gruplar arasında yağ greftinin ağırlığı ve hacminde ki değişiminin sınırda anlamsız gelmesi deney gruplardaki hayvan sayısının bu kriter için az olduğunu ve eğer hayvan sayısı daha fazla olabilirse anlamlı bir sonuç elde edilebileceğinin bir belirtisi olabilir.

Diğer kriterlerde, kontrol grubuna göre heparin grubunun adiposit yaşayabilirliğinde anlamlı olarak bir artış göstermiştir. Ayrıca yine nekroz bulgusunda anlamlı bir düşüş ve neoanjiogenez bulgusunda anlamlı artış göstermiştir.

Nakamura ve arkadaşları (15) Fragmin'in (düşük moleküllü heparinin) ve Protamin'in temel fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ile birlikte katılarak bu büyüme faktörünün yağ grefti üzerine etkisini arttırdığı görmüştür. Ancak sadece Fragmin ve Protamini kullandığında, Fragmin'in yağ grefti üzerine etkisinin kullandığı kontrol grubundaki görülen sonuçlara yakın olduğunu belirtmişti. Bizim çalışmamızda ise, kullandığımız standart heparin, herhangi bir büyüme faktörü katmadan yağ grefti yaşayabilirliği üzerine kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir.

Bu sonuca göre, heparinin yağ grefti yaşayabilirliğini tek başına anlamlı olarak arttırdığı hipotezini desteklemektedir.

Böylece günlük yaşamda başka endikasyonlar için kullanılan bu ilaç, yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmak için komplike olmayan kolay bir yöntemle, yağ greftini topladıktan 20 dakika sonra ve tek seferlik olarak normal sistemik dozunda olan heparin solüsyonunda bekleterek yağ grefti yaşayabilirliğini arttıracağını düşünmekteyiz.

Dolayısıyla hem yağ greftinin kalitesini arttırmak, hem de istenen sonuca ulaşmak için yapılan yağ grefti uygulama seanslarını azaltarak, hasta morbiditesini, yağ enjeksiyonunun toplam maliyetini, harcanan eforu ve zamanı azaltarak istenen sonuca varılabilir.

Heparinin bu olumlu sonucunun nedeni, bu ilacın başka çalışmalarda da gösterdiği iyileşme döneminde anjiogenezi arttırarak iyileşmeyi hızlandırması olduğunu düşünüyoruz (14,76). Bu ilacın bu etkisinden yararlanarak, neoanjiogenezi arttırarak yağ grefti yaşayabilirliğini arttırdığını gördük.

Heparin anjiogenezde tomurcuklanmayı ve yeni damarların arttırımında tetikleme potansiyeline sahiptir. Neoanjiogenezde aktif olan endotel hücreleri, büyüme

faktörlerine bağlanmayı tercih ederler. Bu faktörler; vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (FGF2) gibi büyüme faktörlerdir.

Anjiogenez olayı endotel hücrelerin bazı büyüme faktörleri ile aktivasyonu sonucunda başlar. Endotel hücreleri çeşitli iç ve dış uyarıcılar tarafından aktive edilebilir. Spesifik reseptörler ile, örneğin temel fibroblast büyüme faktörü (FGF2) gibi büyüme faktörlerinin kendi spesifik reseptörlerine bağlanmalarına yardımcı olur (77).

Bu işlemler sonucu, ektraselüler matriksin matriks metaloproteazları (MMP) tarafından erimesini sağlar ve endotel hücrelerin proliferasyona uğrayarak olgunlaşmamış yeni damarları oluşturur (78). Bu olgunlaşmamış damarlar, mural hücrelerin toplanması ve yardımıyla daha stabil hale gelirler. Bu da mural hücrelerin bu damarların hacmini arttırması ile görülür (79). Heparinin bu büyüme faktörleri üzerine etkisi olduğu anlaşılmıştır (80,81). Heparin kapiller endotel hücreleri için hem canlıda (in vivo) (82), hemde laboratuvarda (in vitro)(83) bir mitojen rolünü görür. Bu yüzden heparinin anjiogenezi tetiklediği anlaşılabilir (76).

Ekstraselüler matrikste bulunan heparin, anjiojenik olan büyüme faktörleri için bir rezervuar gibi davranabilir ve endotel hücrelerin uzun süre stimülasyonunu sağlar.

Literatürde heparinin tavuk embryosu üzerine uygulandığında yeni kan damarlarının oluşmasını uyardığı görülmüştür (76).

Ayrıca Nakamura ve arkadaşları Fragmin ve Protamin karışımının FGF-2 büyüme faktörünün biyolojik yarı ömrünü arttırdığını ve bu büyüme faktörünün ısı, asit veya proteoliz nedeniyle bozulmasını engellediğini anlatmıştır (70).

Bu çalışmada heparinin olumlu sonucu da Fragmin'in FGF-2 üzerinde gösterdiği bu etki gibi bir etki sonucu ortaya çıkmış olabilir.

Ancak daha önce yapılan tüm çalışmalar gibi, bu çalışmanın hayvan yağ dokusu kullanılarak yapılması, aynı sonuçların insanda da direkt olarak yansımaması (84), bu

çalışmanın bir kısıtlaması olarak kabul edilebilir. Bu konuda ileri zamanlarda bu ilaçların insan yağ grefti kullanılarak uygulanması gerekebilir.

Heparin etkisinin kist oluşumunda, fibrozis oluşumunda ve enflamasyonda istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının sebebi, deney gruplardaki hayvan sayısının bu kriter için az olduğunu ve eğer hayvan sayısı daha fazla olabilirse anlamlı bir sonuç elde edilebileceğinin bir belirtisi olabilir.

Başka bir sebep ise, heparinin dozu bu bulguların değişmesi için yeterli olmayabilir veya yağ greftinin heparin solüsyonunda bekletme zamanının daha uzun olması gerekebilirdi.

Literatürü taradığımızda yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin yaşayabilirliği üzerine heparinin etkisi Yukawa ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır, bu literatürde heparinin 24 saat sonunda her hangi bir etkisi olmadığı görülmüştür (85).

Ancak Nakamura ve arkadaşları Fragmin ve Protamin'in FGF-2 büyüme faktörü ile karıştırılarak yağ greftlerinin yaşayabilirliğini ve neoanjiogenezi arttırdığını görmüşler (15).

Üçüncü grupta kullanılan metamizol sodyumun literatür bilgilerine dayanılarak spazmolitik bir etkiye sahip olduğunu (16) ve deri flebinde kanlanmayı arttırdığını, dolayısıyla yaşayabilirliğini arttırdığını görmekteyiz (75).

Metamizolun vazorelaksan özelliği tavşan baziller arter modeli üzerinde denendiğinde metamizolun lokal veya sistemik olarak verildiğinde her iki durumda da spazmolitik etkisi olduğu görülmüştür (17,18). Düz kaslarda gevşeme etkisi çoğu dokularda görülmüştür (18, 19).

Metamizol bu etkiyi vasküler düz kaslarda da göstermiştir. Bu etkiyi de vasküler düz kaslarda fenilefrin (phenylephrine) gibi aktif kardiyovasküler maddelerin kontraksiyon etkisini inhibe ederek ortaya çıkarmıştır.

Valenzuela ve arkadaşları metamizolun bu vazorelaksan etkisini araştırarak, metamizolun damarlarda ki düz kasların gevşemesini Anjotensin II'nin yaptığı kontraksiyonu engelleyerek sağlamakta olduğunu göstermişler (17). Bu etkiyi de düz kaslarda mevcut olan K_{ATP} kanalları üzerine kanal açıcı etkisi yaparak sağlamaktadır.

Metamizol sodyumun bu etkisini bu tezde yağ grefti üzerine araştırdık ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm parametrelerde sonuçları olumlu olarak etkilediğini göstermektedir. Her ne kadar bu sonuçlar istatiksel olarak anlamlı bulunmaz ise de, klinik olarak göz ile görülebilir olumlu sonuçları mevcuttur.

Metamizol sodyumun etkisi adiposit yaşayabilirliği, nekroz, kist, fibrozis oluşumu ve enflamasyonda istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının sebebi, deney gruplardaki hayvan sayısının bu kriterler için az olduğunu ve eğer hayvan sayısı daha fazla olabilirse anlamlı bir sonuç elde edilebileceğinin bir belirtisi olabilir.

Başka bir neden ise; kullanılan metamizol sodyum dozunun yeterli olmaması veya yağ greftinin bu ilaçtaki bekleme süresinin yeterli olmaması olabilir ve eğer bu ilaç başka çalışmalarda daha yüksek dozla veya bekleme solüsyonunda daha uzun süre bekletilirse anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Ayrı bir neden ise, metamizol sodyumun yarı ömürünün az olması olabilir (metamizolun yarılanma ömrü (t1/2) 14 dakikadır. Ancak metamizol vücutta metabolitlerine dönüşerek etkisini devam ettirmektedir ve metamizolun metabolitlerinin ($t_{1/2}$) 2.5 – 5.5 saat arasındadır) (39). Bu yüzden metamizolun istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç göstermesi için verilen dozun belirli aralıklarla tekrarlanması gerekebilir.

SONUÇLAR

Heparin ve metamizol sodyumun yağ grefti üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1- Yağ grefti yaşayabilirliği histopatolojik olarak değerlendirilen parametreler yönünden heparin yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmaktadır.

2- Metamizol sodyumun yağ grefti yaşayabilirliği üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir.

3- İki ay sonunda, yağ greftlerinin hacimleri ve ağırlıklarında kendi grup sonuçlarına göre anlamlı düşüş göstermiştir.

4- Gruplar arasında yağ grefti hacminde ve ağırlığında ki azalmada anlamlı bir fark görülmemiştir.

ÖZET

Heparin ve Metamizol Sodyumun Yağ Grefti Yaşayabilirliği Üzerine Etkisi

Amaç: Yağ greftlerinin tıpta yaygın ve çeşitli kullanımları vardır. Yağ grefti kullanımının en önemli kısıtlaması yaşayabilirliği oranlarının değişiken olmasıdır. Bu tezde yağ greftinin yaşayabilirliği üzerine, heparin ve metamizol sodyumun etkileri araştırılmıştır. Heparinin neoanjiogenezi arttırma özelliğinden ve metamizol sodyumun spazmolitik özelliğinden faydalanılarak bu iki maddenin yağ grefti yaşayabilirliğini arttıracağı düşünülmüştür.

Yöntem: Bu çalışmada 24 adet dişi Wistar albino sıçan randomize olarak 3 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu (yağ greftinin serum fizyolojikte bekletildiği grup), ikinci grup heparin grubu (yağ greftinin heparin solüsyonunda bekletildiği grup), üçüncü grup metamizol sodyum grubu (yağ greftinin metamizol sodyum solüsyonunda bekletildiği grup) olarak belirlendi. Sol inguinal bölgeden yağ grefti alınıp ağırlığı ve hacmi ölçüldü. Yağ grefti çalışma grubuna göre 20 dk hazırlanan solüsyonda bekletildikten sonra sıçanın kafa derisi altına yerleştirildi. Sekiz hafta sonra yağ greftleri alıcı bölgeden eksize edilip hayvanlara ötanazi uygulandı. Eksize edilen yağ dokusunun ağırlığı ve hacmi tekrar ölçüldükten sonra histopatolojik incelemeleri uygulandı.

Bulgular: Heparinin adiposit yaşayabilirliği ve neoanjiogenez üzerine istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken, nekroz bulgusu üzerine istatistiksel anlamlı düşüş göstermiştir. Ancak nekrozun diğer bulguları üzerine heparin anlamlı etki göstermemiştir. Metamizol sodyumun tüm parametreler üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi yoktur. Sekiz hafta sonunda yağ grefti hacminde ve ağırlığında ki azalma gruplar arasında anlamsız iken, kendi grupları içinde anlamlı bulunmuştur.

Sonuç: Heparin yağ grefti yaşayabilirliğini arttırmaktadır. Ancak metamizol sodyumun yağ grefti yaşayabilirliği üzerine istatistiksel olarak anlamlı etki göstermemiştir.

Anahtar Sözcükler : Heparin, metamizol sodyum, nekroz, neoanjiogenez, yağ grefti yaşayabilirliği.

SUMMARY

The Effect of Heparin and Metamizole Sodium on The Fat Graft Viability

Aim: Autologous fat grafts have various uses in medicine. Though the most important problem in their use is that their survival rate have shown wide difference. In this thesis the effects of heparin and metamizole sodium on the survival rate of fat grafts were researched. Getting benefit of the ability of heparin to induce angiogenesis and of the spasmolytic effect of metamizole sodium, the ability of these two substances to increase the fat grafts' survival rate were presumed.

Methods: In this study 24 Wistar albino female rats were randomly seperated into 3 equal groups. The first group is the control group (in which the fat grafts were immersed in normal saline), the second group is the heparin group (in which the fat grafts were immersed in heparin solution), the third group is the metamizole sodium group (in which the fat grafts were immersed in metamizole sodium solution). The fat tissue was taken from the left inguinal area as fat graft, the weight and the size of each fat graft was measured. Afterwards, the fat graft was immersed according to its group into the previously prepared solution for 20 minutes. Afterwards, the fat grafts were placed under the scalp of each rat. After 8 weeks the fat grafts were excised from the donor area and the animals were euthanized. The excised fat tissues' weight and size were measured again, and after that the histopathological mesures were applied.

Results: Heparin has shown a statistically significant increase in the adipocyte viability and in the neoangiogenesis, while it showed a statistically significant decrease in necrosis. As for the other parameters of necrosis, heparin did not show any significant effects. Metamizole sodium on the other hand, did not show any significant effect on any of the researched parameters. After 8 weeks the decrease in the weight and size of the fat grafts was not significant between groups, while this decrease was statistically significant with in the groups.

Conclusion: Heparin has shown statistically significant increase in the fat graft viability, although metamizole sodium did not show a statistically significant increase in the fat graft viability.

Key Words: Heparin, metamizole sodium, necrosis, neoangiogenesis, the fat graft viability.

KAYNAKLAR

(1) Jeffrey H. Lee, M.D, John C. Kirkham, M.D, Michael C. McCormack,, M.B.A, Alexa M. Nicholls, B.S, Mark A. Randolph, M.S., William G. Austen, Jr., M.D. The Effect of Pressure and Shear on Autologous Fat Grafting. Plast. Reconstr. Surg. 2013;131: 1125,)

(2) Eva Guisantes, MD, PhD, Joan Fontdevila, MD, PhD, and Guillermo Rodriguez, MD. Autologous Fat Grafting for Correction Unaesthetic Scars. Ann Plast Surg 2012;69: 550-554

(3) Neuber GA. Fetttransplantation. Chir kongr vehandl dtsch ges chir 1893;22:66.

(4) Czerny A. Plastischer Ersatz der Brustdrüse durch ein Lipoma. Chir Kongr Verhandl 1985;216:2.

(5) Lexer E.Freie Fettgewebstransplantation. Dtsch Med Wochenschr 1910;36:46.

(6) Rehn E. Die Fetttransplantation. Arch Klin Chir 1912; 98:1.

(7) Illouz YG. De lutilization la graisse aspiree pour combler les defects cutanes. Rev Chair Esth Langue Fr 1985; 10:13

(8) Illouz YG. The fat cell graft. A new technique to fill depressions. Plast Reconstr Surg 1986;78:122.

(9) Fournier PF. Facial recontouring with fat grafting. Dermatol Clin 1990;8:523-37.

(10) Ali Modarressi, MD, Platlet Rich Plasma (PRP) Improves Fat Grafting Outcomes. World J Plast Surg. 2013 Jan;2(1):6-13.

(11) Regina Khater and Pepa Atanassova (2012). Autologous Fat Grafting - Factors of Influence on the Therapeutic Results, Current Concepts in Plastic Surgery, Dr. Frank Agullo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0398-1.

(12) Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, Wamsley S, Jensen J, Boutros S, Waugh JM, Shenaq SM, Spira M. Increased Free Fat- Graft Survıval with the Long-Term, Local Delivery of Insulin, Insulin Like Growth Factor- I, and Basic Fibroblast Growth Factor by PLGA / PEG Microspheres. Plast Reconstr Surg. 2000 Apr;105(5):1712-20.

(13) Michael P. Reilly, Scott M. Taylor, Nealie K. Hartman, Gowthami M. Arepally, Bruce S. Sachais, Douglas B. Cines, Mortimer Poncz, and Steven E. McKenzie Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcgRIIA. Blood. 2001 Oct 15;98(8):2442-7.

(14) Michael J. Saliba Jr. Heparin in the treatment of burns: a review. Burns 27 (2001) 349–358

(15) Shinichiro Nakamura, Masayuki Ishihara, Megumi Takikawa, Kaoru Murakami, Satoko Kishimoto, Shingo Nakamura, Satoshi Yanagibayashi, Yasutaka Mori, Masanori Fujita, Satoshi Kubo, Naoto Yamamoto, Tomoharu Kiyosawa. Increased survival of free fat grafts and vascularization in rats with local delivery of fragmin/protamine microparticles containing FGF-2 (F/P MP-F)

(16) S. E. Gülmez , S. Serel , A. Uluç, Z. Can, H. Ergün, Dipyrone Increases the Blood Flow of Arterial Dorsal Skin Flaps. Aesth Plast Surg (2008) 32:766–770

(17) Fermin Valenzuela, Sebastian Garcia-Saiso, Cristina Lemini, Rafael Ramirez-Solares, Horacio Vidrio, Victor Mendoza-Fernandez. Metamizol acts as an ATP sensitive potassium channel opener to inhibit the contracting response induced by angiotensin II but not to norepinephrine in rat thoracic aorta smooth muscle. Vascular Pharmacology 43 (2005) 120 – 127

(18) Ergun, H., Bagdatoglu, C., Ugur, H.C., Temiz, C., Attar, A., Egemen, N., Tulunay, F.C., 2000. The vasorelaxant effect of dipyrone on an experimental cerebral vasospasm model in rabbits. Neurol. Res. 22 (8), 815– 818.

(19) Ergun, H., Ayhan, I.H., Tulunay, F.C., 1999. Pharmacological characterization of metamizol-induced relaxation in phenylephrine-precontracted rabbit thoracic aorta smooth muscle. Gen. Pharmacol. 33, 237–241.

(20) De Benito J, Fernandez I, Nanda V. Treatment of depressed scars with a dissecting cannula and an autologous fat graft. Aesthetic Plast Surg. 1999;23:367–370.

(21) Xie Y, Zheng DN, Li QF, et al. An integrated fat grafting technique for cosmetic facial contouring. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63:270–276.

(22) Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. Aesthetic Plast Surg. 2008;32:48–55; discussion 56.

(23) Spear SL, Wilson HB, Lockwood MD. Fat injection to correct contour deformities in the reconstructed breast. Plast Reconstr Surg. 2005;116:1300–1305.

(24) Yang H, Lee H. Successful use of squeezed-fat grafts to correct a breast affected by Poland syndrome. Aesthetic Plast Surg. 2011;35:418–425.

(25) Coleman SR., Structural Fat Grafting: More Than a Permanent Filler. Plast Reconstr Surg. 2006 Sep;118(3 Suppl):108S-120S.

(26) Salgarello M, Visconti G., The Role of Sacrolumbar Fat Grafting in the Treatment of Spinal Fusion Instrumentation Related Chronic Low Back Pain A Preliminary Report. Spine (Phila Pa 1976). 2014 Mar 1;39(5):E360-2.

(27) Laubier H. Ueber enukleation mit fettimplantation. Ztschr Augenh 1910;23:426.

(28) Koll IS. The transplantation of fat in prostatic and kidney surgery. JAMA 1917;68:536.

(29) Yim Don Choi, MD; Ho Seong Shin, MD, PhD; and Ji Oh Mok, MD, PhD , Impaired Survival of Autologous Fat Grafts by Diabetes Mellitus in an Animal Model: A Pilot Study, Aesthetic Surgery Journal 2014, Vol 34(1) 168–174

(30) Jose Guerrerosantos, M.D., Amado Gonzalez-Mendoza, M.D., Yezid Masmela, M.D., Miguel Angel Gonzalez, M.D., Mauro Deos, M.D., and Pedro Diaz, V.M.D., Long-Term Survival of Free Fat Grafts in Muscle: An Experimental Study in Rats, Aesth. Plast. Surg. 20:403408, 1996

(31) Dae Kyun Park ,Yi Hwa Ji, Eun-Sang Dhong, Ja Hea Gu, and Eul-Sik Yoon, Transplantation of Rat Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) to Improve the Survival of Autologous Aspirated Fat Grafts, Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol. 9, No. 2, pp 69-74 (2012)

(32) Hasan Findik , Elif Aydin, Gokhan Beyhan, Adnan Uzunismail. The effects of different harvesting techniques, adrenaline, and centrifuge on the survival of fat grafts Eur J Plast Surg (2007) 30:75–79

(33) Condé-Green A, Wu I, Graham I, Chae JJ, Drachenberg CB, Singh DP, Holton L 3rd, Slezak S, Elisseeff J. Comparison of 3 techniques of fat grafting and cell-supplemented lipotransfer in athymic rats: a pilot study. Aesthet Surg J. 2013 Jul;33(5):713-21.

(34) Davis K, Rasko Y, Oni G, Bills J, Geissler P, Kenkel JM., Comparison of Adipocyte Viability and Fat Graft Survival in an Animal Model Using a New Tissue Liquefaction Liposuction Device vs Standard Coleman Method for Harvesting. Aesthet Surg J. 2013 Nov 1;33(8):1175-85. doi: 10.1177/1090820X13510526. Epub 2013 Nov 6.

(35) Folkman J, Taylor S, Spillberg C. The role of heparin in angiogenesis. Ciba foundation symposium1983;100:132-49.

(36) Azizkhan RG, Azizkhan JC, Zetter BR, Folkman J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. J Exp Med 1980;152:931

(37) Heparin sodium product information (Lilly—US), Rev 12/89, Rec 3/90.

(38) THORIR D. BJORNSSON and GERHARD LEVY, Pharmacokinetics of Heparin. II. Studies of Time Dependence in Rats, The Journal of Pharmacology and Experimental Theraputics Vol. 210 No.2

(39) Irina Nikolova, Jasmina Tencheva, Julian Voinikov, Valentina Petkova, Niko Benbasat, Nikolai Danchev. Metamizole: A review profile of A well-known "forgotten" drug. Part I: Pharmaceutical and nonclinical profile. Review PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY. DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0089

(40) M. M. Dorsch, K. Otto & H. J. Hedrich, Does preoperative administration of metamizol (Novalgin®) affect postoperative body weight and duration of recovery from ketamine– xylazine anaesthesia in mice undergoing embryo transfer: A preliminary report, Laboratory Animals (2004) 38, 44–4

(41) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and inspections, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, METAMIZOLE, SUMMARY REPORT (2), EMEA/MRL/878/03-FINAL, June 2003

(42) A. Jasiecka, T. Maślanka, J.J. Jaroszewski. Pharmacological characteristics of metamizole, Review. DOI 10.2478/pjvs-2014-0030

(43) Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm MF, Brune K (2007) Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. FASEB J 21: 2343-2351.

(44) Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K (2007) Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. Br J Pharmacol 151: 494-503.

(45) Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, Watzer B, Schlosburg J, Lichtman AH, Cascio MG, Bisogno T, Di Marzo V, NuÅNsing R, Imming P (2012) Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). Bioorg Med Chem 20: 101-107.

(46) Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase- 1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13926-13931.

(47) Escobar W, Ramirez K, Avila C, Limongi R, Vanegas H, Vazquez E (2012) Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. Eur J Pain 16: 676-689.

(48) Tortorici V, Vanegas H (2000) Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. Eur J Neurosci 12: 4074-4080

(49) Guerrerosantos J, Gonzalez-Mendoza A, Masmela Y, Gonzalez MA, Deos M, Diaz P. Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. Aesthetic Plast Surg. 1996 Sep-Oct;20(5):403-8.

(50) Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. AMPIS 1988; 96: 379-94.

(51) Fournier PF. Microlipoextraction et microlipoinjection. Rev Chir Esthét Lang Fr 1985;10:40.

(52) Fournier PF. : Liposculpture the syringe technique. Paris: Arnette blackwell; 1991. p. 412.

(53) Pinski KS, Roenigk Jr. HH. Autologous fat transplantation Long-term follow-up. J. Dermatol Surg Oncol 1992;18:179.

(54) Asken S. Autologous fat transplantation: micro- and macrotechniques. Am J Cosm Surg 1987;4:111.

(55) Hudson DA, Lambert EV, Bloch CE. Site selection for fat autotransplantation: some observations. Aesthetic Plast Surg 1990;14:195.

(56) Chajchir A, Benzaquen I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. Plast Reconstr Surg 1989;84:921 (discussion 935).

(57) Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. Plast Reconstr Surg 2004;113:391 (discussion 406).

(58) Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. Clin Plast Surg 1997;24:347.

(59) Krulig E. Lipo-injection. Am J Cosm Surg 1987;4:123.

(60) Lewis CM. The current status of autologous fat grafting. Aesthetic Plast Surg 1993;17:109.

(61) Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ. Analysis of lipocyte viability after liposuction. Plast Reconstr Surg 2002;109:761 (discussion 766).

(62) Fulton JE. Stabilization of fat transfer to the breast with autologous platelet gel. In: Shiffman MA, editor. Autologous fat transplantation. New York: Marcel Dekker,Inc; 2001. p. 207-218.

(63) Ersek RA, Chang P, Salisbury MA. Lipo-layering of autologous fat: an improved technique with promising results. Plast Reconstr Surg 1998;101:820-826.

(64) Coleman 3rd WP. Fat transplantation. Dermatol Clin 1999;17: 891.

(65) Chajchir A. Fat injection: long-term follow-Up. Aesthetic Plast Surg 1996;20:291.

(66) Katoes AS, Blalock K. Perfused fat cells: effects of lipolytic agents. J Biol Chem 1933;248:5089.

(67) Sidman RL. The direct effect of insulin on organ cultures of brown fat. Anat Rec 1956;124:723.

(68) Solomon SS. Comparative studies of the antilipolytic effect of insulin and adenosine in the perfused fat cell. Horm Metab Res 1980;12:601.

(69) Chajchir A, Benzaquen I, Moretti E. Comparative experimental study of autologous adipose tissue processed by different techniques. Aesthetic Plast Surg 1993;17:113.

(70) Moscona R, Shoshani O, Lichtig H, Karnieli E. Viability of adipose tissue injected and treated by different methods: an experimental study in the rat. Ann Plast Surg 1994;33:500.

(71) Fulton JE, Parastouk N. Fat grafting. Dermatol Clin 2001;19: 523.

(72) Ayhan M, Senen D, Adanali G, Gorgu M, Erdogan B, Albayrak B. Use of beta blockers for increasing survival of free fat grafts. Aesthetic Plast Surg 2001;25:338.

(73) Guerrerosantos J, Gonzalez-Mendoza A, Masmela Y, Gonzalez MA, Deos M, Diaz P. Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. Aesthetic Plast Surg 1996;20:403-8.

(74) Piasecki JH, Gutowski KA, Lahvis GP, Moreno KI, An experimental model for improving fat graft viability and purity. Plast Reconstr Surg. 2007 Apr 15;119(5):1571-83.

(75) Ergün H, Cilingir MG, Apaydin I, Erçöçen AR, Tulunay FC. The effect of dipyrone on survival of skin flaps. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 2001 Mar;35(1):19-22.

(76) Reji Bhuvanendran Rema, Karthick Rajendran, and Malathi Ragunathan. Angiogenic efficacy of Heparin on chick chorioallantoic membrane. Vasc Cell. 2012; 4: 8. Published online 2012 Apr 18. doi: 10.1186/2045-824X-4-8, PMCID: PMC3514200

(77) Hillen F, Griffioen AW: Tumour vascularization: Sprouting angiogenesis and beyond. Cancer Metastasis Rev 2007, 26:489–502.

(78) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of vegf and its receptors. Nat Med 2003, 9:669–676.

(79) Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. Nat Med 2003, 9:685–693.

(80) Dudas J, Ramadori G, Knittel T, Neubauer K, Raddatz D, Egedy K, Kovalszky I: Effect of heparin and liver heparan sulphate on interaction of HepG2- derived transcription factors and their cis-acting elements: altered potential of hepatocellular carcinoma heparan sulphate. Biochem J 2000, 350(Pt 1):245–251.

(81) Parish CR: The role of heparan sulphate in inflammation. Nat Rev Immunol 2006, 6:633–643

(82) Risau W, Ekblom P: Production of a heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. J Cell Biol 1986, 103:1101–1107.

(83) Swinscode JC, Carlson EC: Capillary endothelial cells secrete a heparinbinding mitogen for pericytes. J Cell Science 1992, 103:453–461.

(84) Sinna R, Delay E, Garson S, Mojallal A. Scientific bases of fat transfer. Critical reviewof the literature. Ann Chir Plast Esthet. 2006 Jun;51(3):223-30. Epub 2005 Oct 21.

(85) Hiroshi Yukawa, Hirofumi Noguchi, Koichi Oishi, Soichi Takagi, Michinari Hamaguchi, Nobuyuki Hamajima and Shuji Hayashi. Cell Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Combination With Heparin Attenuated Acute Liver Failure in Mice. Cell Transplantation, Vol. 18, pp. 611–618, 2009