

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Violeta Skorobać Ašanin

**ANALIZA PREŽIVLJAVANJA
AUTOLOGNIH ADIPOCITA U
REKONSTRUKTIVNOJ I PLASTIČNOJ
HIRURGIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Violeta Skorobać Ašanin

**ANALYSIS OF SURVIVING
AUTOLOGOUS ADIPOCYTES IN
RECONSTRUCTIVE AND PLASTIC
SURGERY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor:

Prof. dr Jelena Sopta, Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Svetislav Tatić, Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Milan Jovanović, Klinika za opekotine, plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju Kliničkog centra Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dušan Marić, Institut za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane:

Zahvaljujem se:

Mentoru, prof. dr Jeleni Sopti na stručnoj i naučnoj saradnji, razumevanju i podršci koju mi pružila tokom izrade ove doktorske disertacije.

Članovima komisije, prof. dr Svetislavu Tatiću, prof. dr Milanu Jovanoviću, prof. dr Dušanu Mariću na naučnoj podršci i korisnim savetima.

Svojim dragim kolegama i prijateljima, radiologu dr. Dejanu Akermanu i rendgen tehničaru Ljubiši Damljanoviću na nesebičnom trudu i velikoj pomoći za uspešnu realizaciju magnetnih prikaza.

Dragim kolegama i prijateljima patolozima dr. Gordani Pupiće i dr Savi Raičeviću na podršci i prepoznavanju značajnosti realizacije ovog projekta.

Celom timu Specijalne bolnice "Diona", posebno anesteziologu prof. dr Dobrili Radojević, anestetičarki Dragani Jocić i instrumentarki Snežani Bekčić na izuzetnoj podršci, trudu i razumevanju u realizaciji ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mom dragom suprugu Draganu Ašaninu na izuzetnoj podršci, nestvarnom razumevanju i velikoj ljubavi koju je nesebično davao tokom izrade ove doktorske disertacije.

Violeta Skorobać Ašanin

*Posvećeno mom najdražem,
sinu Andreju Skorobaću
"Ništa nije nedostižno"*

ANALIZA PREŽIVLJAVANJA AUTOLOGNIH ADIPOCITA U REKONSTRUKTIVNOJ I PLASTIČNOJ HIRURGIJI

Rezime

Uvod. Savremeno doba je obeležilo razvoj tehnika uzimanja i transplantacije autolognog masnog tkiva u svrhu rekonstrukcija meko-tkivnih defekata sa jedne strane, a sa druge strane javila se potreba za istraživanjem njegovih regenerativnih potencijala. Masno tkivo kao jedan od najvećih endokrinih organa u ljudskom organizmu, reguliše brojne metaboličke procese, ne samo masti već i drugih endokrinih sistema. U njegovim sekretornim aktivnostima učestvuju, naizgled, jednostavna masna ćelija i njegov ćelijski bogat ekstracelularni matriks. Povećana zainteresovanost brojnih istraživača se pojavila nakon izdvajanja mezenhimnih matičnih ćelija iz frakcije vaskularne strome masnog tkiva. Međutim, obezbediti sigurno preživljavanje autolognog masnog tkiva je veliki zadatak savremenih istraživača. Sam proces preživljavanja adipocita ili diferencijacija progenitorskih ćelija adipocita u druge ćeliske linije i dalje je kontraverzno pitanje. Prednost korišćenja masnog tkiva je u njegovoj dostupnosti u većim količinama, potencijalno lakoj implementaciji u pojedine delove tela, biološke kompatibilnosti, niskog antigenog potencijala i minimalnog donorskog morbiditeta.

Ciljevi istraživanja. Naš cilj je bio da ispitamo preoperativne i postoperativne morfološke i volumetrijske karakteristike transplantiranog masnog tkiva recipijentnog tkiva potkolenice magnetnom rezonancom. U cilju utvrđivanja morfoloških i funkcionalnih ćeliskih promena radili smo histološka i imunohistohemijaska ispitivanja masnog tkiva subkutano aspirirane masti iz donorskog i recipijentnog regiona.

Materijal i metod. Studija je obuhvatila 67 ispitanika ženskog pola starosti između 20 i 58 godina sa hipoplazijom potkolenice Tip III - posteriorna hipoplazija sa slabo razvijenim *m.gastrocnemis-om* i *m. soleus-om*. Ispitanike smo, pre operacije i jedan, tri i šest meseci posle operacije, fotografisali i antropološki merili: telesnu masu, indeks telesne mase, obime pojedinih delova potkolenica. Takođe, pre operativno i šest meseci postoperativno smo radili magnetnu rezonancu potkolenica radi utvrđivanja morfološke različitosti u recipijentnom regionu. U toku operacije uzimali smo uzorke različito pripremljenih transplantanata masti iz donorskog regiona, koji su histološki i imunohistohemijski ispitivani. Isti postupak uzorkovanja masti iz recipijentnog regiona radili smo šest meseci nakon operacije. Poredili smo morfološke i volumetrijske

karakteristike recipijentnog regiona potkolenice cirkumferentnim merenjem pojedinih regiona i magnetnom rezonancom. Takođe, histološkim analizama donorskog masnog tkiva i uzorka primljene masti iz recipijentnog regiona, poredili smo promenu ćeliske morfologije adipocita, a funkcionalna ispitivanja smo radili imunohistohemijskim bojenjem na faktore rasta: trombocitni faktor rasta PDGF, vaskularni endotelni faktor rasta VEGF i epidermalni faktor rasta EFG. Dobijeni rezultati su obrađivani deskriptivnim i analitičkim statističkim metodama, a nivo značajnosti od 0,05 uzet je kao granični za odbacivanje nulte hipoteze.

Rezultati. Povećenje obima potkolenice nakon šest meseci pokazuje značajnu povezanost za preoperativnim obimima i količinom infiltrirane masti u svim pojedinačnim delovima potkolenice. Vizuelno prisustvo preživelog masnog tkiva u recipijentnoj regiji pratili smo magnetnom rezonancom, gde se mast prikazuje između i unutar mišićnih grupa, kao i značajno podebljavanje potkožnog masnog tkiva potkolenice u odnosu na nalaz pre operacije. Takođe, histološkim ispitivanjima i histometrijskim merenjima utvrdili smo različitost ćeliskih karakteristika u zavisnosti od načina pripreme masti i masnih ćelija recipijentnog regiona. Imunohistohemijskim bojenjima smo pokazali različitost ekspresije faktora rasta u odnosu na način obrade masnog tkiva i da sam proces preživljavanja transplantiranog masnog tkiva menja intezitet ekspresije svih ispitivanih faktora rasta.

Zaključak. Obezbeđivanje i definisanje odgovarajuće tehnike i načina transfera masti sa donorskog na recipijentni region potkolenice je definitivno najmanje invazivan metod preoblikovanja potkolenica. Kod pacijenata sa neuromišićnim distrofijama ili traumom oštećenom potkolenicom ova tehnika može da bude definitivno jedini dobar izbor sa minimalno mogućim komplikacijama. Jednostavnost samog postupka omogućava njenu široku primenu u plastičnoj hirurgiji.

Ključne reči: uvećanje potkolenica, transplantacija masti, magnetna rezonanca, preživljavanje masti, resorpcija masti, stromalna vaskularna frakcija, faktori rasta, vaskularno endotelni faktor rasta, VEGF, epidermalni faktor rasta, EGF, trombocitni faktor rasta, PDGF, mesenhimne ćelije

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Plastična, rekonstruktivna i estetska hirurgija

UDK broj:

ANALYSIS OF SURVIVING AUTOLOGOUS ADIPOCYTES IN RECONSTRUCTIVE AND PLASTIC SURGERY

Summary

Background. The contemporary era is hallmarked by development of techniques of harvesting and transplantation of autologous fat tissue aimed at reconstruction of soft tissue defects, but at the same time this also raised the need of further research of its regenerative potentials. As one of the biggest endocrine systems in the human body, fat tissue regulates numerous metabolic processes, not only of fats but also of other endocrine processes. Seemingly simple fat cell and its rich extracellular matrix participate in a number of secretory activities however there was an increased interest of many researchers after extraction of mesenchymal stem cells from the vascular stroma of the fat tissue. But, providing a certain survival of autologous fat tissue remained a great challenge of a contemporary researcher. The very process of adipocytes survival, or differentiation of progenitor adipocyte cells into other cell lines is still a controversial issue nevertheless the advantages of using a fat tissue are numerous because of its accessibility, potentially easy implementation in various body parts, biological compatibility, low antigen potential and minimal donor's morbidity.

Aims. Our goal was to explore preoperative and postoperative morphological and volumetric characteristics of transplanted fat tissue in recipient region of the lower leg, by MRI. In order to determine morphological and functional cell alterations we used histological and immunochemical analysis of the subcutaneously aspirated fat tissue from both donor's and recipient's region.

Material and method. The study included 67 subjects, all female with hypoplasia of lower leg type III – posterior hypoplasia with underdeveloped *m.gastrocnemius* and *m. soleus* - aged between 20 and 58 years. All patients were photographed and anthropologically measured before the surgery, and one, three and six months after the surgery, namely: body mass, BMI, circumferences of lower legs in various sections. Also, before the surgery and six months after the surgery we performed MRI of lower legs in order to determine morphological differences in the recipient's region. During surgeries, we did sampling of the variously prepared transplant

tissues from donor's regions, and performed histological and immunochemical analysis, and repeated the same analysis on the recipient's region six months after the surgery. We have compared the morphological and volumetric characteristics of the recipient's region of the lower leg, by circumferential measuring and MRI. Furthermore, by histological analysis of the donor's fat tissue and sample of the fat tissue from the recipient's region, we have compared changes in the morphology of adipocytes, while functional analysis was performed by immunochemical staining of growth factors: thrombocytes growth factor PDGF, vascular endothelial growth factor VEGF and epidermal growth factor EFG. All results have been processed descriptively and by analytical statistical methods with the p value less 0.05 for rejecting the null hypothesis.

Results. The increase of the lower leg circumference six months after the surgery evidences the significant connection between preoperative circumference and the quantity of the infiltrated fat in all particular parts of the lower leg. We followed the visual presence of the survived fat tissue in recipient region by MRI, showing that the fat was present in between and within muscle groups, along with significant increase in the quantity of the subcutaneous fat tissue comparing to results before the surgery. Also, by histological and immunochemical analysis we confirmed the difference of fat cells characteristics depending on the way of preparing fat and the fat cells of the recipient's region. We have presented by immunochemical staining that there is a difference in growth factor expression depending on the preparation of the fat tissue, and that the actual process of survival of the fat tissue is changing the intensity of expression of all examined growth factors.

Conclusion. Providing and defining the appropriate technique and ways of fat transfer from donor's to recipient's region of the lower leg is definitely the least invasive method of lower leg sculpturing. This technique could be the definite first choice, with minimal potential complications for patients with neuromuscular dystrophies or those with lower leg's damaged by trauma. The simplicity of the procedure opens many avenues for its wide application in plastic surgery.

Key words: lower leg augmentation, fat transplantation, MRI, fat tissue survival, fat reabsorption, stromal vascular fraction, growth factors, vascular endothelial growth factor VEGF, epidermal growth factor EFG, thrombocytes growth factor PDGF, mesenchyme cells, lipo-filling

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Plastic, reconstructive and aesthetic surgery

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Histološka organizacija masnog tkiva	3
1.1.1. Utrastruktura adipocita belog masnog tkiva	8
1.1.2. Metabolizam adipocita	9
1.1.3. Sekretorna aktivnost adipocita	10
1.1.4. Stroma masnog tkiva	13
1.1.5. Embriolonalni razvoj masnog tkiva	14
1.1.5.1. Matične ćelije masnog tkiva	17
1.2. Mehanizam regulacije telesne težine	20
1.3. Značaj masnog tkiva u plastičnoj hirurgiji	21
1.3.1. Rekonstruktivni materijali u plastičnoj hirurgiji	22
1.3.1.1. Aloplastični materijali	22
1.3.1.2. Masno tkivo kao rekonstruktivni material u plastičnoj hirurgiji	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Tip studije	29
3.2. Mesto i period istraživanja	29
3.3. Selekcija ispitanika	29
3.3.1. Kriterijumi za uključivanje u studiju	30
3.4. Uzorkovanje	30
3.4.1. Polustrukturisani socio-demografski upitnik	30
3.4.2. Antropometrijska merenja	31
3.4.3. Tehnike vizualizacije	31
3.4.4. Analiza bioloških parametara	32
3.5. Hirurške procedure	37
3.6. Postoperativne procedure	40
3.6.1. Postoperativno uzorkovanje	41
3.7. Statistička metodologija	41

4. REZULTATI	42
4.1. Starost i Antropometrija	42
4.2. Aspirirana mast	42
4.3. Morfološke i funkcionalne karakteristike analiziranih masti	43
4.4. Proprana mast	44
4.5. Centrifugirana mast	46
4.6. Recipijentna regija	48
4.7. Korelacija starosti i histoloških karakteristika uzorka masti iz recipijentne regije	50
4.8. Promena obima potkolenice po lokalizaciji i strani tela	51
4.9. Promena obima potkolenice u odnosu na količinu infiltrirane masti i preoperativni obim	54
4.10. Proprana mast i dimenzije potkolenice	59
4.11. Centrifugirana mast i dimenzije potkolenice	62
4.12. Faktori rasta i dimenzije potkolenice	64
4.13. Korelacija karakteristika centrifugirane masti i recipijentne regije	70
4.14. Odnos ekspresije faktora rasta recipijentne regije i karakteristika centrifugirane masti	73
4.15. Faktori rasta centrifugirane, proprane i recipijentne regije	74
5. DISKUSIJA	82
6. ZAKLJUČCI	102
7. LITRATURA	103
8. BIOGRAFIJA	117

1. UVOD

Defekti koji su nastali u toku embrionalnog razvića ili su zadobijeni traumom predstavljaju ljudima veliki socijalni problem. Takvi ljudi su manje društveno prihvaćeni ili pak nisu osposobljeni za samostalni život. Zbog toga poslednja dva veka su obeležena brojnim istraživačima koji su usmereni ka pronalaženju i pokretanju ljudskih rekonstruktivnih i regenerativnih potencijala (Trojahn Kølle i sar., 2012). Jedan od najstarijih autolognih transplantacija u oblasti plastične i rekonstruktivne hirurgije je transplantacija masnog tkiva. Ona ima dugu istoriju, našli su joj svrhu u nadoknadi mekomekativnih defekata, nastalih kao urođenih anomalija, posledica traume ili bolesti poput poliomijelitisa (Mojjallal i sar., 2009). Jedan od prvih istraživača, Gustav Neuber (1893), opisao je korekciju mekomekativnog defekta na licu, zaostalog od osteomijelitisa, ekstrakcijom masnog tkiva sa nadlaktice i njegova transplantacija na donju ivicu orbite. Nakon ovog poduhvata eksploatacija transplantiranog masnog grafta našla je primenu i u drugim hirurškim granama kao što je abdominalna, torakalna hirurgija, neurohirurgija, ortopedija i hirurgija dojke. Međutim, zbog visoke incidence nekroze masnog grafta, inflamacije, fibroziranja, formiranja cista i sličnih komplikacija ova tehnika nije bila široko prihvaćena (Neuber, 1983; Sommer i sar., 2000).

Transplantaciju masti kao injektibilnu proceduru prvi je publikovao Bruning (1911), koristeći injekcione tehnike transplantirao je potkožnu mast, a sve u cilju rekonstrukcije mekog tkiva na licu. Ubrzo nakon njegovog pionirskog poduhvata Eugene Hollander je (1912) je na isti način pokušao da reši lipodistrofiju lica autolognim masnim ćelijama. Kako se ovaka primena masti pokazala korisnom, pokušano je da se njena primena proširi i na druge zahteve u okviru plastične i rekonstruktivne hirurgije. Čarls Konrad Miler (Charls Conrad Miller) 1926 god. je primenio autolognu mast u rešavanju post-opekotinskih ožiljka na licu i vratu kod 36 pacijenta (Ferraro i sar. 2011; Tabit i sar., 2012). Međutim, zbog podjednake neuspešnosti kao i kod transplantacije masnog grafta ove injektibilne tehnike su se pokazale podjednako nedovoljno efikasnim. Sa otkrićem tehnike liposukcije Illouz i Fournier (1980) su učinili transfer masnog tkiva lakšim i pouzdanijim. Ovi hirurzi su testirali svoju tehniku na lipodistofičnim licima u velikom

broju studija. Ipak, bez obzira na veliki napor i brojna istraživanja, masno tkivo je i dalje pokazivalo veliki stepen resorpcije (Sommer i sar., 2000).

Prvi pozitivni rezultati su se pojavili 90-tih godina prošlog veka kada je Sydney Coleman razvio tehniku atraumatskog uzimanja lipoaspirata i sigurne implementacija. U svojim istraživanjima je pokazao da njegova tehnika obezbeđuje bolji volumen i kvalitet kože i tkiva (Coleman,1995). Međutim, pitanje dugog preživljavanja masti i dalje je ostalo krucijalni problem ne samo estetske hirurgije nego i brojnih rekonstruktivnih zahvata. Brojni istraživači nalaze u masnom tkivu veliki rekonstruktivni i regenerativni potencijal ali je neophodno usavršiti tehnike koje bi obezbedile manji broj ponovljenih operativnih zahvata, a u cilju smanjenja ponovne, dodatne traumatizacije tkiva. U poslednje tri decenije ovaj koncept je zadobio veliku popularnost, pre svega zahvaljujući razvoju tehnika liposukcije i samim tim lakšem pristupu masnom tkivu (Tabit CJ i sar., 2012).

Autologno masno tkivo je idealni augmentacioni material za rekonstrukciju lica i mekih tkiva, zbog svoje lake dostupnosti u većim količinama, biološke kompatibilnosti, niskog antigenskog potencijala, kao i minimalnog donorskog morbiditeta (Coleman SR, 2001). Transplantacija adipocita ne samo da predstavlja prirodnu alternativu aloplastičnim materijalima, već je jedinstvena zbog mogućnosti transfera malih količina masti u lokalizovana područja deficijencije. Međutim, nepredvidljivost resorpcije autotransplantiranih adipocita, kao i mogućnost fibroziranja transplantata, mogu biti prepreke za primenu masnog tkiva kao superiornog kozmetičkog filera (Coleman, 2008; Bertossi i sar., 2003). Radi obezbeđivanja boljeg preživljavanja masnih ćelija naučnici su u poslednjoj deceniji svoja istraživanja usmerili ka sekretornim aktivnostima masnog tkiva i ultrastrukturi adipocita. Definisanje i izdvajanje matičnih ćelija iz masnog tkiva MSC (engl. *mensehimal stem cells*) ili izdvajanje vaskularne strome SVF (engl. *stromal vascular fraction*) i obogaćivanje masnog transplantata sa njom ili pak dodavanje vaskularnog endotelnog faktora rasta VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) u masni transplantat, kao i pokretanje mnogo drugih signalnih potencijala adipocita, moglo bi da obezbedi dugotrajnost preživljavanja transplantiranog tkiva ili pak pokretanje njegovih regenerativnih potencijala (Zuk i sar., 2001; Cawthorn i sar.,2012).

Korišćenje sopstvenih resursa, odnosno sopstvenog masnog tkiva kao slobodnog transplantata će učiniti 21. vek posebno značajnim jer će pokazati kolika je njegova moć u regenerativnoj medicini (Frese i sar., 2016). Mnoga pitanja se postavljaju, šta obezbeđuje preživljavanje masnog tkiva ili šta pokreće njegov regenerativni potencijal; da li je to sama količina masti, da li je kvalitet donorske ili recipijentne regije, da li je tajna u ogromnom sekretornom potencijalu adipocita ili su to pak resursi matičnih ćelija koje poseduje masno tkivo? Odgovori na ova i još mnoga druga pitanja biće zadatak sadašnjih i budućih istraživača.

Ali bez obzira na velike napore i zadatke i dalje ostaje kontraverzno pitanje sam proces preživljavanja masnog tkiva.

U okviru ove doktorske teze biće sagledan značaj masnog tkiva za uvećanje obima određenih regija lica i tela, kao i način pospešivanja preživljavanja ovog tkiva, a u cilju postizanja što boljeg funkcionalnog i estetskog efekta.

1.1. Histološka organizacija masnog tkiva

Masno tkivo može da se posmatra kao najveći organ u telu čoveka, koje čini 15–20% mase muškaraca i 20–25% ukupne mase normalno uhranjenih žena (Forte i sar., 2017). Osnovna uloga masnog tkiva je skladištenje energije u obliku masti-triglicerida koja je znatno viša nego energija glikogena smeštena u mišićima i jetri. Njegova potkožna lokalizacija učestvuje u oblikovanju tela, ali je isto tako i dobar toplotni izolator. Na nekim delovima tela koja su izložena pritisku ima potpurnu ulogu kao što su dlanovi i tabani ili mehanički zaštitnu ulogu kao što je u orbiti. U procesu gladovanja na ovim mestima mast se zadržava, dok se na drugim mestima mnogostruko smanjuje (Kolaparthi i sar., 2015; Ersoy i sar., 2010).

Postoje dva tipa masnog tkiva: **belo WAT** (engl. *white adipose tissue*) ili unilokularno **mrko BAT** (engl. *brown adipose tissue*) ili multilokularno. Belo masno tkivo ili unilokularno je osnovno tkivo odraslih osoba, dok je mrko masno tkivo-multilokularno i zastupljeno je u fetalnom razvoju i održava se tokom prve godine života novorođenčeta (Chechi i sar., 1985).

Unilokularno (belo ili žuto) masno tkivo (engl. *white adipose tissue*) WAT se prema lokalizaciji deli na potkožnu ili subkutanu mast (engl. *subcutaneous adipose*

tissue) SAT i visceralnu mast (engl. *visceral adipose tissue*) VAT raspoređenu oko visceralnih organa. Subkutano masno tkivo raspoređeno je u hipodermisu i kao njegova najveća lokalizacija formira "*panniculus adiposus*". Boja masnog tkiva se može kretati od bele do žute u zavisnosti od tipa ishrane. Subkutana mast je različite debljine zavisno od lokalizacije i od pola. Znatno je deblje u predelu kože trbuha, glutealnoj regiji, bedrima, aksilama, a kod žena još više prisutno u predelu butina i dojki nego kod muškaraca.

Poslednje tri decenije masno tkivo je došlo u fokus raznih istraživača i doživljava svoju renesansu u polju naučnih istraživanja njegovih strukturalnih, sekretornog i regenerativnog potencijala. U odnosu na svoje strukturalne specifičnosti i učestvovanja u raznim funkcijama pa može se podeliti na masno tkivo koštane srži, mrko masno tkivo, masno tkivo mlečne žlezde, mehaničko-potporno masno tkivo i belo masno tkivo (Kolaparthi sar., 2015).

Masno tkivo koštane srži u kojoj se odvija hematopoeza predstavlja izvor energije i brojnih citokina koji su uključeni u procese osteogeneze i hematopoeze (Zhou i sar., 2015).

Mrko masno tkivo obavlja termogenezu, odnosno zaduženo je produkciju toplote. U ljudskom razvoju zastupljeno je kod novorođenčadi, locirano je oko nekih glavnih organa kao što je srce, gonade, bubrezi, aorta, a u toku odrastanja jedinke ono postepeno nestaje iz organizma (Giralt i sar., 2013).

Masno tkivo dojke važno je za period laktacije u kome obezbeđuje hranjive materije i energiju. Shodno tome u metabolizam masnog tkiva dojke uključeni su i ženski polni hormoni (Zepf i sar., 2016; Chong i sar., 2011).

Mehaničko masno tkivo raspoređeno je retrorbitalno, a nalazi se na tabanima i dlanovima. Njegova uloga je da štiti od mehaničkih povreda i da pruži strukturalnu potporu ovim regionima glave i tela (Kolaparthi i sar., 2015).

Belo masno tkivo reguliše čuvanje i oslobađanje energije organizma, sekretuje brojne hormone, adipokine, masne kiseline, steroidne hormone, prostaglandine, interleukine i brojne druge faktore, putem kojih ispoljava sistemske efekte u organizmu

(Hass i sar., 2011; Kershaw i sar., 2004; Kolaparthi i sar., 2015). Rasprostranjeno je u celom telu, a najveći intra-abdominalni depoi se nalaze oko omentuma (sloj peritoneuma), intestinuma i perirealnog prostora, kao i u potkožnim depoima ekstremiteta i abdomena. Zbog toga, ovo masno tkivo poseduje visoku plastičnost koja se ogleda kako u hipertrofiji zrelih adipocita, tako i u diferencijaciji prekursorskih ćelija prisutnih u stromi.

Na osnovu strukturnih i ultrastrukturnih osobina belo masno tkivo se deli na depozitno, strukturno i fibrozno. Depozitno belo masno tkivo se uglavnom nalazi u abdominalnom regionu (periumbilikalno), a ćelije unutar ovog tkiva su krupne, gusto pakovane, povezane finim kolagenim vlaknima i okružene brojnim kapilarima. Strukturno belo masno tkivo se nalazi u stromalnom delu ekstremiteta i kukova. Ovo tkivo ima razvijenu vaskularizaciju i može se smatrati pogodnim za regenerativne procedure zasnovane na prenosu autolognog tkiva iz donorskog u recipijentni region. Fibrozno masno tkivo ima vrlo razvijenu kolagenu, fibroznu stromu i nalazi u delovima tela koji su izloženi nekom mehaničkom stresu (Sbarbati i sar., 2010; Gómez-Hernández i sar., 2016).

Osnovna jedinica građe masnog tkiva je adipocit, čiju zapreminu najviše zauzima lipidna kap i daje joj unilokularni izgled. Između ćelija adipocita nalazi se fina mreža retikularnih vlakana (kolagen tipa III), koja povezuje pojedinačne adipocite. Oko ćelija se takođe nalazi i razvijena mreža nemijalinizovanih nervnih vlakana (Britton i sar., 2011). Masno tkivo je bogato vaskularnim elementima sa dobro razvijenom mrežom kapilara između ćelija koja je predstavljena kao vaskularna stroma. Masne kiseline u obliku lipoproteina se do adipocita transportuju kapilarima, iz kojih enzim endotelinih ćelija (lipoprotein lipaza) oslobađa masne kiseline. Oslobodene masne kiseline difunduju kroz zid kapilara i dospevaju u adipocit, gde se povezuju sa glicerolom i deponuju u lipidnu kap. U lipidnim kapima najvećim delom se skladišti energija u obliku triglicerida (estri glicerola i masnih kiselina). Hormonski i nervni signali učestvuju na oslobađanje masnih kiselina iz lipidne kapi, oni dovode do aktivacije adipocitne lipaze (hormonsenzitivna lipaza), koja razgrađuje trigliceride. Oslobodene masne kiseline difunduju u kapilare gde se vezuju za albumin i transportuju putem plazme do mesta gde će se upotrebiti (Gómez-Hernández i sar., 2016). Brojni hormoni utiču na deponovanje i

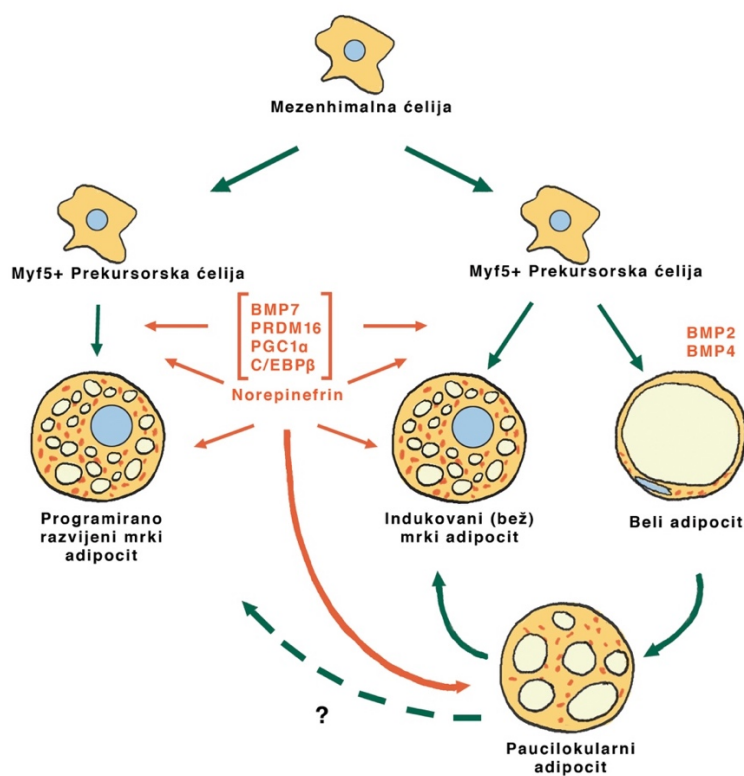
oslobađanje masnih kiselina iz adipocita, kao što su insulin, hormon rasta, prolaktin, glukokortikoidi, tiroidni hormon i dr. Funkcija masnog tkiva zavisi od vrste adipocita, njihove mikro-okoline, distribucije masnog tkiva u organizmu, uticaja centralnog nervnog sistema CNS, metaboličkih potreba i drugih sistemskih činilaca. Masno tkivo je regulator energetskeg metabolizma, inflamacije, imunološkog odgovora, hematopoeze i osteogeneze, a značajan je i kao endokrini organ koji sintetiše adipokine, lipokine, inflamatorne i druge citokine (Gómez-Hernández i sar., 2016; Ross i sar., 2016).

Mrko ili multilokularno masno tkivo postoji u fetalnom stadijumu i sačinjava 5% ukupne telesne mase novorođenčeta, ono se polako gubi u prvoj dekadi njegovog života. Smatra se da je uloga mrkog masnog tkiva u stvaranju toplote tela i da je načešći uzročnik hipertermije novorođenčeta. U kasnijem životnoj dobi ostaje u malim količinama oko unutrašnjih organa u sredogruđu, ispod ključnih kostiju i oko lopatica (Chechi i sar., 1985).

Adipocit mrkog masnog tkiva je malih dimenzija sa centralno postavljenim okruglim jedrom. Citoplazma je značajnije zastupljena nego kod belog masnog tkiva i ispunjena je pojedinačnim masnim kapljicama zbog čega je i dobila naziv multilokularno masno tkivo. Unutar citoplazme je mali Goldži aparat dok su mitohondrije velike, okrugle, sadrže veliku količinu citohromoksidaze koja mu i daje mrku boju. Mrki adipociti se razlikuju od belih ne samo po građi ćelije već i po specifičnom proteinu koji skretuje pod ekspresijom iRNK i naziva se specifični razdvajajući protein 1 (engl. *uncoupling protein*-UCP-1) ili termogenin. Termogenin je esencijalni protein za metabolizam ćelije, glavni je regulator funkcije mitohondrija, potrošnje energije i termogeneze (Gesta i sar.,2007; Gómez-Hernández i sar.,2016). UCP-1 omogućava da energija koja se stvara oksigenacijom masnih kiselina, prevashodno se pretvara u toplotnu energiju, a ne u adenzin trifosfat ATP (engl. *adenosine triphosphate*) koji je inače zadužen da uskladišti i transportuje energiju unutar ćelije (Bertholet i sar.,2017).

Beli i mrki adipociti nastaju iz zajedničke mezenhimne ćelije procesom diferencijacije pod dejstvom različitih prekursora. Međutim, sa druge strane, brojni radovi govore i o zajedničkom mezenhimnom poreklu skeletne muskulature i mrkih adipocita jer u njihovoj diferencijaciji učestvuje Myf5+ kao zajednički prekursor (Chechi i sar., 2017; Giralt i sar.,2013). Zbog toga je njihova moć velika u stvaranju toplote, a

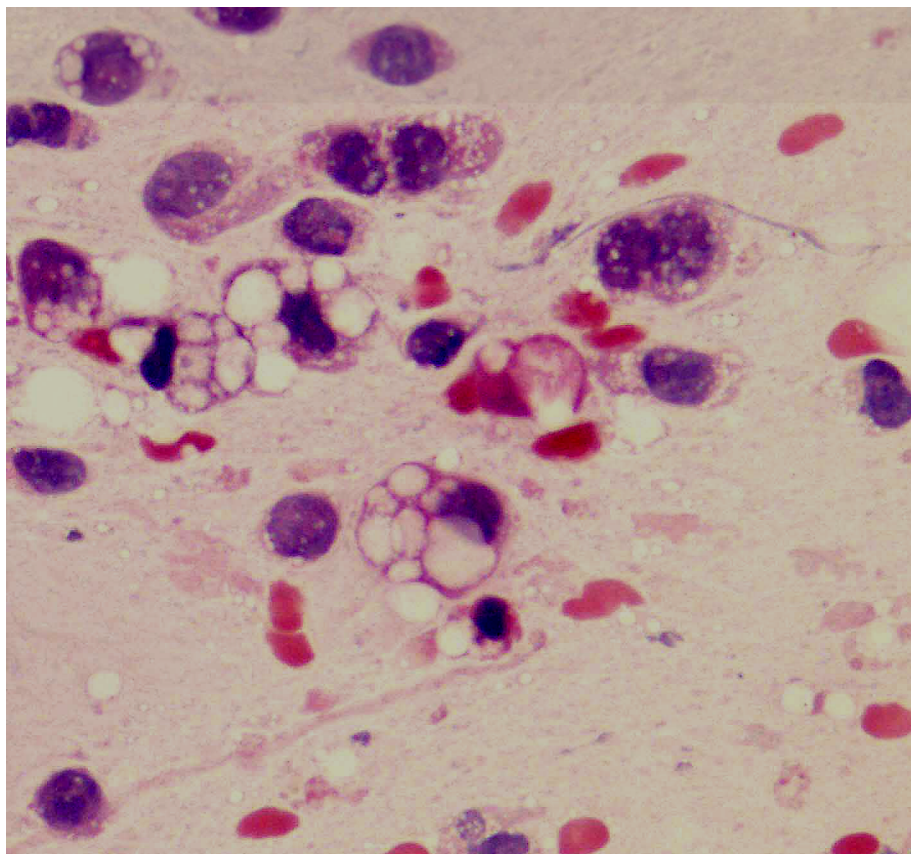
njihova metabolička aktivnost je regulisana od strane simpatičkog nervnog sistema. Mogućnost konverzije odnosno transdiferencijacije bele masne ćelije u mrku vezana je za fizičku aktivnost i dugotrajno izlaganje niskim temperaturama (engl. *browning pocess*) (Lee i sar., 2014; Bertholet i sar., 2017). Pod dejstvom niskih temperatura CNS povećava stimulaciju noradrenergičkih receptora i preko simpatičkog nervnog sistema utiče na konverziju bele masti u mrku. Isto tako pri vrećem fizičkom naporu povećava se sekrecija predkomorskih i komorskih natriuretskih peptida srca (cNPs) koji kao jedan od faktora učestvuju u transformaciji belih u mrke adipocita (Giralt i sar., 2013; Cedikova i sar., 2016) (Slika 1).



Slika 1. Giralt i sar., 2013

1.1.1. Ultrastruktura adipocita belog masnog tkiva

Adipociti belog masnog tkiva su krupne ćelije loptastog oblika dijametra od 50–150 μm . Gusto su raspoređeni u lobulusima masnog tkiva zbog čega imaju najčešće poligonalan oblik. Najveći, centralni deo adipocita zauzima masna kap, dok se na periferiji ćelije nalazi tanak sloj citoplazme sa jedrom i organelama. Citoplazma adipocita je oskudna i periferno postavljena sa manje izraženim endoplazmatiskim retinakulumom i nukleusom lociranim uz plazma membranu ćelije. Na histološkim preparatima obojenim hematoksilin–eozin tehnikom, adipociti se uočavaju se kao svetle ćelije. Razlog tome je što su se prilikom tretmana tkiva za fiksaciju i bojenje lipidne kapi rastvorile i izčezle, a na njihovim mestima je ostala šupljina okružena plazmalemom (Bancroft i sar., 2013). Jedro je najvećim delom euhromatskog tipa, dok se heterohromatin nalazi uz nukleolemu (Mirancea i Mirancea, 2011). Masna kap nije ograničena membranom, a od ostatka citoplazme odvajaju je grupisani intermedijerni (vimentinski) filament. U oskudnoj citoplazmi se nalaze brojne cisterne glatkog, agranuliranog endoplazmatskog retinakuluma i veliki broj mitohondrija. Takođe, zapažaju se klatrinske vezikule što ukazuje na značajnu endocitoznu i transcitoznu aktivnost adipocita. Svaki adipocit je okružen bazalnom laminom, koja se u ovom slučaju naziva eksterna lamina (Gartner i Hiatt, 2014; Mariman i Wang, 2010). Bazalna (eksterna) lamina može se selektivno obojiti PAS (engl. *periodic acid Schiff*) tehnikom, retikulin bojenjem i tehnikama impregnacije srebrom (Lačković i sar., 1984; Japundžić i sar, 1985; Lačković i sar., 1990), kao i drugim histohemijskim i imunohistohemijskim metodama.



Slika 2. Struktura adipocita belog masnog tkiva sa vakuolizacijom citoplazme

1.1.2. Metabolizam adipocita

Adipociti imaju brojne važne uloge, osnovna je održavanje ravnoteže u metabolizmu masti, zatim u homeostazi i neuroendokrinoj regulaciji organizma, zatim predstavlja rezervnu energiju za rad samog organizma (Lewandowska i Zieliński, 2016). Njena histološka građa je relativno jednostavna, ali je funkcija masne ćelije kompleksna i široka. Savremena medicina se bavi visokom značajnošću masne ćelije u većini metaboličkih aktivnosti kroz neuroendokrini potencijal (Bjørbaek i Kahn, 2004; Lord, 2006; Harris i sar., 2014). Shodno tome, adipociti sintetišu hormone i citokine koji sistemskim, parakrinim i autokrinim delovanjem utiču na metabolizam vitamina, glukokortikoida, na termogenezu, imunološki sistem, inflamaciju, reproduktivnu sposobnost, renin-angiotenzin-aldosteron sistem RAAS (engl. *renin-angiotensin-aldosterone system*), zatim na adipogenezu, osteogenezu i hematopoezu, kao i na metabolizam i deponovanje polnih hormona (Chong i sar., 2011; Zhou i sar., 2015; Zepf i sar., 2016; Ross i sar., 2016). Uvećanje samih ćelija u procesu gojaznosti dovodi do njihove disfunkcije i

poremećaja u metabolizmu što prouzrokuje niz funkcionalnih, endokrinih, metaboličkih i kardiovaskularnih poremećaja (Momiyama i sar., 2011; Cao, 2014).

1.1.3. Sekretorna aktivnost adipocita

Masno tkivo je aktivan sekretorni organ, u kome se sintetišu i koji luči veliki broj proteinskih faktora i signalnih molekula. Oni svoja dejstva ispoljavaju u različitim tkivima u organizmu i nazivaju se adipokini (Mariman i sar., 2010). Adipokini imaju veoma važnu ulogu u procesima regulacije metabolizma glukoze, krvnog pritiska, metabolizma lipida i lipoproteina, hemostaze i angiogeneze (Fukuhara i sar., 2005; Chang i sar., 2010; Korah i sar., 2011). Često se za ove molekule koristi zajednički naziv “adipocitokini” iako bi bilo pravilnije da se ovim imenom označavaju samo inflamatorni citokini koje luči masno tkivo. Adipocitokini učestvuju u mnogim fiziološkim procesima i utiču na reproduktivne organe, kosti, mozak, jetru, skeletne mišiće, na krvne sudove i imunološki sistem. Na nastanak gojaznosti, raznih metaboličkih poremećaja-sindroma i razvoj dijabetesa utiču sekretorni produkti kao što su leptin i adiponektin, jer oni između ostalog regulišu unos hrane i ukupnu masu masnog tkiva u organizmu (Chang i sar., 2010; Cao, 2014; Majewska i sar., 2014;)

Sve materije koje sekretuju adipociti belog masnog tkiva mogu se podeliti u sledeće grupe: faktori rasta i angiogeneze, citokini, adhezioni proteini i proteini ekstracelularnog matriksa, hemokini, faktori koji učestvuju u metaboličkim procesima i faktori koji učestvuju u ostalim procesima (Gómez-Hernández i sar., 2016).

Leptin je hormon koji luče adipociti i u direktnom je odnosu sa količinom prisutne masti u organizmu. Deluje na centralni nervni sistem (CNS) i informiše ga o raspoloživim energetske rezervama organizma (Bjørbaek i Kahn, 2004). Insulin, glukokortikoidi, estrogeni, faktor tumorske nekroze alfa TNF- α (engl. *tumor necrosis factor α*) podstiču lučenje leptina, a suprimiraju ga hormon rasta, slobodne masne kiseline FFA (engl. *free fatty acid*), β_3 adrenergička aktivacija i androgeni (Harris i sar., 2014). Receptori za leptin se nalaze i u perifernim tkivima (β -ćelije pankreasa, mišići) i u mozgu (hipotalamus i rombencefalon) (Cohen i sar., 2002; Scott i sar., 2011). U procesu mršavljenja odnosno

gladovanja nivo leptina opada, tada raste apetit i smanjuje se energetska potrošnja. Pored toga što reguliše apetit i energetske potrošnje, učestvuje i u neoangiogenezi, kontroliše vaskularni tonus, utiče na krvni pritisak i moćni je inhibitor osteosinteze. Učestvuje u regulaciji lipogeneze i stimulaciji oksidacije FFA u skeletnim mišićima (Minokoshi i sar., 2002), po strukturi je sličan inflamatornim citokinima i deluje proinflamatorno (Lord, 2006).

Visfatin je adipokin koga proizvodi visceralno masno tkivo VAT i direktno deluje na insulinske receptore imitirajući efekte insulina, učestvuje u regulaciji BMI (engl. *Body Mass Index*) i smanjuje nivo šećera u krvi (Fukuhara i sar., 2005). Ukupni serumski holesterol i stepen insulinske rezistencije (IR) direktno koreliraju sa nivoom visfatina. Visfatin koji se proizvodi iz perivaskularnog masnog tkiva utiče na sam proces arteroskleroze (Wang i sar., 2009; Chang i sar., 2010).

Retinolvezujući protein-4 (engl. *Retinol binding protein-4*) je adipokin koji vrši transport vitamina A u cirkulaciji. Zadužen je takođe za inhibiciju preuzimanje glukoze od strane mišićnih ćelija i povećava glikoneogenezu u jetri (Graham TE i sar., 2006).

Faktor tumorske nekroze α TNF- α (engl. *tumor necrosis factor*) je proinflamatorni citokin koga stvaraju aktivisani makrofagi i adipociti. Slobodne masne kiseline stimulišu proizvodnju TNF- α u makrofagima, a on stimuliše lipolizu u adipocitima i lipogenezu u jetri (Hotamisligil i sar., 1994). Postoje dokazi koji govore o povezanosti nivoa TNF- α sa IR i drugim metaboličkim poremećajima u gojaznosti (Berg i Scherer, 2005; Hivert i sar., 2008).

Interleukin-6 (IL6) proizvode T limfociti i makrofagi, adipociti, osteoblasti i druge ćelije. IL6 u toku mišićne kontrakcije podstiče preuzimanje glukoze, deluje antiinflamatorno i podstiče oksidaciju slobodnih masnih kiselina. Takođe, on je u direktnoj sprezi sa gojaznošću i sa insulinskom rezistencijom (Bastard i sar., 2002; Febbraio i sar., 2002).

Interleukin-10 (IL10) je citokin koji se proizvodi u monocitima i M2 makrofagima. Njegova uloga je u obnavljanju tkiva oštećenog inflamacijom jer on deluje antiinflamatorno. Takođe, on učestvuje u obnovi insulinskih signala narušenih delovanjem TNF α i IL-6 (Acharya i sar., 2015). Direktno utiče na nivo triglicerida, a obrnuto na nivo lipoproteina visoke gustine HDL-holesterola (engl. *high density lipoproteins*) i lipoproteina niske gustine LDL-holesterola (engl. *low density lipoproteins*) (Rosen i Spiegelman, 2014).

Adiponektin je adipokin koga sintetišu adipociti. Njegovim dejstvom na endotel krvnih sudova prevenira se arterosklerozu. Smanjenje njegovog nivoa dovodi do povećanja rizika od infarkta (Ebrahimi-Mamaeghani i sar., 2015).

Inhibitor aktivatora plazminogena 1 PAI1 (engl. *plasminogen activator inhibitor 1*) stvara se u viscelarnom masnom tkivu (VAT), u hepatocitima, trombocitima, endotelnim i mišićnim ćelijama krvnih sudova, inhibiše fibrinolizu, ali ima bitnu ulogu i u aterogenezi, angiogenezi i remodeliranju matriksa masnog tkiva. (Ploplis, 2011; Gómez-Hernández i sar., 2016)

Adipsin je adipokin koji ubrzava resorpciju masnih kiselina, povećava sintezu triglicerida, inhibiše lipolizu iz adipocita, ubrzava transport glukoze u adipocite povećavanjem broja transportnih molekula i stimulacijom sekrecije insulina (Rosen i Spiegelman, 2014; Cao, 2014).

Protein koji stimuliše acilaciju ASP (engl. *acylation-stimulating protein*) je enzim koji pomaže vezivanje estra glicerola sa tri-masnim kiselinama uz pomoć acetil koenzima A u adipocitima odnosno utiče na sintezu triglicerida (Murray I i sar., 1999).

Adipofilin (engl. *adipophilin*) je lipoprotein koji učestvuje u stimulaciji i produkciji lipida u majčinom mleku (Chong i sar., 2011).

Angiotenzinogen i Angiotenzin II hormoni koje sekretuje masna ćelija, a učestvuju u regulaciji krvnog pritiska i u metabolizmu i diferencijaciji masnog tkiva iz lipoblasta u zrele adipocite (Tchkonja i sar., 2010; Gómez-Hernández i sar., 2016).

Apelin je protein koji luče adipociti i deluje na smanjenje krvnog pritiska i ubrzava srčanu pokretljivost (Ross i Pawlina, 2016).

Insulinu sličan faktor rasta 1 IGF-1 (engl. *insulin-like grow factor 1*) je jedan od faktora koji su stimulatori diferencijacije preadipocita u adipocit, stimuliše proliferaciju raznih ćelija i poseduje karakteristike hormona rasta. (Tchkonja i sar., 2010; Cao, 2014; Rosen i Spiegelman, 2014).

Prostaglandini I₂ i F_{2a} (PGI₂, PGF_{2a}) učestvuju u regulaciji zapaljinskog procesa, zgrušavanja krvi, ovulaciji, menstruaciji i sekreciji želudačne kiseline (Mariman i Wang, 2010; Ross i Pawlina, 2016).

Transformišući faktor rasta β , TGF- β (engl. *transforming growth factor β*) učestvuje u regulaciji biološkog ćeliskog odgovora kao što je diferencijacija, apoptosa ili ćeliski razvoj (Rosen i Spiegelman, 2014; Ross i Pawlina, 2016).

Adipociti belog masnog tkiva sekretuju i komponente ekstracelularnog matriksa (ECM), brojne proteine i enzime kao što su kolagen, fibronektin sa jedne strane i sa druge strane 20 različitih enzima matriksa metaloproteinaze MMPs (engl. *matrix metalloproteinase*), koji učestvuju u degradaciji ECM proteina (Nakajima i sar., 1998; Mariman i sar., 2010).

1.1.4. Stroma masnog tkiva

Masno tkivo nije obična i jednostavna tkivna struktura nju grade adipociti i vrlo dinamična stroma (Rodbell, 1966; Rodbell i Jones, 1966). Adipociti sa jedne strane zauzimaju 90% zapremine, a sa druge strane čine samo trećinu ćelijskog sastava masnog tkiva. Masno tkivo sem zrelih adipocita ispunjenih lipidima sadrži i druge neadipocitne ćelije unutar ECM (Mariman i sar., 2010) koje se nazivaju zajedničkim imenom stroma ili stromalna vaskularna frakcija SVF (engl. *stromal vascular fraction*). SVF sačinjavaju heterogene grupe ćelija kao što su endotelne ćelije krvnih sudova, endotelni prekursori, glatko-mišićne ćelije, periciti, ćelije imuno-hematopoeznog porekla - eozinofilni i neutrofilni granulociti, limfociti, monociti, mastociti, B i T limfociti, makrofagi i progenitorske ćelije adipocita ASCs (engl. *adipose tissue-derived stromal cells*) koje pripadaju grupi mezenhimalnih stem ćelija MSC (engl. *mesenchymal stem cells*) (Han i sar., 2010; Trojahn Kølle i sar. 2012; Bourini sar., 2013). Unutar ECM nalaze se i parasimpatička i simpatička nervna vlakna. Simpatička nervna vlakna stimulišu lipolizu preko α_2 -receptora i termogenezu preko β_3 -receptora, a parasimpatička utiču na smanjenje lipolize i poboljšavanje insulinske zavisnosti (Saverio, 2009; Chang i sar., 2010; Rosen i Spiegelman, 2014).

Adipociti i stroma imaju stalan i dinamičan uticaj koji je strogo kontrolisan. Interesantno je da postoji fizička granica za rast adipocita i da tu granicu obezbeđuje sposobnost ćelije da zadrži ECM i spreči njeno pucanje. Tako, na primer, kod gojaznosti dolazi do hipoksije koja vodi ka nestabilnosti ECM koja zatim uvodi ćeliju u apoptozu, povećava se broj makrofaga i samim tim dolazi do inflamatorne reakcije, koja može da bude jedan od puteva nastanka dijabetesa tipa II (Mariman i Wang, 2010; Rosen i Spiegelman, 2014). Zreli adipocit potroši dosta energije na održavanje energetskeg balansa ECM u kome učestvuje i insulin. Takođe, smatra se da ECM ima značajnu ulogu u pretvaranju preadipocita u zreli adipocit. Specifični proteini ECM kao što su proteoglikani, fibrozni proteini, kolagen tip I-VI, laminin i fibronektin učestvuju kako u stvaranju i održavanju basalne lamine tako i u mnogim metaboličkim i gradivnim procesima same ćelije (Nakajima i sar., 1998).

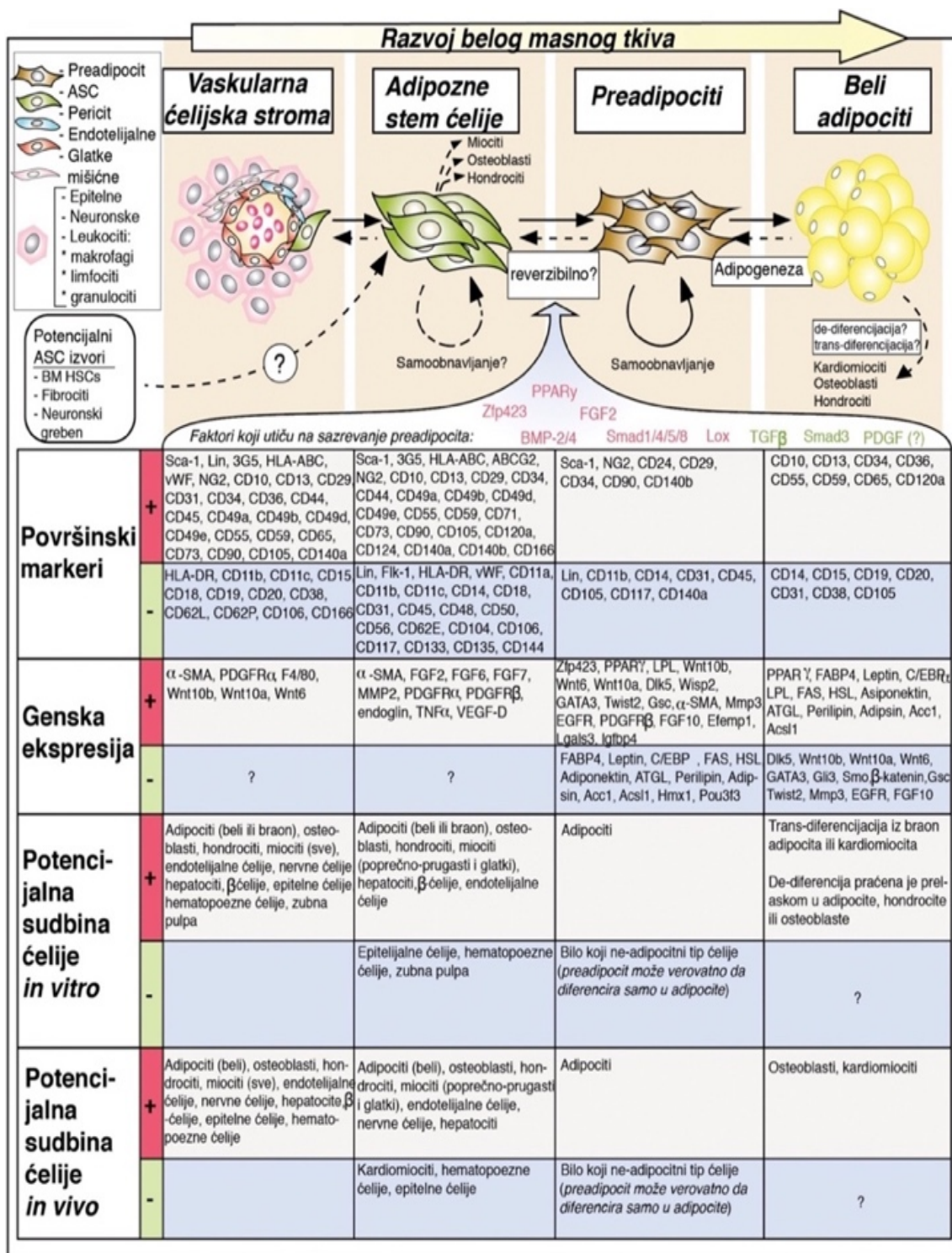
1.1.5. Embriolonalni razvoj masnog tkiva

U trećoj gestacionoj nedelji se formira trilaminarni embrion koji sadrži tri germinativna sloja: ektoderm, mezoderm i endoderm. Od njih dalje se razvijaju sva tkiva i organi. Središnji germinativni sloj se naziva mezoderm iz njega se diferenciraju delovi mezoderma-somiti: kranijalni, paraksijalni, intramedijalni i lateralni. Masno tkivo se prvi put formira u drugom mesecu embrionalnog razvoja od paraksijalnog mezoderma. Takođe, od njega nastaju i mišići glave, poprečno-prugasti mišići trupa i udova, dermis kože, vezivno tkivo i hrskavice (Saga i Takeda, 2001).

Nedovoljno je poznat sam proces diferencijacije masnog tkiva iz embrionalnih stem ćelija. Iako se ne zna tačan put diferencijacije između embrionalnih, menzenhimalnih matičnih ćelija i zrelih adipocita, detektovano je dosta faktora u samom lancu diferencijacije. Brojna istraživanja govore da po dejstvom fibroblastnog faktora rasta FGF (engl. *fibroblast grow factors*), koštanog morfogeničnog proteina BMP (engl. *bone morphogenic proteins*) i porodice beskrilnog proteina Wnt (engl. *wingless protein*) embrionalne matične ćelije se diferenciraju u mezenhimne matične ćeliju. Dalja diferencijacija ide u pravcu razvoja osteoblasta, lipopoblasta i mioblasta, određena je kaskadnim prenosom signala, genskom aktivacijom i sekrecijom proteina koji učestvuju u samom sazrevanju ćelije. (Gesta i sar., 2007; Cawthorn i sar., 2012). Diferencijacija

preadipocita u adipocit je praćena signalnim putevima aktivacije masnih kiselina, IGF-1, glikokortikoidima i drugim kaskadnim stimulatorima, faktorima koji su dužni da obezbede nastanak i sazrevanje adipocita. Dva najznaćajnija transkripciona faktora ćije uzajamno dejstvo ima ključnu ulogu u procesu diferencijacije su jedarni receptor PPAR γ (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) i ćlanovi porodice proteina koji poboljšavaju vezivanja C/EBP (engl. *enhancer-binding protein*) kao što su (C/EBP α C/EBP β C/EBP δ C/EBP γ i CHOP) (El Jack i sar., 1999; Farmer, 2006).

PPAR γ pod dejstvom gena *Pparg* generiše se u PPAR γ 1 i PPAR γ 2, od kojih PPAR γ 2 ima funkciju u završnoj fazi pretvaranja preadipocita u zreli adipocit. C/EBP proteini takoće se kaskadno ukljućuju u samu diferencijaciju mezenhimalne ćelije u adipocit prevashodnim ukljućivanjem C/EBP β i C/EBP δ koji deluju na ekspresiju gena za C/EBP α i koji sa PPAR γ 2 zajedno uvode preadipocit u završnu diferencijacije. (Gesta i sar.,2007; Giralt i sar., 2013). PPAR γ je najspecifićniji u masnom tkivu, tako da ukoliko bi došlo do ektopiće ekspresije PPAR γ u procesu diferencijacije fibroblasta, on bi ušao u proces adipogeneze. Aktivatori PPAR γ mogu indukovati adipocitnu diferencijaciju iz preadipocita, mioblasta i multipotentnih matićnih ćelija (Teboul i sar., 1995; Tong i sar., 2005). Takoće, smatra se da je C/EBP α u najvećoj meri zastupljen u masnom tkivu i da je on jedan od odlujućućih faktora završnoj fenotipskoj diferencijaciji adipocita. (Tontonz i sar, 1995).



Slika 3. Regulacija diferencijacije mezenhimalne matične ćelije
(adaptirano iz: Cawthorn WP i sar., 2012)

1.1.5.1. Matične ćelije masnog tkiva

Najintezivnija istraživanja u polju regenerativne medicine idu u smeru diferenciranja i nastanka pojedinih ćelija koje imaju sposobnost regeneracije (Mazzola i sar., 2011). Poznato je da postoje totipotentne ćelije, pluripotentne i multipotentne matične ćelije. Totipotentne matične ćelije koje se stvaraju još u doba blastociste imaju potencijal diferencijacije u većinu ljudskih ćelija, uključujući i embrionalne matične ćelije hESC (engl. *human embryonic stem cells*) (Kang i sar., 2010). Pluripotentne ćelije mogu se diferencirati u sve ćeliske linije ektoderma, mezoderma i endoderma. Multipotentne ćelije se mogu diferencirati samo u određene ćeliske linije koje iz istog germinativnog sloja. Zbog svojih sposobnosti nazvane su menzehimalne matične ćelije MSC (engl. *mesenchymal stem cells*) (Zuk i sar., 2001; Mazzola i sar., 2011). One su prisutne kod odraslog čoveka i pomažu u reparaciji i samo-regeneraciji tkiva. Otkrivene su 1960 godine u koštanoj srži, a nakon toga su pronađena u mnogim drugim tkivima, kao što je dentalna pulpa, amnionska tečnost, placenta, pupčanik, u perifernoj krvi ili masnom tkivu (Friedenstein i sar., 1968; Tsuji i sar., 2014).

Izdvajanje menzehimalnih matičnih ćelija iz masnog tkiva (Coleman, 2001) otvorilo je novo poglavlje u regenerativnoj medicini, zbog svoje lake dostupnosti i minimalnog morbiditeta. Shodno tome istraživanja su mnogostruko rasla i te ćelije su nazivane različitim imenima *adipose derived stem/stromal cells (ASCs)*, *adipose-derived adult stem (ADAS) cells*, *adipose-derived stromal cells (ADSCs)*, *adipose stromal cells (ASCs)*, *adipose mesenchymal stem cells (AdMSCs)*, *fibroblast-like cells*, *lipoblast*, *pericyte*, *preadipocyte*, and *processed lipoaspirate (PLA) cells*. (Gimble i sar., 2007; Tsuji i sar., 2014). Međunarodno udruženje za tehnologiju primenjivanja masti je 2004 god. donelo konsenzus o usvajanju jedinstvene skraćenice za matične ćelije izolovane iz masnog tkiva *ASCs* (Zuk i sar., 2001; Gimble i sar., 2007; Tsuji i sar., 2014). Matične ćelije izolovane iz masnog tkiva –ASCs imaju ogroman reparatorni potencijal, ne samo u okviru masnog tkiva nego i u okviru svih ćeliskih linija mezodermalnog porekla (Cawthorn i sar., 2012). One se nalaze u SVF zajedno sa endotelnim ćelijama, endotelnim progenitorskim ćelijama, pericitima, glatkim-mišićnim ćelijama, eritrocitima, monocitima, makrofazima, leukocitima, limfocitima (Han i sar., 2010; Tsuji i sar., 2014).

Postupak izdvajanje SVF iz masnog tkiva se obavlja mućkanjem na 37 stepeni uz pomoć enzimске digestije sa 0,1% kolagenazom u fosfatnom buferu (PBS). Da bi se neutralizovala kolagenaza koristi se DMEM (enlg. Dulbecco's modified Eagle medium) sa 10% fetalnim goveđim serumom. Neophodno je izdvojiti zrele adipocite od vezivnog tkiva, tako da se izdvojeni pelat centrifugira i filtrira, a nakon toga se ponovo resuspenduje buferom koji lizira eritrocite i inkubira se na sobnoj temperaturi. Za izdvajanja SVF pelat se ponovo centrifugira i resuspenduje sa PBS. Čeliski pelat koji je ostao na dnu je SVF, koja sadrži heterogene ćelije uključujući i menzehimalne matične ćelije (Li i sar., 2013).

Mezenhimne matične ćelije su prisutne u svim tkivima, one imaju trofičan, antiinflamatorni i imunosupresorni efekat na oštećeno tkivo. One oslobađaju medijatore koji deluju parakrino na okolno tkivo i stimulišu regeneraciju i reparaciju tkiva. (Prockop i sar., 2010). Njihova sposobnost multipotentosti i diferencijacije se može koristiti u tarapeutske svrhe sa jedne strane, a sa druge strane mogu da dovedu i do nepravilne diferencijacije, kalcifikacije i razvitka abnormalnog tumorskog tkiva. Samim tim, što imaju sposobnost imunosupresije i tumorogeneze podržane prisustvom sekretornih faktora adipocita kao što su TNF- α , TGF- β kao i stumulacija neoangiogeneze sekrecijom vaskularno endotelnog faktora rasta VEGF (enlg. *vascular endothelial growth factor*), daje dovoljno mogućnosti da se stavovi ne usaglašavaju i još uvek nisu dovoljno konzistentni o mogućim beneficijama matičnih ćelija ili pak njihovoj potencijalnoj opasnosti (Cawthorn i sar., 2012; Zuk i sar., 2013). Pojedini istraživači i studije govore o transdiferencijaciji zrelih adipocita u druge ćeliske tipove sto predstavlja kontraverzno tumačenje samih potencijala masnog tkiva. Tako na primer dejstvom inhibitora BMP-a ili singalom Wnt proteina in vitro može se zreli adipocit diferentovati u kardiomiocit (Gesta i sar., 2007). Takođe, pod dejstvom hronične hladnoće uz pomoć antagoniste adenoreceptora β_3 , beli adipocit se može transdiferentovati u mrki adipocit (Jumabay i sar., 2010). Mogućnost transformacije adipocita se ogleda i u tome da prilikom gubitka masne kapljice on ima fibroblastu sličnu morfologiju (Matsumoto i sar., 2008).

Međunarodno udruženje za ćelisku terapiju ISCT (enlg. *International Society of Cellular Therapy*) predložilo je da kao minimalni dokaz postojanja matičnih ćelija bude ekspresija specifičnog površinskog antigena CD (enlg. *Cluster of Differentiation*) i to CD73, CD 90 i CD105 zajedno i sa istovremenim odsustvom hematopoeznih markera CD34,

CD45,CD14,CD11b,CD79 α i HLA-DR. Slabo diferentovane perivaskularne ćelije adventicije-periciti imaju odsustvo CD31-/CD34-. U daljoj diferencijaciji i pojavljivanjem vaskularnog endotela prisustvo CD34+ kao i odsustvo CD31- markera govori o neovaskularizaciji i napredovanju kaskadnog procesa sazrevanja i diferencijacije preadipocita u adipocite (Gimble i sar., 2007; Li i sar., 2011; Trojahn Kølle i sar., 2012). Najveći broj istraživanja pokazuje multipotentnost adipoznih matičnih ćelija (ASCs) koji su produkt vaskularne strome masnog tkiva. Naročito, zadnja dekada je obeležila veliki broj istraživanja koja govore o prisutnosti adipocitnih matičnih ćelija u vaskularnoj stromi i to u pericitima odnosno perivaskularnim ćelijama. Periciti učestvuju kako u stvaranju endotelnih ćelija tako i u vaskularnoj kontraktibilnosti (Crisan i sar., 2008). Shodno tome postoji vrlo bliska korelacija između adipocitnih i vaskularnih progenitora. Samo činjenica da periciti na sebi imaju ekspresiju CD 34 antigena, a nemaju ekspresiju CD31 antigena govori u prilog tome da i adipociti i endotelne ćelije imaju zajedničkog pretka. (Li, 2011). Takođe, u procesu regeneracije u SVF prisutna je ekspresija receptora PPAR γ i C/EBP α kao i pericitni marker α -SMA, receptora trombocitnog faktora rasta β (PDGFR- β) i hondroitin sulfat proteoglikan (NG2) koji deluju na slabo diferentovane perivaskularne ćelije adventicije i stimulišu nastanak adipocita (Gesta i sar., 2007; Crisan i sar., 2008; Salgado i sar., 2010; Cawthorn i sar., 2012).

Proces regeneracije se obavlja kroz sekreciju brojnih faktora, jedna od specifičnosti je da se u adipocitu vrši i sekrecija i mnogobrojnih faktora rasta kao što su osnovni fibroblastni faktor rasta bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*), vaskularni endotelni faktor rasta VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), trombocitni faktor rasta PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*), epidermalni faktor rasta EGF (engl. *epidermal growth factor*), nalik insulinu faktor rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*), hepatocitni faktori rasta HGF (engl. *hepatocyte growth factors*), transformišući faktor rasta β 1 TGF β 1 (engl. *transforming growth factor*), nervni faktor rasta NGF (engl. *nerve growth factor*). Trombocitni faktor rasta - PDGF stimuliše ćelisku replikaciju, poboljšava angiogenezu, epitelizaciju, stvaranje granulacionog tkiva. Epidermalni faktor rasta - EGF učestvuje u ćeliskoj diferencijaciji i stimuliše repitelizaciju-epitelijalnu i mezenhimnu mitogenezu, angiogenezu i reguliše sekreciju enzima kolagenaze. Vaskularni endotelni faktor rasta - VEGF, hepatocitni faktori rasta HGF i osnovni fibroblastni faktor rasta bFGF luče adipociti u trenucima hipoksije. VEGF stimuliše proliferaciju vaskularnih elemenata i omogućava

revaskularizaciju ishemičnog tkiva. Primećeno je da kod oštećenja ECM dolazi do pojačanog izlučivanja bFGF ili pri krvarenju se iz trombocita oslobađa PDGFR- β (Li i sar., 2013; Tsui i sar., 2014; Gómez-Hernández i sar., 2016). ASCs poseduju jedinstvene parakrine osobine stimulišući proces sekrecije faktora rasta koji omogućavaju ćelisku regeneraciju.

1.2. Mehanizam regulacije telesne težine

Funkcionisanje i količina masnog tkiva je u direktnoj sprezi sa centralnim nervnim sistemom, digestivnim trahtom i hormonskim statusom. Kada govorimo o regulaciji količine masnog tkiva možemo da podelimo na:

A. kratkotrajnu regulaciju težine

B. dugotrajnu regulaciju težine.

A. Kratkotrajna regulacija težine je vezana za dnevne potrebe, ishranu i aktivnosti. U kratkotrajnoj regulaciji glavnu ulogu igraju mali peptidi koje luči gastrointestinalni trakt kao što su Ghrelin kao stimulator apetita i YY peptid (*peptide tyrosine tyrosine* PYY) kao supresor apetita (Zac-Varghese i sar., 2014). Ghrelin luče epitelijalne ćelije želuca, lako prolazi moždanu barijeru i deluje na hipotalamus koji povećava osećaj gladi. Crevne resice luče YY peptid, mali crevni hormon i on ima glavni u gubitku kilograma na taj način što pravi osećaj sitosti odmah po unošenju male količine hrane. Takođe prolaskom kroz moždanu barijeru deluje na hipotalamus i vrši supresiju apetita. (Chen i sar., 2012; Ross i Pawlina, 2016)

B. Dugotrajna regulacija se ogleda u kontroli apetita i metabolizmu na mesečnom ili godišnjem nivou. Za dugoročnu regulaciju telesne mase direktno su zaduženi hormoni leptin i insulin. Gen za leptin nalazi se na RNK lancu kao masni specifični mesindžer (iRNK) i značajno učestvuje u homeostazi energije (Bjørbaek i Kahn, 2014; Harris i sar., 2014). Primećeno je kod bolesti *anorexia nervosa* da je nivo iRNK dosta smanjen. U slučajevima gladovanja iRNK se aktivira da ne bi došlo do naglog gubitka telesne mase. Insulin kao hormon pankreasa reguliše nivo šećera u krvi ali je takođe uključen u metabolizam masnog tkiva tako što pretvara glukozu u trigliceride. Leptin i insulin deluju preko hipotalamusa i utiču na regulaciju telesne mase ali za razliku od leptina, insulin

utiče i na stvaranje adipocita. Jedna od najvažnijih funkcija adipocita je preuzimanje masnih kiselina i pretvaranje u trigliceride unutar masne ćelije. Pod nervnim ili hormonskim dejstvom dolazi do razlaganja triglicerida u glicerol i slobodne masne kiseline. Slobodne masne kiseline prolaze kroz membranu adipocita i ulazi u krvne sudove, vezuju se za proteinski nosač albumin i odlazi u druge ćelije koje zahtevaju energiju. Nervna aktivacija je važna u periodu smrzavanja ili gladovanja. U početku mast se čuva, a zatim putem simpatikusa aktivira se oslobađenje noradrenalina koji aktivira niz metaboličkih koraka za aktiviranje lipaze. Ovaj enzim rastvara trigliceride koji su 90% prisutni u adipocitu. Hormonska aktivacija uključuje hormone i enzime zajedno kao što su insulin, tiroidni hormoni i hormoni nadbubrežne žlezde. Insulin je važan za lipidnu sintezu, on stimuliše enzime za sintezu lipida (*synthase* masne kiseline, *acetyl-CoA carboxylase*) i vrši supresiju lipolize, inhibiranjem hormona-sensitive lipase koja blokira oslobađanje masnih kiselina. Glukagon kao drugi hormon pankreasa i hormoni rasta koje sekretuje pituitarna žlezda, povećavaju lipolizu, oni dodatno povećavaju i nivo faktora tumorske nekroze TNF- α koji utiče na razvijanje IR koja je povezana sa gojaznošću i dijabetesom (Saga i Takeda, 2001; Cohen i sar., 2002; Graham i sar., 2006).

Kod odraslih se na godišnjem nivou obnovi 10% adipocita. Uvećan unos hrane sa većim energetske svojstvima, ne dovodi do hiperplazija adipocita već postojeći adipociti hipertrofišu što vodi ka gojaznosti (Spalding i sar., 2008).

1.3. Značaj masnog tkiva u plastičnoj hirurgiji

Masno tkivo kao vezivno-strukturalni deo tela predstavlja zaštitni sloj tela smešten u delu između kože i mišićno-tetivnih struktura sa jedne strane i sa druge strane oko unutrašnjih organa i vitalnih struktura, omogućavajući amortizaciju organa u trenucima povređivanja. S'toga sama rekonstrukcija ovog tkiva je značajna pri njegovom povređivanju i narušavanju kako kontinuiteta tako i same celine. Masno tkivo po svom volumenu i mekoći je našlo široku primenu u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji za nadomešćivanje meko tkivnih defekata, zatvaranje "mrtvih" prostora i predstavlja jako dobro *interface* tkivo. Bez obzira na njene komparativne prednosti, zbog neuspešnih transplantacija, javila se potreba za alternativnim augmentacionim materijalima.

1.3.1. Rekonstruktivni materijali u plastičnoj hirurgiji

1.3.1.1. Aloplastični materijali

Glavna ograničenost i nepredvidljivost resorpcije transplantiranog masnog tkiva, čiji procenat resorpcije iznosi od 25%-80%, verovatno kao rezultat ishemije i slabe neoangiogeneze (Forte i sar., 2017), vodio je u pravcu da se razmišlja o korišćenju raznih aloplastičnih materijala u plastičnoj i rekonstruktivnoj hirurgiji. Defekti koji su nastali prilikom trauma, otklanjanja tumora ili genetskim nasleđem bilo ih je neophodno rekonstruisati. Krajem 19-tog veka lekari su koristili razne materijale za nadoknadu tkiva kao što su slonovača, gume, staklene lopte, hrskavice, silastične gume ili teflonsko-silikonske proteze. Robert Gersuny eksperimentisao je sa parafinskim injekcijama, koje su direktno injektirane u meko-tkivni defekt, što se završavalo nekrozom tkiva, amputacijama i raznim unakaženjima (Czerny, 1895).

Početakom 50-tih godina dvadesetog veka, hirurzi su počeli da ubrizgavaju tečni silikon u grudi. Neposredno nakon injektiranja u dojke su se stvarala otvrdnuća i granulomi, a problemi koji su nastajali najčešće su rešavani mastektomijom (Anderson, 1997). Američki plastični hirurzi Thomas Cronin i Frank Gerow (1961) registruju prvi put inkapsularni silikonski implantat za grudi kao medicinsko sredstvo (Cronin i sar., 1963). Međutim, zbog slabosti same ovojnice implantati su pucali, silikon se izlivaao i narušavao parenhim dojke. Bilo je neophodno zabraniti dalju upotrebu ovakvih implantanata. Za rekonstrukciju defekta na glavi i telu hirurzi Radovan, Austand i Rose (1975), osmišljavaju silikonski ekspander koji se punjava fiziološkim rastvorom, ekpanzijom tkiva su stvarali višak kože, kojom je bila omogućena rekonstrukcija većih defekata (Austad i Rose, 1982). Paralelno sa njima Glitzenstain za potrebe defekata i deformiteta na potkolenicama, nastalih usled mišićne distrofije, ugrađuje silikonski implantat iznad *m. gastrocnemius*-a (Glitzenstein, 1979).

Organizam oko svakog stranog tela formira fibroznu-kolagenu ovojnicu kao deo zapaljenskog procesa, koja ujedno predstavlja i kapsulu implantanta. Tako da sa razvojem aloplastičnih materijala, pojavile su se i komplikacije kao što su rupure implantanata, curenja silikonskog gela, kapsularne kontrakture. Usavršavanje proizvoda u smislu

bezbednijih implantanata, koji neće ispuštati silikonske molekule i koji će imati manje postoperativnih komplikacija postalo je ultimativno za savremenu industriju. Radi smanjenja broja kapsularnih kontraktura zahtevalo se za boljom i biokompatibilnijom ovojnicom implantanata (Sowa i sar., 2017).

Implantati kao aloplastični materijali su strogo ograničeni na pojedine delove tela ili mišićne grupe. Umetanjem implantanata dolazi do ekspanzije kože i mišića, a samim tim i do značajnijeg istanjivanja pokrivača, hipotrofije tkiva, mogućnosti pipanja ivica proteza ili vidljivosti nabora na samoj površini kože (Cherry i sar., 1983). Ponašanje aloplastičnih materijala zavisilo je od kvaliteta tkiva, stepena defekta, vaskularizacije i same reakcije tkiva na implantat. Implantat može da se dislocira, pukne, da formira kasularnu kontrakturu, koja završava sa uklanjanjem samog implantanta (Von Szalay, 1985). Rekonstrukcija implantantima često i nije moguća zbog nedovoljno razvijenog tkiva ili neadekvatnog tkivnog pokrivača na primer kod završenog procesa lečenja nakon mastektomije (Panettiere i sar., 2011). Ugradnja implantanata je limitirana i uslovljena koštanom strukturom, kvalitetom muskulature i kožnog pokrivača. Zbog toga se javila potreba za povratak autoloških materijala i za usavršavanjem tehnika transfera masnog tkiva kao i obezbeđivanje njegovog boljeg preživljavanja.

1.3.1.2. Masno tkivo kao rekonstruktivni material u plastičnoj hirurgiji

Prvi pokušaji transplantacije masnog tkiva bili su neuspešni (Neuber 1893) ali se od nje nikada nije odustajalo. Značajnost ove tehnike je znatno porasla kada je Lexer (1922) dokumentovao preživljavanja transplantirane masti nakon tri godine. Mast, kao dobro vaskularizovano tkivo, može da se koristiti kao transplantirani slobodni graft, kompozitni graft dermisa i adipoznog tkiva ili kao slobodni mikrovaskularni graft. Iako su rani pokušaji u 19. veku bili neuspešni u transplantaciji kompozitnog dermo-adipoznog grafta, Montgomery i Pierce (1963) uspešno su ga upotrebili za zatvaranje “mrtvog” prostora nastalog nakon uklanjanja frontalnog sinusa (Montgomery i Pierce, 1963). U ranim osamdesetim 20. veka Smith i Peer su široko primenjivali ovaj graft za rešavanje brojnih mekotkivnih nedostataka na licu. Najčešće su uzimali kompozit graft dermisa i adipoznog tkiva iz prepone, spoljašnjeg glutealnog regiona ili glutealne brazde.

Morbiditet ragije je bio beznačajan u odnosu na rezultat rekonstrukcije. Tkivo je uzimano u komadu i uvek su pravili 50% “*over-korekciju*”, jer su smatrali da transplantirano tkivo toliko izgubi na volumenu u procesu preživljavanja u recipijentnoj regiji (Smith B i sar., 1983). Kod operacija lumbalnog dela kičme Brayant i Bremer (1983) su sa slobodnim masnim transplantatom pokrivali ogoljenu *duru mater* radi sprečavanja prodiranja ožiljka u spinalni kanal. Delovi tkiva koji su uzimani bili su veličine od 1cm, a na CT su identifikovani znaci vitalnosti i da je masni graft preživeo u recipijentnoj regiji. Mc Clean i Bunke (1972) su publikovali tehniku korišćenja *Omentum*-a kao slobodnog mikrovaskularnog režanja za rekonstrukciju lica i poglavine.

Otvaranje jednog novog poglavlja početkom osamdestih označio je razvoj tehnike standardne liposukcije, koja je korišćena za uklanjanje viška masnih naslaga i preoblikovanje tela. Ovu značajnu tehniku koja je ponovo otvorila vrata transplantacijama masnih ćelija je popularizovao Illouz (1983), francuski plastični hirurg (Illouz YG, 1983).

Razvoj tehnika liposukcije vodilo je ka oblikovanju prvih kanila, dat je značaj veličini njenih otvora, definisala se jačina vakuma, govorilo se o značaju prerade i pripreme masnog tkiva za transplantaciju i sve je to ukazivalo na veliki značaj ovog autolognog transplantata u rekonstruktivnoj hirurgiji (Coleman SR, 1995). Značajnost razvoja ove tehnike ukazuje i da je sama procedura znatno jeftinija od ostalih rekonstruktivnih tehnika implantatima ili autolognim reznjevima (Hall i Heffelfinger, 2015). Često, kada su rekonstrukcije implantatima neuspešne ili je rekonstrukcija lokalnim autolognim tkivom kontraindikovana, ne postoji ni jedna druga mogućnost sem transfera sopstvenog masnog tkiva u određeni region tela ili lica (Clauser i sar., 2014). Procedura je jednostavna i za pacijenta i za hirurga, zbog svoje lake dostupnosti u većim količinama, mogućnosti lake implantacije u sve delove tela, biološke kompatibilnosti, niskog antigenskog potencijala, kao i minimalnog donorskog morbiditeta (Coleman, 2001).

Nakon davanja intramuskularnih injekcija Penicilina sa benzil alkoholom kao rastvaračem deci u Kini 1980 godine, usledila je kontraktura glutealnog mišića sa degeneracijom, nekrozom i fibrozom glutealnog mišića i facije. Defekt koji su se pojavili kod dece, jednostavno su rešeni autolognim transferom masti (Wang i sar., 2013).

Pojedine urođene anomalije lica kao što je Parry-Romberg sindrom sa hemifacijalnom atrofijom ili skleroderma, ožiljci zadobijeni od operacija ili opekotina

rešavaju se autolognim masnim tkivom sa prirodnim i dugoročno dobrim rezultatima (Consorti i sar., 2012; Clauser i sar., 2014).

Svoja regenerativna svojstva i svoju primenu masne ćelije su pokazale u rekonstruktivnoj hirurgiji dojke koje su zračene nakon mastektomija. Ožiljci su pokazali bolji kvalitet, koža je postala mekša i voluminoznija. Međutim zbog otežanog praćenja postoperativnog recidiva, formiranja cisti, kalcifikacija i svih drugih radiografskih promena Američko udruženje plastičnih hirurga je 1987 god. zabranilo upotrebu autolognog masnog tkiva kod ženskih dojki (Report, 1987).

Usledila su brojna istraživanja koja bi omogućila bezbedniji transfer masti sa manjim postoperativnim komplikacijama, tako da je Coleman razvio novi koncept i standardizovao tehniku uzimanja, obrađivanja i transplantacije autolognog masnog tkiva (Coleman, 1995; Coleman, 2004). Nakon toga transfer masti je počeo široko da se koristi u neurologiji, ortopediji, ginekologiji, ORL, maksilofacijalnoj, grudnoj, a najšire u plastičnoj hirurgiji (Claro i sar., 2012). Najveći problemi bili su kako da se obezbedi njegovo preživljavanje sa jedne strane, a sa druge kako iskoristiti njegov potencijal multipotentosti i omogućiti reparaciju ili regeneraciju tkiva (Tabit, 2012; Mojallal, 2008). Počelo je da se široko diskutuje o načinu uzimanja masti, veličini kanila, veličini otvora na kanilama, jačini vakuma, zatim o načinu transfera, obradi i načinu injektiranja masti (Clauser i sar., 2014; Li i sar., 2013; Claro i sar., 2012; Tabit i sar., 2012; Mazzola i sar., 2011; Han i sar., 2010; Matsumoto i sar., 2008; Coleman, 2001). Međutim, definisanje dokaza o samom preživljavanju masti u recipijentnoj regiji ili pak utvrđivanje njegovog reparatornog potencijala ostaje i dalje kontraverzno pitanje. Mnogi pokušavaju da na razne načine dokažu prisutvo preživelih adipocita počevši od najstandardnijih metoda kao što su cirkumferentno merenje recipijentne regije i uporedne fotografije pre i posle popunjavanja. Uključuju se i pomoćne dijagnostičke metode skenera, ultrazvuka MRI, merenje promene težine Arhimedovim zakonom, termoplastični kalupi – trodimenzionalna volumetrija i sl. (Herold i sar., 2013; Clauser i sar., 2014), a sve u cilju određivanje idealne količine i kvaliteta masnog tkiva koji bi dao zadovoljavajući estetski rezultat. Masno tkivo kao potencijalni idealni augmentacioni material sa prisutnim regenerativnim potencijalom u svojoj vaskularnoj stromi (SVF) sve više postaje centar interesa raznih naučnih i kliničkih ispitivanja i sve više nade se polaže u mogućnost rešavanja brojnih funkcionalnih i estetskih nedostataka (Gimble i sar., 2007). Defekti nastali usled nedovoljne razvijenost jedne noge

prouzrokovana poliomijelitisom ili vaskularnim intrauterinim malformacijama zahteva izjednačavanje noge celom dužinom cirkumferentno (Slika 4.).



Slika 4. Pacijent oboleo od poliomijelitisa podebljavanje leve noge i predeo gluteusa levo pre i 12 meseci posle operacije

Shodno da implantat može da uveća samo srednji deo lista ili unutrašnji deo butine, autologna mast predstavlja jedini biokompatibilni materijal koji sem mogućnosti uvećanja mekog tkiva ima mogućnost i da poboljša vaskularizaciju i kvalitet kože. Tako da je primena autologne masti našla sebi odgovarajuće mesto u popunjavanju i preoblikovanja nogu i potkolenica (Skorobac Asanin i Sopta, 2017; Mundinger i Vogel, 2016; Hoppmann i sar., 2013; Mojallal i sar., 2008). Da bi se postigao zadovoljavajući izgled, neophodno je antropološki analizirati oblik nogu i napraviti sklad sa ostalim delom tela. Definisane idealne proporcije potkolenica, njihove debljine, dužine zakrivljenosti medijalne i lateralne, prednje i zadnje linije je matematički precizno definisana u detaljnim analizama Cuenca-Guerra (Cuenca-Guerra i sar., 2009), što ujedno daje osnovu operativnog planiranja uvećanja potkolenica u skladu sa vrstom hipoplazije. Na osnovu matematičkih proračuna odnosa centralne ose potkolenice sa prednjom i zadnjom linijom, kao i centralne ose potkolenice sa medijalnom i lateralnom linijom, izračunato je da su oni u odnosu 1:1.618. Na osnovu ovih proračuna deformiteti potkolenica su podeljeni u pet grupa.

Tip I - medijalna hipoplazija, slaba razvijenost *m. soleus-a* i medijalne glave *m. gastrocnemius-a*.

Tip II - lateralna hipoplazija, slaba razvijenost *m. soleus-a* i lateralne glave *m. gastrocnemius-a*.

Tip III- posteriorna hipoplazija slabo razvijen *m. soleus* i *m. gastrocnemius* što rezultira slabim konveksitetom zadnje strane lista.

Tip IV- hipolazija sa sve tri strane (tubularna potkolenica) kao posledica slabije razvijenosti *m. gastrocnemius-a*, *m. soleus-a*, *m. flexor digitorum longus-a* i *m. peroneus-a*.

Tip V- kongenitalni deformiteti

Von Szalay govori o idealnom obimu najšireg dela lista koji je u opsegu od 33-36cm (Von Szalay, 1985) ili Benslimane koji govori u uglovima koju zauzima centralna osa *tibiae* u odnosu na centralnu osu *femura* (Benslimane, 2012). Definisane antropološke mere predstavljaju osnovu za dalje fino oblikovanje koje u mnogome zavisi i od umetničkog oka hirurga. Oblik nogu je definisan položajem centralne ose potkolenice u odnosu na natkolenicu, debljine *m. soleus-a*, lateralne i medijane glave *m. gastrocnemius-a* i prisustva i raspodele potkožne masti (Tsai i sar., 2000).

Imajući u vidu velike potencijale autologne transplantacije masti, njen potencijalno regenerativni potencijal za regiju transplantacije, a posebno potrebu za njenom sve frekventnijom augmentacionom primenom, ne samo u plastičnoj, već i u rekonstruktivnoj hirurgiji bilo bi od značaja dodatno ispitati njenu ulogu i potencijal u rekonstrukciji regije potkolenica. Takva istraživanja bi bila od posebnog značaja, imajući u vidu da su dosadašnje studije ne samo malobrojne, već i da nedovoljno sistematično ispituju navedenu oblast koristeći se malim brojem pacijenata, a bez uvođenja kompletne komplementarne procene koja uključuje histološku procenu, savremene tehnike vizualizacije, a pre svega klinički, aplikativni i praktični aspekt koji je od dominantnog značaja za lekare hirurge, a prevashosno za njihove pacijente.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati preoperativno i postoperativno morfološke i volumetrijske karakteristike recipijentnog tkiva primenom MRI.
2. Ispitati preoperativno strukturu donorskog masnog tkiva histološkom i imunohistochemijskom analizom subkutano aspirirane masti iz donorskog regiona.
3. Uporediti preoperativne i postoperativne morfološke i volumetrijske karakteristike recipijentnog tkiva.
4. Ispitati postoperativno strukturu subkutano transplantiranih adipocita histološkom i imunohistochemijskom analizom i uporediti histološke karakteristike sa nalazima pre transplantacije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Tip studije

Ispitivanje predstavlja studiju preseka u kojoj je analizirana promene obima potkolenice nakon augmentacije masnim tkivom. Istraživanje je bilo sprovedeno u skladu sa Kodeksom dobre naučne prakse Medicinskog fakulteta u Beogradu i Helsinškom deklaracijom Evropske ministarske konferencije o mentalnom zdravlju Svetske zdravstvene organizacije, a odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2. Mesto i period istraživanja

Studija je sprovedena u Specijalnoj bolnici Diona, Bolnici Euromedic i Institutu za patologiju medicinskog fakulteta u Beogradu u periodu od 01.06.2014 do 15.01.2017.

3.3. Selekcija ispitanika

U periodu od 2014 do 2017 god. operisali smo 126 pacijenta koji su zahtevali korekcije nogu radi etiloško neslednih faktora, meko-tkivnih defekata zadobijeni traumom ili nastalih nakon neuspešnih estetskih operacija i čisto estetskih zahteva radi korekcije hipoplastičnih potkolenica. Od ukupnog broja ispitanika, 15.92% nije želelo da učestvuje u ispitivanju, a uradili su operativni zavat, 1.59% je bilo muškaraca, 13.34% obolelih od poliomielitisa i jednostranom hipolazijom noge, 11.31% ispitanika su bila sa neuspešnom predhodnom operacijom uvećanja potkolenica implantatima, 4.67% sa teškom traumom noge, a 53.17 %, ispitanika je bilo sa obostranom hipoplazijom potkolenica. Zbog kohezivnosti i veličine statističkog uzorka u obradi podataka je izdvojeno 67 pacijenta koji su bili najzastupljeniji u istraživanju i to su bili ispitanici ženskog pola sa hipoplastičnim potkolenicama Tip III- posterioralna hipoplazija slabo razvijenim *m. soleus-om* i *m. gastrocnemius-om*.

Starost izdvojenih ispitanika je bila između 20 i 58 godina, od toga je 45.1% je bilo mlađe od 35 godina, a 54.9% starijih od 35 godina.

3.3.1. Kriterijumi za uključivanje u studiju

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju bili su:

- a) potpisana izjava o dobrovoljnom učestvovanju u ispitivanju
- b) odustvo sistemskih akutnih i hroničnih bolesti, metaboličkih i neurovaskularnih oboljenja
- c) odsustvo predhodnih trauma tkiva jatrogeno ili hereditarno
- d) starost od 20 do 60 godina
- e) ženski pol
- f) upadljiva nerazvijenost potkolenica Tip III prema kriterijumu Cuenca-Guerra

3.4. Uzorkovanje

Razgovor sa ispitanicima i procena somatskog stanja, kao i antropometrijska merenja vršili su se na preoperativnoj pripremi dve nedelje pre zakazanog termina operacije i nakon operacije na kontrolama u periodu praćenja nakon 1 meseca (1m), 3 meseca (3m) i nakon 6 meseci (6m).

Na preoperativnoj pripremi ispitanici su popunili polustrukturisani socio-demografski upitnik dizajniranog za potrebe istraživanja. Ispitanici su pregledani po sistemima i definisan im je klinički nalaz. Neophodno je bilo utvrditi najbolji davajući region. Najčešći davajući regioni su bili stomak i leđa, a zatim unutrašnji i spoljanji deo butina. Ispitanici koji su imali nedostatak masti u donorskoj regiji su se posebno pripremali za ovu vrstu operacije pravljenjem režima ishrane koji bi nam obezbedio dovoljni resurs masti. Zbog toga nam je bilo važno poznavanje metabolizma masti, neuroloških i hormonskih uticaja na ubrzano gojenje pacijenta. Preoperativno i na kontrolama 1m, 3m, 6m, svim ispitanicima su urađena antropometrijska merenja i fotografisanje, a preoperativno i 6m postoperativno je rađen pregled potkolenica MR-om (magnetna rezonanca). U toku operacije i na 6m-oj kontroli je rađeno uzorkovanje masnog tkiva za histološko i imunohistohemijsko ispitivanje.

3.4.1. Polustrukturisani socio-demografski upitnik

Na početku ispitivanja, primenom polustrukturisanog socio-demografskog upitnika od pacijenta bili su uzeti podaci relevantni za istraživanje i to:

- a) opšti socio-demografski podaci (pol, starost, bračno stanje, potomstvo, mesto življenja, stručna sprema, podaci vezani za vrstu radnog mesta),
- b) podaci o ličnoj anamnezi (podaci vezani za postojanje akutnih ili kroničnih somatskih bolezni ličnih i u bliski porodici, alergijama na lekove, hranu ili gumu ili flastere, podaci o navikama-pušenje, konzumiranju alkohola, čajeva ili energetskih napitaka, svakodnevnim fizičkim aktivnostima, dosadašnjim operacijama i vrsti anestezija i da li je u toku njih bilo komplikacija).

3.4.2. Antropometrijska merenja

Ispitanicima su se preoperativno, 1m, 3m i 6m postoperativno radila antropometrijska merenja potkolenica koja su se zasnivala na merenju telesne mase, ITM (indeks telesne mase) i volumerijskim merenjima obima potkolenica. Volumetrijska merenja obima potkolenica su se obavljala u stojećoj poziciji tako što su se potkolenice cirkumferentno merile u određenim tačkama prema kriterijumu Cuenca-Guerra, a to su ispod kolena u nivou *tuberositas-a tibiae* na sredini lista, iznad gležnja i gležanj. Pacijenti su obeležavani u stojećoj poziciji i popunjavanje potkolenica je planirano prema obliku i veličini natkolenica.

3.4.3. Tehnike vizualizacije

Preoperativno i na kontrolama 1m, 3m i 6m postoperativno svi ispitanici su fotografisani spreda, otpozadi i bočno. Fotografisanje se obavljalo digitalnom kamerom Olympus od 16MP (*mega pixela*) sa belim opštim osvetljenjem, bez blica, na 2m udaljenja od pacijenta. Foto-dokumentacije je strogo čuvana i zaštićena u elektronskom kartonu pacijenta, a korišćena je radi vizuelnog poređenja i praćenja pacijenata.

Na preoperativnoj pripremi i postoperativno na 6m kontroli rađen je pregled potkolenica MR-om na aparatu marke Simens jačina magnetne indukcije 1.5 Tesla. Odlučili smo se za MR dijagnostiku jer je ona napredna „*imaging*” metoda izbora za prikaz skeletnih mišića. Takođe, ona omogućava odličnu mekotkivnu kontrastnu rezoluciju i multiplanarni prikaz potkolenice.

Ispitanici su postavljeni da leže u supinaciji da bi se izbegao mogući bol, pokreti i kompresija na određene mišićne grupe. Pregledi su obavljani u dve ravni (akijalnoj i koronarnoj) u presecima debljine 3.0 do 6.0 mm, a u *spin* eho T1W(*time 1 weighted*) i *fast spin* eho T2W (*time 2 weighted*) sekvence najpre bez supresije masti (FS- *fat supresion*), a zatim sekvence sa supresijom masti, a kao njihova alternativa bile su STIR (*Short T1 Inversion Recovery*) sekvence. Volumetrijska analiza bi se vršila kompjuterskim softverom za proračunavanje volumena odnosa mekih tkiva.

3.4.4. Analiza bioloških parametara

Analiza bioloških parametara se radila kroz histološku analizu tkiva i imunohistohemijska bojenja. Histološka evaluacija očuvanosti masnog tkiva, prevenstveno viabilnosti i morfologije adipocita je rađena iz donorskog regiona, centrifugiranog i proparnog uzorka masnog tkiva i uzorka uzetog iz recipijentnog regiona. Uzorak donorskog tkiva se uzimao za vreme operacije i iz subkutanog recipijentnog regiona potkolenice 6m nakon operacije. Uzorak tkiva je stavljan u 10% formaldehid, a zatim se tkivo potapalo u 96% alkohol da bi se u potpunosti izgubila lipidna kap. Uzorak se zatim kalupio u parafinski vosak koji je sečen Leica mikrotomom na 4 μ m debljine.

Svi uzorci su bojeni standardnom hematoksilin-eozin tehnikom na kojoj je urađena i morfometrijska analiza dobijene masti. Optička mikroskopija je rađena na mikroskopu Nikon Eclipse sa kontrolnom jedinicom Nikon DS-L3, a fotografisane su Nikon DS-F12 digitalnom kamerom.

Određivana su sledeće deskriptivne karakteristike tkiva:

1. oblik ćelija
2. veličina ćelija
3. izgled membrane
4. prisustvo vijabilnog jedra
5. prisustvo nekroze

6. prisustvo krvarenja
7. prisustvo krvnih sudova
8. izgled krvnih sudova

Morfometrijski je merena:

1. Dimenzije lipocita
2. Površina lipocita
3. Širina krvnih sudova
4. Površina krvnih sudova

Na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu je nakon patohistološke dijagnostike na reprezentativnim parafinskim kalupima učinjena imunohistohemijski analizirana ekspresija sledećih markera: vaskularnog endotelnog faktora rasta VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), epidermalnog faktora rasta EGF (engl. *epidermal growth factor*), trombocitni faktor rasta PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*).

Imunohistohemijska tehnika, podrazumeva primenu streptavidin-biotin metode korišćenjem L-SAB + kita, uz primenu diaminobenzidina kao hromogena i Majerovog hematoksilina za kontrastiranje. Za pozitivnu spoljašnju kontrolu korišćena su sledeća tkiva: normalni bubreg čoveka za VEGF, kacinomu pluća za EGF u i normalni bubreg čoveka za PDGF. Citoplazmatska, perinuklearna sitno zrnasta (*“dot spots”*) ekspresija je interpretirana kao pozitivna.

Imunohistohemijska obrada je obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju i histohemiju Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Imunohistohemijska tehnika u formalinu fiksiranih i u parafinu ukalupljenih uzoraka predstavlja višestepenu proceduru koja obuhvata sledeće postupke:

- deparafinizacija,
- proteolitička digestija

- blokiranje endogene peroksidaze
- imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike.

Preseci debljine 3-4 μ m, dobijeni sečenjem parafinskih kalupa su, nakon sušenja od 16h na 560C deparafinisani po sledećoj proceduri:

I ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
II ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
100% alkohol.....	3 minuta, ocediti
100% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
96% alkohol.....	3 minuta, ocediti
destilovana/dejonizovana voda.....	30 sekundi

Proteolitička digestija (demaskiranje antigena):

Deparafinisani preseci su preneti u plastičnu kivetu sa oko 250 ml radnog rastvora citratnog pufera (10mmol/L, pH 6.0) i kuvaju se u mikrotalasnoj pećnici 2x5 minuta na maksimalnoj temperaturi, a zatim se hlade u citratnom puferu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju su isprani destilovanom vodom dva puta po 30 sekundi.

Blokiranje endogene peroksidaze:

Preparati se potope 5 minuta u 3% vodonik-peroksid (rastvoren u destilovanoj vodi), zatim isperu deastilovanom vodom i preliju fosfatnim puferom (PBS-phosphate-buffered saline, 0,02 mol/L, pH 7,0) 3x2 minuta.

Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (Labelled streptavidin-biotin-LSAB+ metoda, DAKO, danska). Bojenje se odvija po sledećoj proceduri, koja je navedena u instrukcijama proizvođača:

FAZA I (primarno antitelo razblaženo po upustvu proizvođača):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) primarnog antitela,
3. inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi,
4. pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
5. preliti svežim puferom.

FAZA II (biotinilizovano vezno antitelo)

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) LINK antitela,
3. inkubacija 30 minuta
4. pažljivo isprati PBS iz špic-boce,
5. preliti svežim puferom.

FAZA III (streptavidin-peroksidaza):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l) streptavidin-peroksidaze,
3. inkubacija 30 minuta
4. pažljivo isprati PBS iz špic-boce
5. preliti svežim puferom

FAZA IV (supstrat hromogen):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ l)

hromogenadiaminobenzidina (DAB)

3. inkubacija 10 minuta
4. ispiranje destilovanom vodom

FAZA IV (kontrastiranje):

1. Mayer-ov hematoksin 5 do 10 minuta,
2. pažljivo isprati destilovanom vodom,
3. uroniti 10 puta u kivetu sa 0,037 mol/L amonijačne vode,
4. ispiranje destilovanom/dejonizovanom vodom 2 do 5 minuta.

Pokriti vodenim medijumom.

Mesta specifičnog vezivanja antitela su smeđe boje, dok hematoksin, nespecifično vezan za jedra svih ćelija, boji ih plavo.

Imunohistohemijska procedura je korišćena za sledeća antitela, u odgovarajućim razblaženjima:

PDGF (Santa Cruz, 1:200)

VEGF (Abcam, 1:250)

EGF (Santa Cruz, 1:50)

Ekspresija svih navedenih markera je citoplazmatska i određivana je semikvantitativno optičkom mikroskopijom na mikroskopu, Olympus BX50F4, uvećanjem 400. Dobijeni rezultati su semikvantitativno klasifikovani u 4 kategorije koje su određene arbitražno, na osnovu literaturnih podataka.

I negativno (0): 0-20% pozitivnih tumorskih ćelija

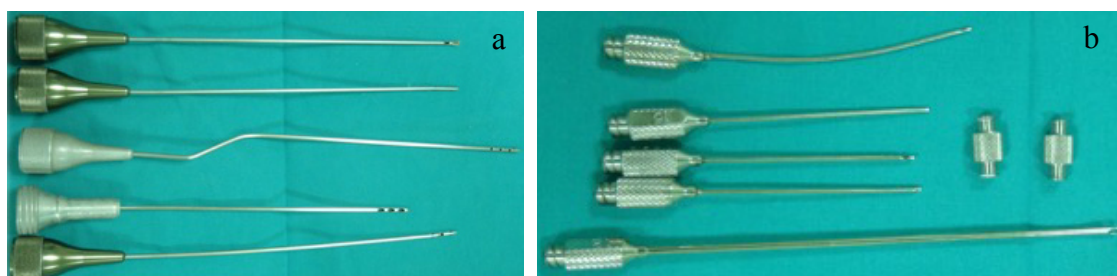
II slaba pozitivnost (1+): 21-50% pozitivnih tumorskih ćelija

III intenzivna pozitivnost (2+): više od 50% pozitivnih tumorskih ćelija

3.5. Hirurške procedure

A.) Uzimanje i pripremanje masti

Preoperativno svi ispitanici su se detaljno okupali antiseptikom, radi dekolonizacije odnosno smanjivanja broja bakterija na koži. Ispitanici 20 min. pre uvođenja u anesteziju dobijali su intravensku antibiotsku zaštitu cefalosporine III generacije. Preoperativno hirurško pranje operativne površine stomaka, leđa, natkolenica i potkolenica je obavljano je u stojećem položaju sa raširenim nogama i odručenim rukama, radi lakše dostupnosti svim delovima tela. Ispitanici su se bezbedno postavljali na sterilni sto u položaj na leđa i uvodili su se u opštu anesteziju. Operativne površine stomaka i nogu su se dodatno čistile aseptičnim rastvorom za hirurško pranje SkinDes, uključujući prste na nogama i stopala. U nivou prednje ilijačne spine pravljene su incizije na koži za unakrsnu infiltraciju subkutanog masnog tkiva donjeg i gornjeg dela stomaka i leđa. Infiltracija se vršila sa rastvorom 0,9 % NaCl i adrenalina u odnosu 1:500000 specijalno dizajniranim špricima ima marke DB od 50ml i namenskim infiltracionim kanilama. Kanile koje su korišćene za tumescentnu infiltraciju bile su debljine 3.5mm sa circumferentno postavljenim otvorima na vrhu kanile veličine 2mm. Kroz incizione otvore na koži infiltrisano je subkutano masno tkivo pravolinijski unakrsno po slojevima. Količina tumescentnog rastvora koja je infiltrisana je bila 2/3 od planirane količine masti za aspiraciju. Mast je aspirirana špricima od 50ml i kanilama debljine 3.0mm sa circumferentno postavljenim otvorima promera 1.5mm. Špricivi sa aspiriranim masnim tkivom postavljani su u vertikalni položaj da bi se dekantirao vodeni deo i da bi se mast oslobodila od tečnosti. Špricivi su odvajani u dve grupe u odnosu na tehniku pripreme. Za pripremu masti korišćene su dve metode: a) propiranje masti i b) centrifugiranje masti.



Slika 5 a) kanile za infiltraciju i ubacivanje proprane masti b) kanile za infiltrisanje centrifugirane masti

a. Proprana mast

Od ukupne količine dekantirane aspirirane masti odvojili smo deo za propiranje koji je planiran za infiltraciju u mišiće lista. Otvor metalnog suda prekrili smo gazom koja je pričvršćena za rubove posude. Aspirirana mast lagano se oslobodila iz špriceva i postavila na gazu. Mast se propirala sa 0,9% NaCl kroz gazu da bi se dodatno oslobodila od krvi i fibrinskih ostataka. Tako propranu mast, odstranjenu od detritusa i krvi lagano se vrati u špriceve od 50ml DB na koje se postavi kanila za infiltraciju masti (Slika 6.). Deo masti je odložen u bočicu za histološku i imunohistohemijsku analizu i preliven sa 10% formalinom.

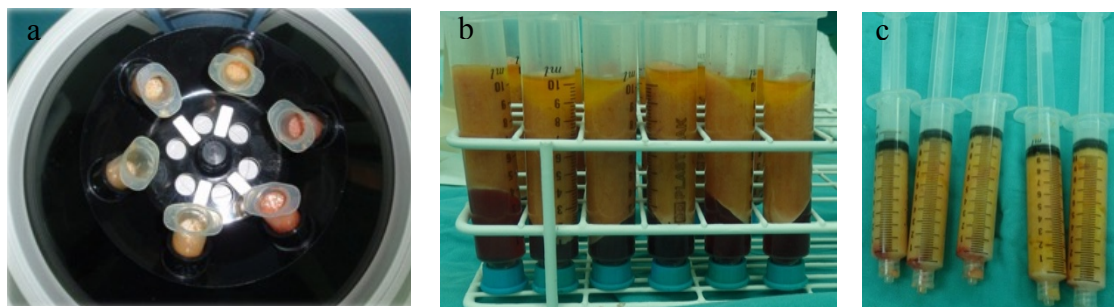


Slika 6. Pripremljena proprana mast za ubacivanje u list potkolenice

b. Centrifugirana mast

Deo dekantirane aspirirane masti koji je planiran za infiltraciju u potkožne slojeve potkolenice se centrifugirao. Mast iz špriceva od 50ml se lagano prebacila u špriceve od 10ml Luer Lock. Špricevi su se hermetički zatvorili specijalnim čepovima, postavili u sterilne epruvete i u centrifugu. Mast se centrifugirala na 2700rpm/3min. Nakon centrifugiranja pažljivo su se izvukli špricevi iz sterilne epruvete i odložili u stalak.

Sadržaj u špricевima se diferentovao u tri sloja: na dnu krv i infiltrat, srednji sloj masti i na vrhu ulje. Uklonjeni su zaštitni čepovi i špricevi su se oslobodi tečnog sadržaja krvi i infiltrata, nakon toga ponovo su se zatvorili čepom. Gornji sloj sa uljanim sadržajem se uklonio papirnim trakama. Čist sadržaj masti u špricевima se postave na kanile za subkutano injektiranje (Slika 7.). Uzorak centrifugirane masti se je odložen u bočicu za histološku i imunohistohemijsku analizu i preliven 10% formalinom.



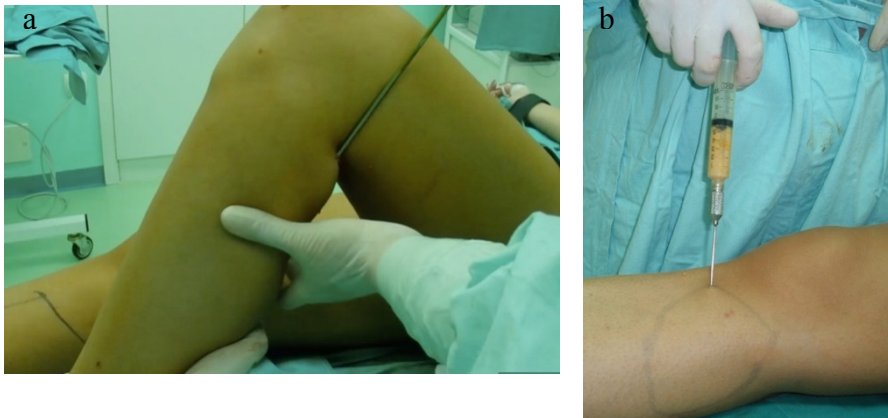
Slika 7. a) centrifugiranje b) centrifugirana mast diferentovana tri sloja c) izdvojene masne ćelije

B.) Tehnika infiltracije

Potkolenica je čvrsto postavljena u položaj fleksije od 45 stepeni. Napravljeni su incizioni otvori veličine 2 mm na mestima ispod levog i desnog kondila kolena. Špricевima od 50ml DB i infiltracionim kanilama debljine 3mm sa tri otvora veličine 1.5mm, lagano se uđe u sloj između *m. soleus-a* i *m. gastrocnemius-a*, kao i unutar samih mišića. Proprana mast se infiltrirala u malim količinama i to pri izvlačenju kanile napolje. U zavisnosti od planiranog crteža, region lista se popunjavao cirkumferentno. Nakon pražnjenja svakog šprica pokolenica je masirana da bi se mast rasporedila u što tanjem sloju. List se popunjavao do nivoa napetosti mišića.

Kroz isti incizioni otvor infiltrirala se pripremljena centrifugirana mast, kanilama debljine 1.2mm i špricевima od 10ml Luer Lock, potkožno, ravnomerno, cirkumferentno, su se popunjavali delovi ispod kolena. Zatim su se napravile incizione tačke iglom od 18G, lateralno i medijalno iznad gležnja, centrifugirana mast se infiltrirala potkožno cirkumferentno ravnomerno u region iznad gležnja, a ispod lista i u region gležnja. Popunjavanje se vršilo uvek pri izvlačenju kanile, ravnomerno u više potkožnih slojeva i više pravaca.

Tokom infiltracije su se proveravali prisutnosti pulseva na *a.dorsalis pedis* i *a. poplitealis*.



Slika 8. a) injektiranje proprane masti u mišiće b) injektiranje centrifugirane masti potkožno

C.) Masaža i bandažiranje

Potkolenice su se dobro izmasirale nakon završenog popunjavanja da bi se mast razlila u što tanjem sloju i da bi se proverila ravnomernost popunjavanja. Potkolenice su se dobro oprale, incizione tačke i otvori su se zatvorili i postavljene su elastične samolepljive trake širine 7 x 20cm u obliku crepa. Noge su fiksirane čarapama sa permanentnim pritiskom od 15mm Hg. Specijalne nogavice za kontinuiranu vensku drenažu su postavljene preko čarapa sve vreme boravka u bolnici.

3.6. Postoperativne procedure

Ispitanici su bili na hospitalnom lečenju 24h, nakon toga od njih se zahtevalo uobičajeno kretanje-šetnje, bez obaveznog ležanja i odmaranja. Pet dana nakon operacije svi pacijenti su bili pod antibiotskom terapijom cefalosporina II generacije per os. Savetovani su da pri ležanju ili sedenju noge budu podignute. Elastični adhesivni flasteri su se uklonili nakon sedam dana, a nastavljeno je sa kompresivnom zaštitom-čarapama od 15mmHg narednih mesec dana. Nakon operacije svi pacijenti imali su obavezu tuširanja mlakom i hladnom vodom naizmenično, a nakon toga su ponovo oblačili čarape. Ishrana je bila hiperproteinska.

3.6.1. Postoperativno uzorkovanje

Uzorkovanje se obavljalo na šestomesečnoj kontroli u operacionoj sali. Pacijenti su pre uzorkovanja deteljno okupani. Potkolenice su se očistile antisepticima. Potkožno u nivou iznad gležnja sa unutrašnje strane injektiran je lokalni anestetik Lidokain 2%, zatim

je napravljen punktiformni otvor iglom 18 G. Špricom od 10ml i aspiracionom kanilom veličine 1.2mm je uzet uzorak masti iz recipijentne regije u količini od 3ml. Uzorak masti iz recipijentne regije je odložen u bočicu za histološku i imunohistohemijsku analizu i preliven 10% formalinom.

3.7. Statistička metodologija

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su:

- Apsolutni i relativni brojevi
- Mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- Mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti.

Testovi za ispitivanje značajnosti razlike koji su korišćeni u ovoj studiji su:

- Parametarski: t test i analiza varijanse (ANOVA)
- Neparametarski: Wilcoxon Signed Ranks test

Za ispitivanje povezanosti između dve ordinalne varijable ili ordinalne i numeričke varijable, kao i numeričkih varijabli koje nemaju normalnu raspodelu, korišćena je Spirmanova korelaciona analiza. Za ispitivanje povezanosti dve numeričke varijable, pri čemu obe imaju normalnu raspodelu, korišćena je Pirsonova korelaciona analiza.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Nivo značajnosti od 0,05 uzet je kao granični za odbacivanje nulte hipoteze.

Svi podaci su obrađeni u SPSS 20,0 (IBM korporacija) softverskom paketu i R 3.4.0 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4. REZULTATI

U studiji je učestvovalo ukupno 67 pacijenata ženskog pola.

4.1. Starost i Antropometrija

Svim pacijentima uzet je anamnestički podatak o starosti i urađene su antropometrijske analize i deskriptivna i analitička statistika pacijenata pre i 6 meseci (6m) posle operacije prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1. Telesna težina i indeks telesne mase pre i 6m posle operacije

	A.S.	SD	Minimum	Maksimum	Rezultat testiranja
Starost	38,9	10,3	20	54	-
TM pre op. (kg)	62.78	7.36	51.00	94.20	t=5.627
TM 6m post op. (kg)	61.82	7.09	47.00	91.00	p<0,001
ITM pre op. (kg/m ²)	26.43	4.81	19.00	42.60	t=3,381
IMT 6m post op. (kg/m ²)	25.68	4.38	19.00	40.00	p=0,001

Iz tabele se vidi da postoji smanjenje prosečne telesne mase, odnosno smanjenje prosečnog indeksa telesne mase i ovaj pad je statistički značajan.

4.2. Aspirirana mast

Svim pacijentima je aspirirana mast i prosečna količina aspirirane masti u mililitrima iznosi 1012,5±428,7, sa medijanom 950, minimalnom vrednošću od 300 ml i maksimalnom vrednošću 2611 ml.

4.3. Morfološke i funkcionalne karakteristike analiziranih masti

Deskriptivna statistika morfoloških i funkcionalnih karakteristika analiziranih masti je prikazana u tabeli 2.

Tabela 2. Morfološke i funkcionalne karakteristike analiziranih masti

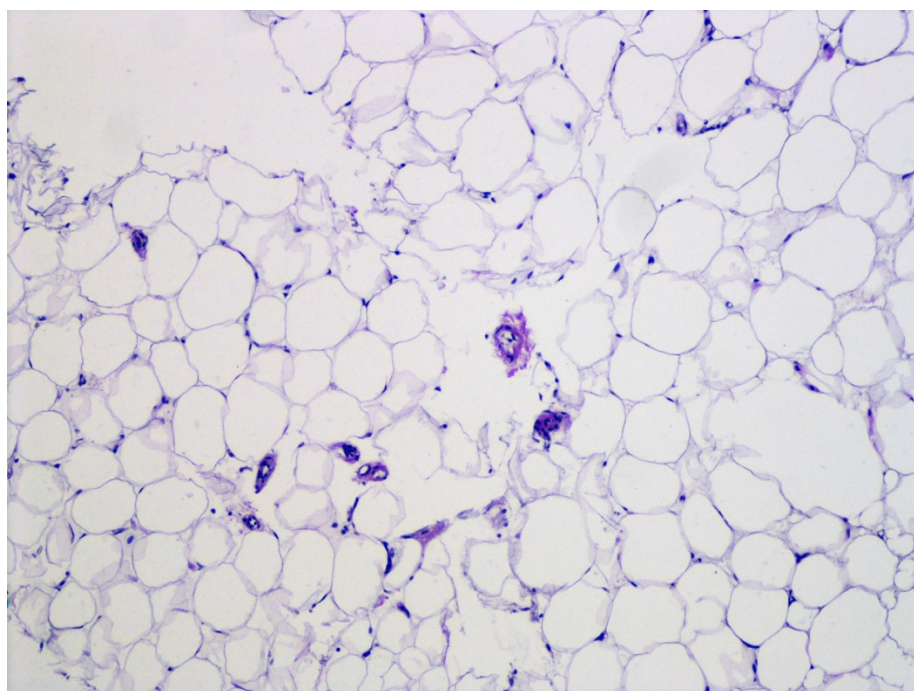
	Centrifugirana mast	Proprana mast	Recipijentna regija
Količina (ml)	157.24±73.91	387.24±228.467	
Površina ćelije (μm^2)	7723.76±907.94	9946.59±1113.67	2850.46±233.28
Broj KS/HPM	4.57±0.89	6.18±0.74	3.99±0.47
Prečnik KS (μm)	54.33±3.18	54.38±2.75	16.56±1.06
Površina KS (μm^2)	998.91±141.88	1622.71±432.32	3916.36±132.86
PDGF ekspresija			
bez		2 (3.0%)	
slaba	9 (13.4%)	60 (89.6%)	1 (1.5%)
umerena	58 (86.6%)	5 (7.5%)	37 (55.2%)
intenzivna			29 (43.3%)
VEGF ekspresija			
bez		49 (73.1%)	
slaba	47 (70.1%)	18 (26.9%)	15 (22.4%)
umerena	20 (29.9%)		52 (77.6%)
intenzivna			
EGF ekspresija			
bez		57 (85.1%)	
slaba	33 (49.3%)	10 (14.9%)	59 (88.1%)
umerena	34 (50.7%)		8 (11.9%)
intenzivna			

4.4. Proprana mast

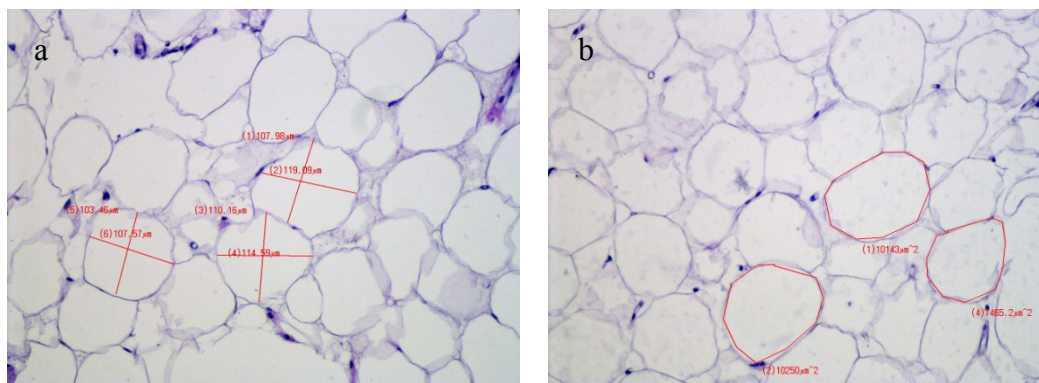
Deskriptivna statistika proprane masti u sledeće dve tabele prikazana je deskriptivna statistika proprane masti.

Tabela 3. Karakteristike proprane masti

	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Količina (ml)	387.2	228.5	334	80	1,350
Površina ćelije (μm^2)	9946.5	1113.7	10119.5	7390.2	12001.3
Broj KS/HPM	6.18	.74	6.00	4.00	8.00
Prečnik KS (μm)	54.38	2.75	54.72	48.67	59.14
Površina KS (μm^2)	1,622.7	432.3	1,753.5	603.5	2,291.3



Slika 9. Mikrofotografija proprane masti (HE, 100x): Proprana mast je mikroskopski očuvane histološke građe, ćeliska membrana je jasna i kontinuirana. Jedra su vijabilna, periferno postavljena. Vaskularni elementi redukovani, endotel vijabilan.



Slika 10 (a,b): Morfometrijske karakteristike proprane masti (HE, 200x): Lipociti su relativno uniformnih dimenzija i površina, uz lake varijacije u obliku.

U sledećoj tabeli (Tabela 4.) prikazana je distribucija faktora rasta iz proprane masti.

Tabela 4. Ekspresija faktora rasta proprane masti

		N	%
PDGF	bez	2	3,0%
	slaba	60	89,6%
	umerena	5	7,5%
VEGF	bez	49	73,1%
	slaba	18	26,9%
EGF	bez	57	85,1%
	slaba	10	14,9%

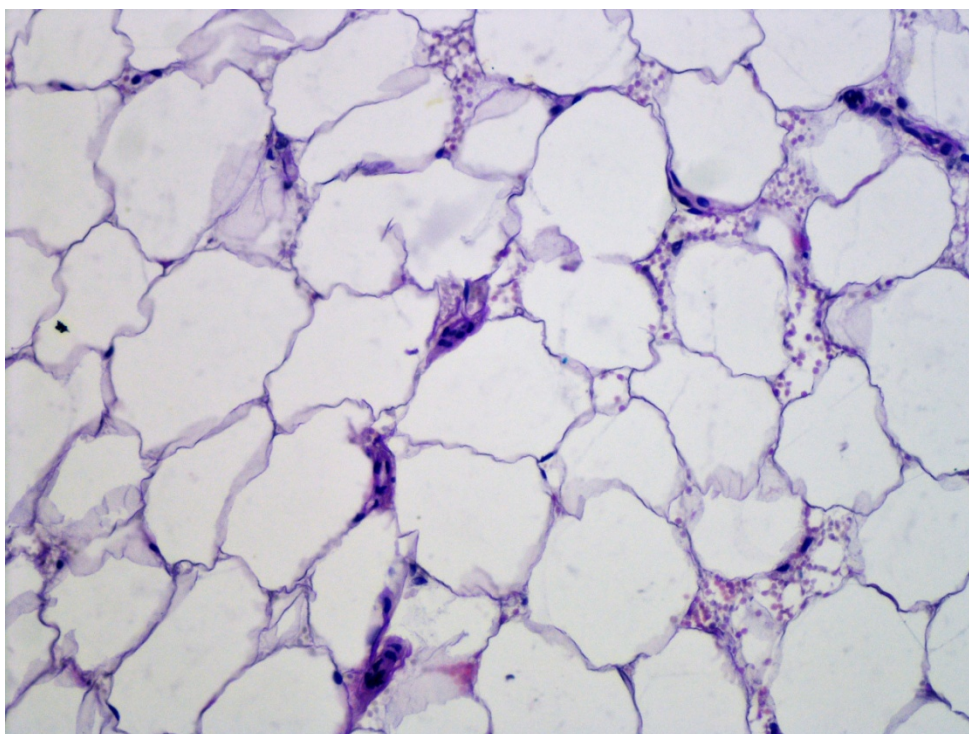
Za razliku od centrifugirane masti, učestalost PDGF faktora rasta ima najveću učestalost slabe ekspresije. VEGF slaba ekspresija je zastupljena kod jedne četvrtine pacijenata, a EGF ista kategorija kod jedne sedmine.

4.5. Centrifugirana mast

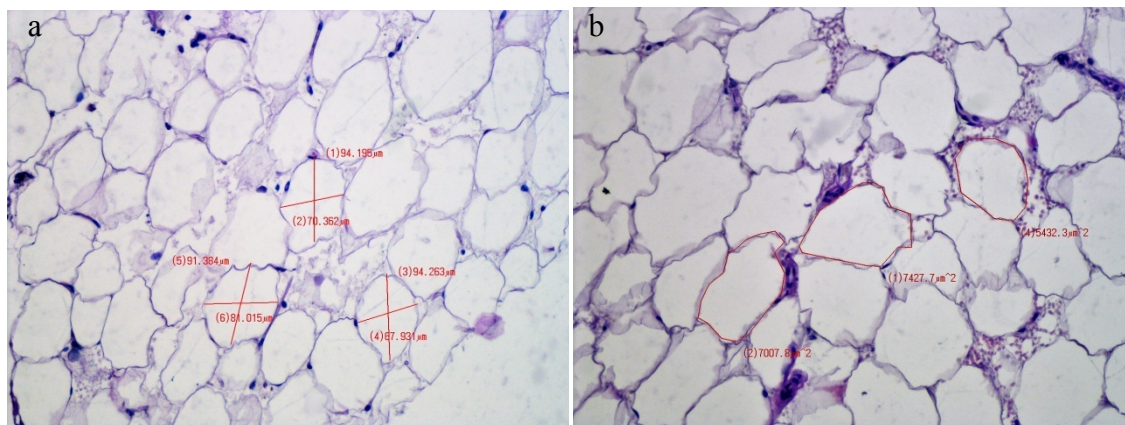
Analogno propranoj masti, količina, površina ćelije, broj krvnih sudova, prečnik i površina krvnih sudova prikazana je u tabeli 5.

Tabela 5. Karakteristike centrifugirane masti

	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Količina (ml)	157.2	73.9	160	30	350
Površina ćelije (μm^2)	7723.7	907.9	7654.8	5432.3	9487.9
Broj KS/HPM	4.57	.89	4.00	2.00	6.00
Prečnik KS (μm)	54.33	3.18	54.32	48.11	64.37
Površina KS (μm^2)	998.9	141.9	991.1	608.3	1,250.1



Slika 11. Mikrofotografija centrifugirane masti (HE, 100x): Značajno naborana ćelijska membrana lipocita, uz fokalne prekide kontinuiteta. Jedra su očuvana, homogeno prebojena. Znaci intersticijske ekstravazacije eritrocita.



Slika 12 (a,b). Karakteristike centrifugirane masti (HE, 200x): Lipociti su manjih dimenzija u odnosu na propranu mast. Vaskularni elementi prisutni, sličnih morfometrijskih karakteristika kao u propranoj masti, uz redukciju broja i lako smanjnje površine.

U sledećoj tabeli (Tabela 6.) prikazana je distribucija faktora rasta iz centrifugirane masti.

Tabela 6. Ekspresija faktora rasta centrifugirane masti

		N	%
PDGF	slaba	9	13,4%
	umerena	58	86,6%
VEGF	slaba	47	70,1%
	umerena	20	29,9%
EGF	slaba	33	49,3%
	umerena	34	50,7%

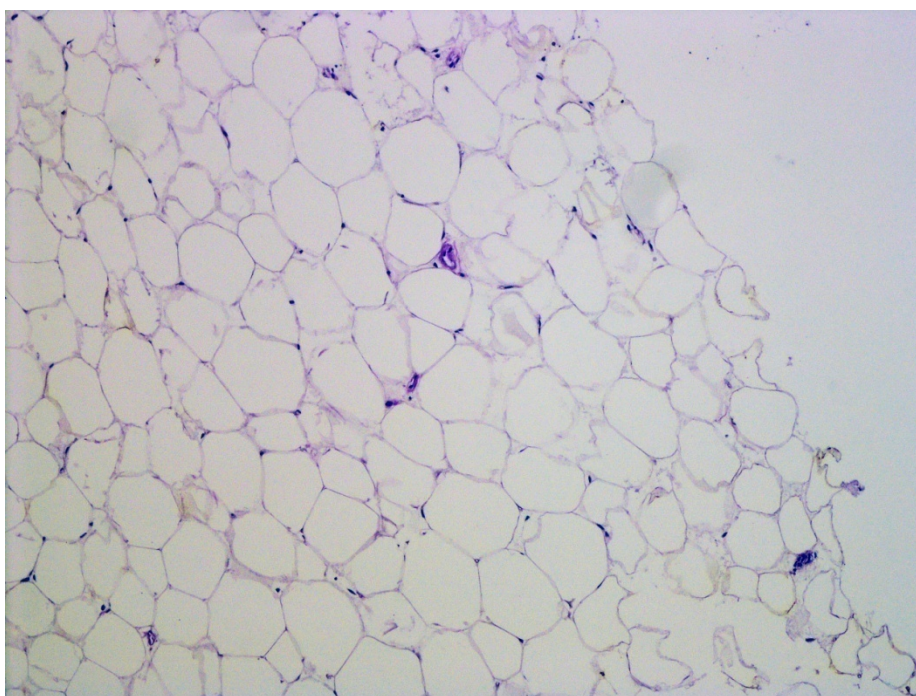
Iz tabele se jasno vidi da je učestalost umerene ekspresije najveća u PDGF faktoru rasta, dok kod EGF polovina ima slabu, a polovina umerenu ekspresiju. Kada je u pitanju faktor rasta VEGF umerena ekspresija je kod trećine pacijenata.

4.6. Recipijentna regija

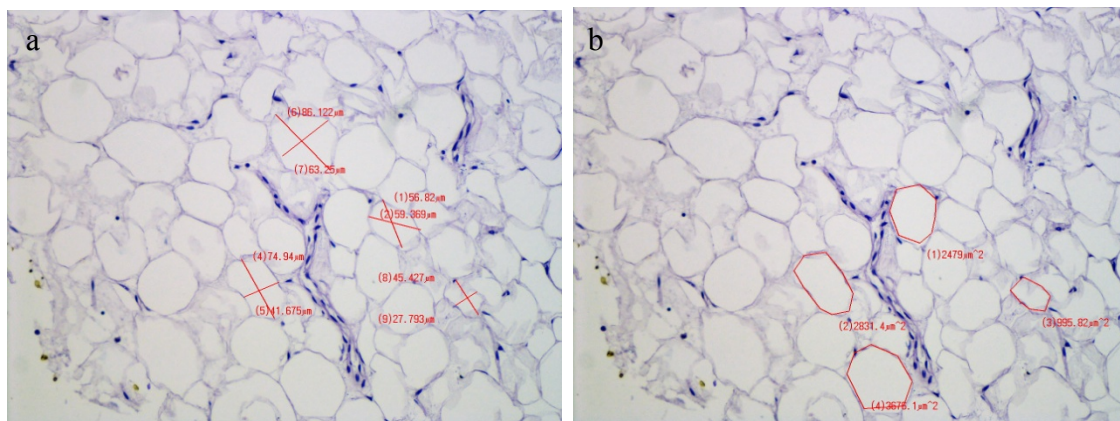
Analogno centrifugiranoj i propranoj masti, u sledeće dve tabele prikazana je deskriptivna statistika recipijentne regije.

Tabela 7. Karakteristike recipijentne regije

	A.S.	SD	Median	Minimum	Maksimum
Površina ćelije (μm^2)	2850.4	233.3	2883.3	1625.4	3182.2
Broj KS/HPM	3.99	.48	4.00	3.00	5.00
Prečnik KS (μm)	16.56	1.06	16.79	13.28	18.59
Površina KS (μm^2)	3916.4	132.9	3918.0	3629.0	4490.0



Slika 13. Mikrofotografija recipijentne masti (HE, 100x): Prisutne su značajne u veličine ćelija, uz očuvanje oblika i kontinuiteta membrane.



Slika 14 (a, b). Karakteristike recipijentne masti (HE, 200x): Dimenzije i površina adipocita znatno manji nego kod centrifugirane i proprane masti. Izražena vaskularizacija sa naglašenim endotelom.

U sledećoj tabeli (Tabela 8.) prikazana je distribucija faktora rasta recipijentne regije.

Tabela 8. Ekspresija faktora rasta recipijentne regije

		N	%
PDGF	slaba	1	1,5%
	umerena	37	55,2%
	intenzivna	29	43,3%
VEGF	slaba	15	22,4%
	umerena	52	77,6%
EGF	slaba	59	88,1%
	umerena	8	11,9%

Na osnovu prikazane distribucije pacijenata utvrđeno je da su pacijenti sa umerenom i intenzivnom ekspresijom u sličnom procentu kada je u pitanju PDGF, dok je umerena ekspresija u VEGF faktoru zastupljena kod tri četvrtine pacijenata, a isti nivo ekspresije EGF kod jedne desetine pacijenata.

4.7. Korelacija starosti i histoloških karakteristika uzorka masti iz recipijentne regije

Korelaciona analiza starosti i histoloških karakteristika recipijentne regije prikazana je u tabeli 9.

Tabela 9. Starost i karakteristike recipijentne regije

		Starost
Površina ćelija	r	,155
	p	,211
Prečnik KS	r	-,213
	p	,083
Površina KS	r	,206
	p	,094
Broj KS/HPM	Rho	-,152
	p	,220

r – koeficijent Pirsonove linearne korelacije; rho – koeficijent Spirmanove korelacije ranga; p - signifikantnost

Iz tabele se vidi da postoji slaba, negativna korelacija starosti i prečnika KS recipijentne regije, ali ova korelacija nije značajna na konvencionalnom nivou značajnosti od 0,05. Nešto slabija, ali takođe bez značajnosti je i korelacija sa površinom KS, samo što se radi o pozitivnoj, a ne o negativnoj korelaciji.

Kada su u pitanju faktori rasta, s'obzirom da se radi samo o dve kategorije, u tabeli 10. prikazana je deskriptivna i analitička statistika starosti.

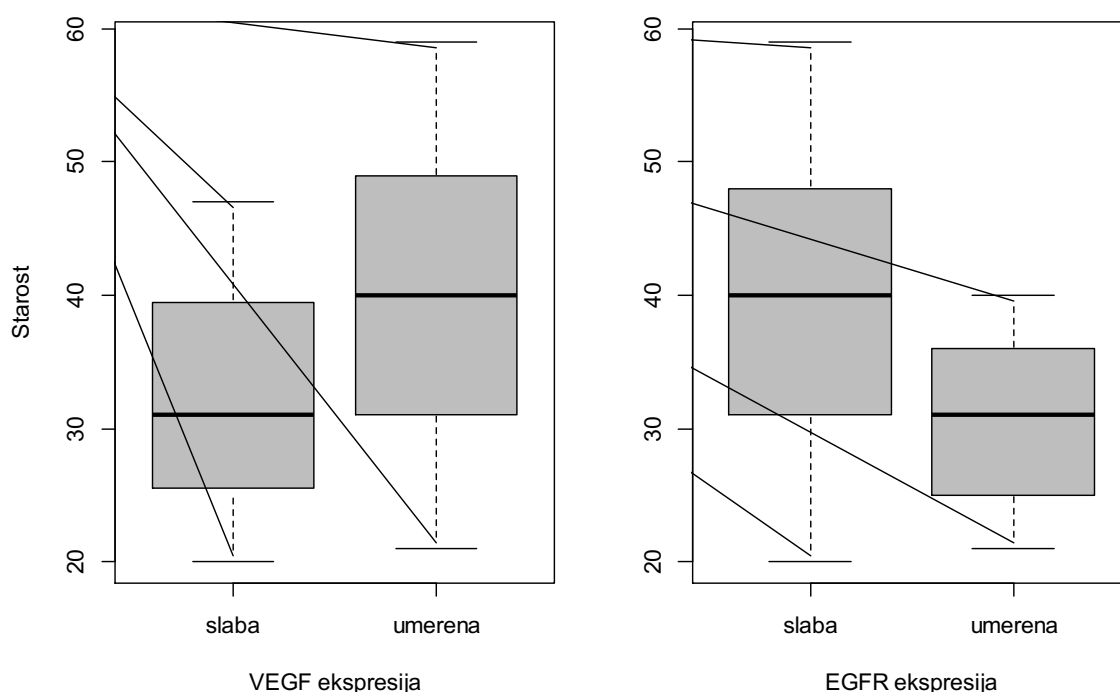
Tabela 10. Faktori rasta recipijentne regije u odnosu na starost

		A.S.	SD	Rezultat testiranja
PDGF	umerena	38.4	9.6	t=-0,532
	intenzivna	39.7	11.2	p=0,597
VEGF	slaba	32.6	8.9	t=-2,861
	umerena	40.8	10.0	p=0,006
EGF	slaba	40.1	10.2	t=2,541
	umerena	30.6	7.1	p=0,013

Iz tabele se vidi da postoji značajna razlika između VEGF i EGFR gradacija ekspresije po starosti. Naime, prosečna starost je značajno veća kod pacijenata sa umerenom ekspresijom VEGF, a suprotno kada je u pitanju EGFR.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 1).

Grafikon 1. Faktori rasta recipijentne regije u odnosu na starost



4.8. Promena obima potkolenice po lokalizaciji i strani tela

Svim pacijentima je meren obim na četiri nivoa potkolenice levo i desno. Deskriptivna statistika obima pre i 6m posle operacije, prosečna promena obima i količina injektirane masti je prikazana u tabeli 11.

Tabela 11. Dimenzije potkolenice pre i 6m posle operacije i količina injektirane masti

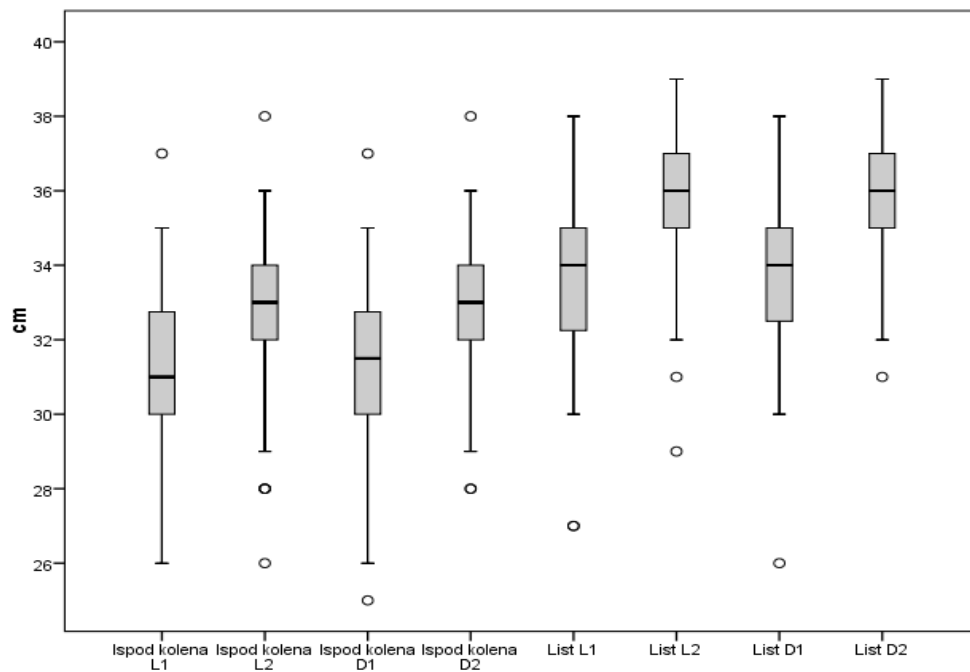
Lokalizacija	Strana	Pre op. (cm)	Post op.6m (cm)	Promena obima (cm)*	Injektirana mast (ml)
Ispod kolena	levo	31.04±2.20	32.87±2.12	1.83±1.34	33.18±13.55
	desno	31.28±2.21	33.10±1.87	1.82±1.45	32.61±13.91
List	levo	33.50±2.23	35.72±1.84	2.22±1.53	156.93±54.62
	desno	33.64±2.14	35.82±1.68	2.18±1.37	152.12±60.71
Iznad gležnja	levo	23.06±1.64	24.29±1.38	1.23±1.20	23.85±9.75
	desno	23.21±1.69	24.31±1.52	1.09±1.16	23.81±11.25
Gležanj	levo	20.41±1.38	21.49±1.00	1.08±1.04	15.15±5.01
	desno	20.48±1.43	21.53±1.04	1.04±.089	14.70±4.85

*Sve promene obima su visoko statistički značajne na nivou $p<0.001$ (t test)

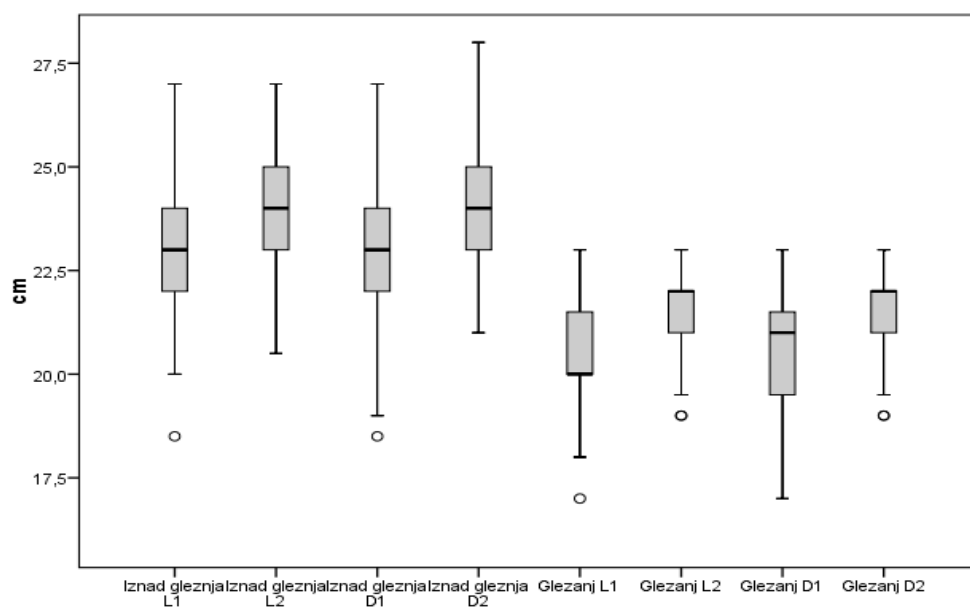
Promene obima su svuda prisutne, a najveća promena je u srednjem nivou lista. Statističkom analizom, t testom za vezane uzorke, utvrđeno je da su sve promene visoko statistički značajne.

Razlike u obimu pre i posle operacije su prikazane i grafički (Grafikon 2 i Grafikon 3).

Grafikon 2. Promena obima potkolenice po lokalizacijama



Grafikon 3. Promena obima potkolenice po lokalizacijama



Legenda: L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6mnakonoperacije

4.9. Promena obima potkolenice u odnosu na količinu infiltrirane masti i preoperativni obim

U tabeli 12. prikazane su korelacije promena obima u cm pre operacije i 6m posle operacije i količine infiltrirane masti na datom nivou potkolenice i početnog obima na datoj lokalizaciji.

Tabela 12. Korelacija promene obima potkolenice sa infiltrirane masti i početnim obimom

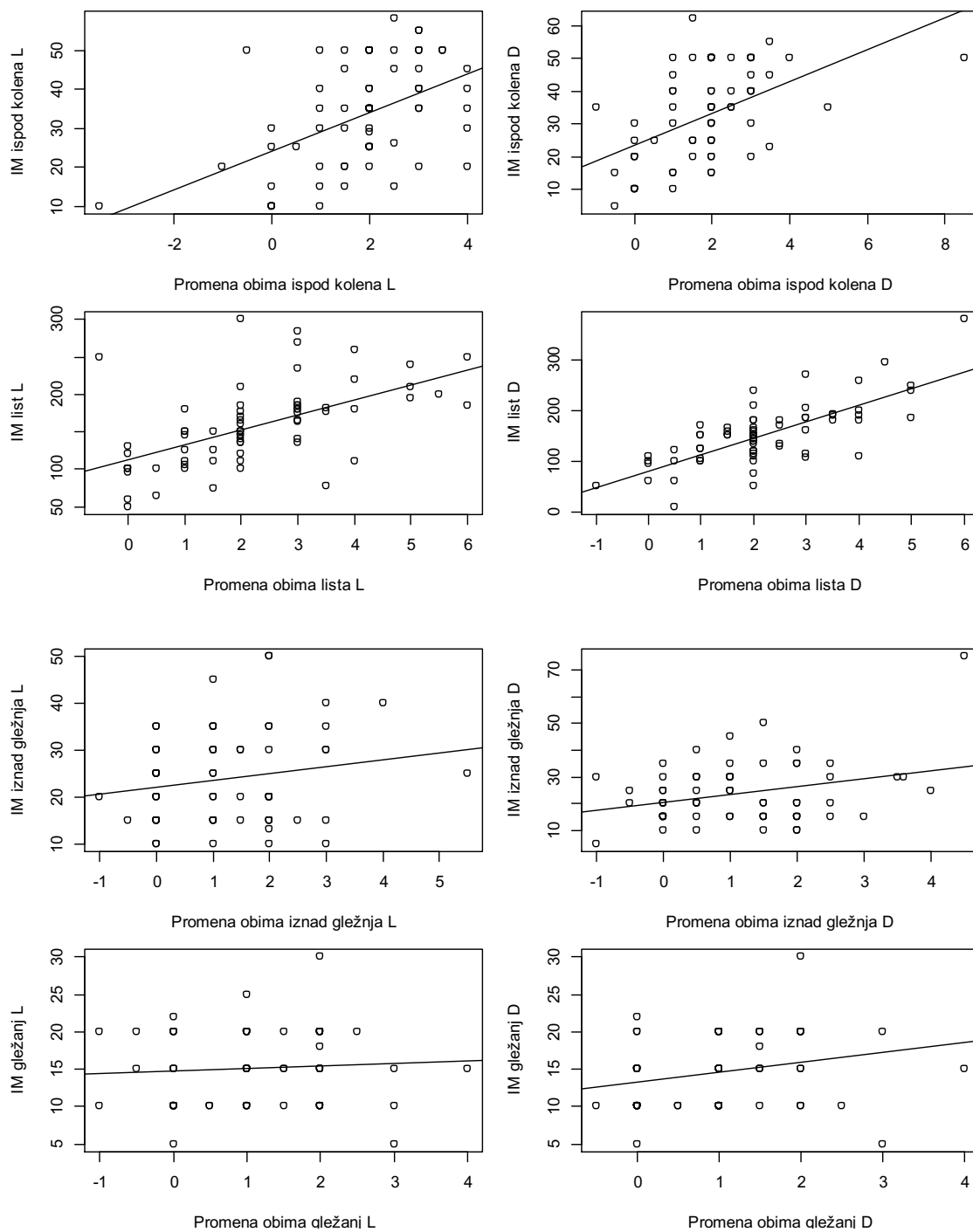
	Ispod kolena		List		Iznad gležnja		Gležanj	
	levo	desno	levo	desno	levo	desno	levo	desno
Infiltrirana mast	.491**	.507**	.560**	.737**	.179	.309*	.073	.246*
Početni obim	-.363**	-.543**	-.573**	-.613**	-.559**	-.483**	-.694**	-.688**

*p<0.05 **p<0.01

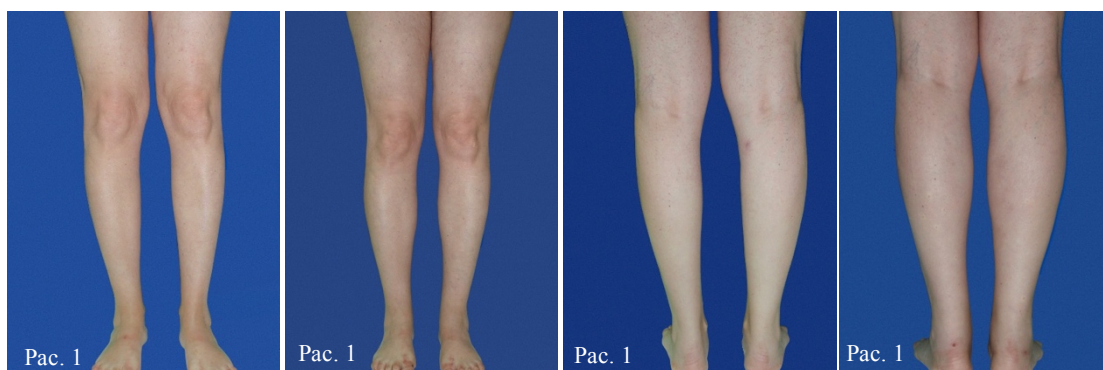
Na osnovu rezultata korelacione analize utvrđeno je da postoji statistički značajna korelacija promene dimenzije i infiltrirane masti ispod kolena i u srednjem nivou lista, kao i infiltrirane masti i promene obima iznad gležnja desno i u nivou gležnja desno, dok levo nema značajne razlike. Sve korelacije su slabe do jake i sve su pozitivnog smera. Korelacije promena obima potkolenice i početnog obima su sve statistički značajne, solidne do jake i sve su negativnog smera.

Rezultati korelacione analize infiltrirane masti i promena obima potkolenice u različitim lokalizacijama je prikazana i grafički (Grafikon 4.).

Grafikon 4. Korelacija infiltrirane masti i promene obima potkolenice



Legenda: L-levo; D-desno;IM-infiltrirana mast

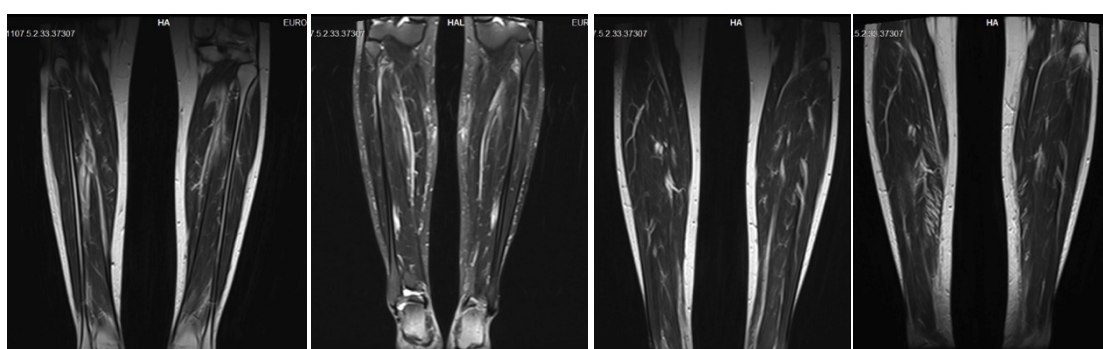


AP pre

AP 6m post

PP pre

PP 6m post

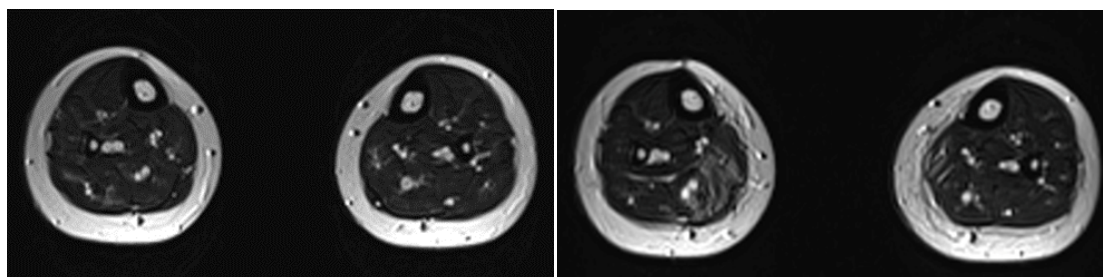


CP pre

CP 6m post

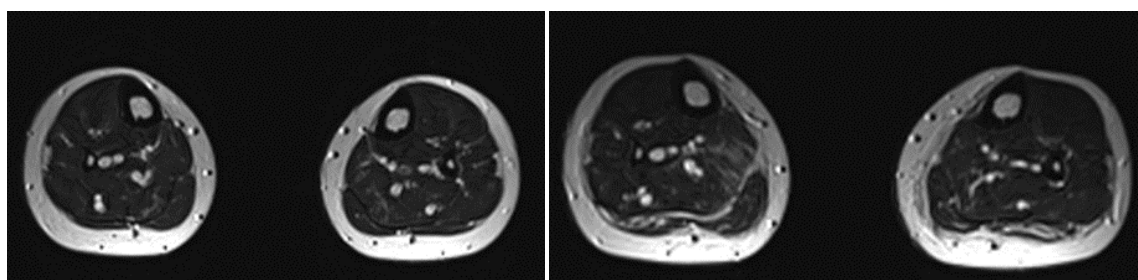
CP pre 1

CP 6m post 1



Aksijalni presek – pre

Aksijalni presek – 6m post

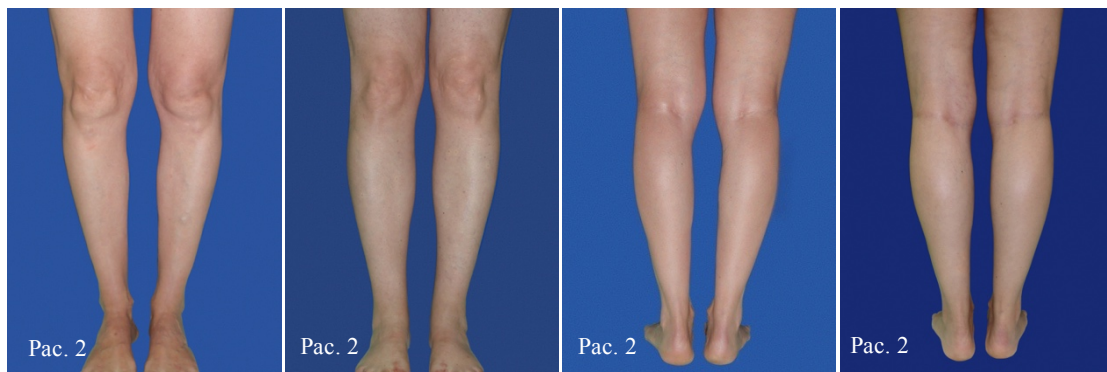


Aksijalni presek – pre 1

Aksijalni presek – 6m post 1

Legenda: AP – prikaz spreda; PP – zadnji prikaz; CP – koronarni presek

Slika 15. Fotografije i prikaz magnetne rezonance pacijenta pre i šest meseci posle

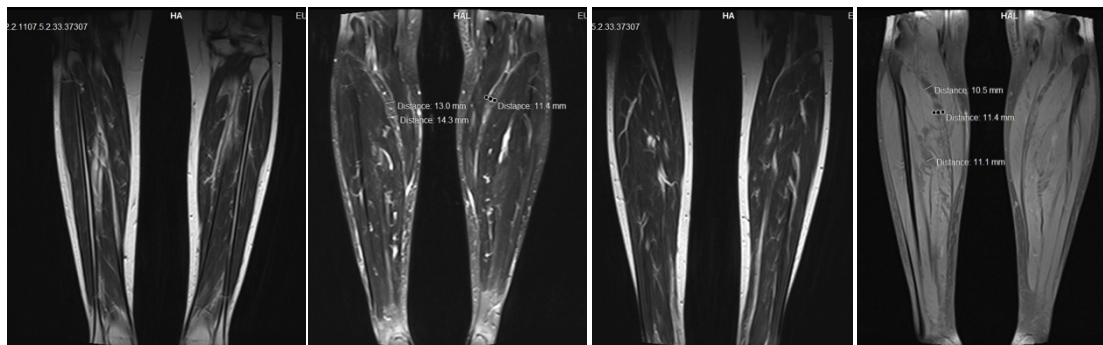


AP pre

AP 6m post

PP pre

PP 6m post

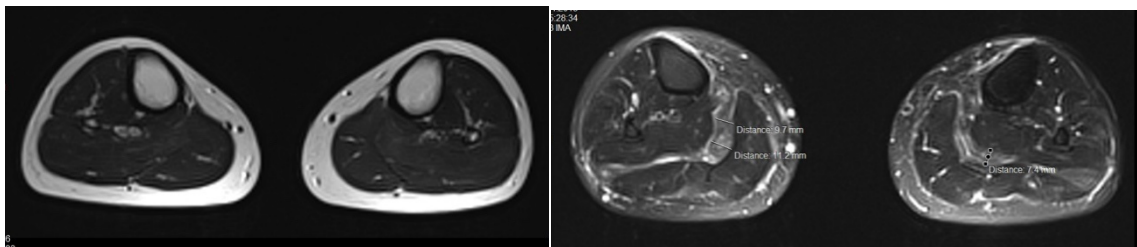


CP pre

CP 6m post

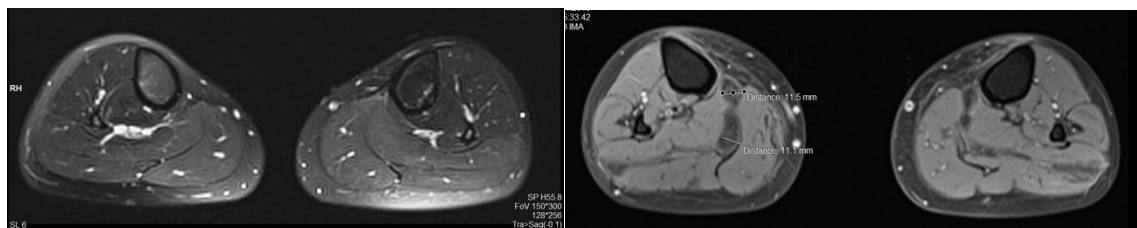
CP pre 1

CP FS 6m post 1



Aksijalni presek – pre

Aksijalni presek – 6m post

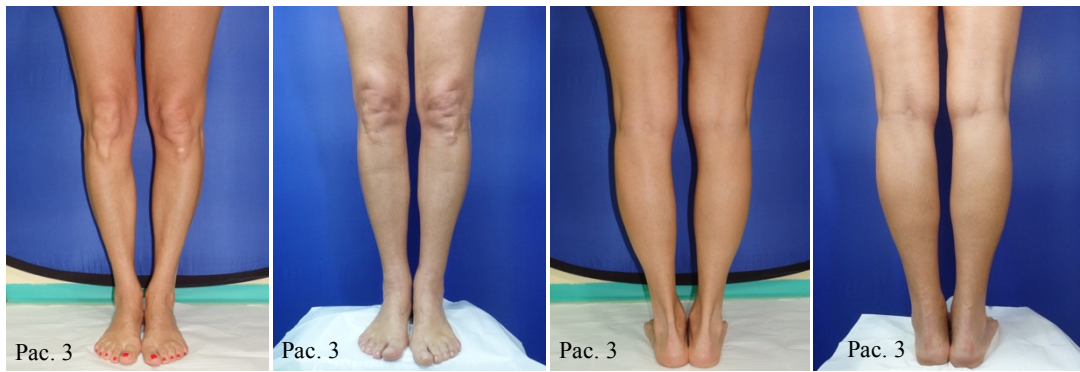


Aksijalni presek – pre 1

Aksijalni presek – FS 6m post 1

Legenda: AP – prikaz spreda; PP – zadnji prikaz; CP – koronarni presek

Slika 16. Fotografije i prikaz magnetne rezonance pacijenta pre i šest meseci posle

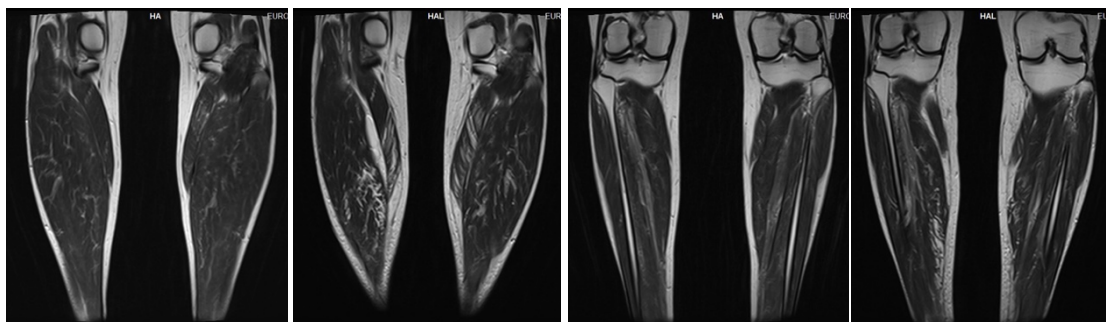


AP pre

AP 6m post

PP pre

PP 6m post

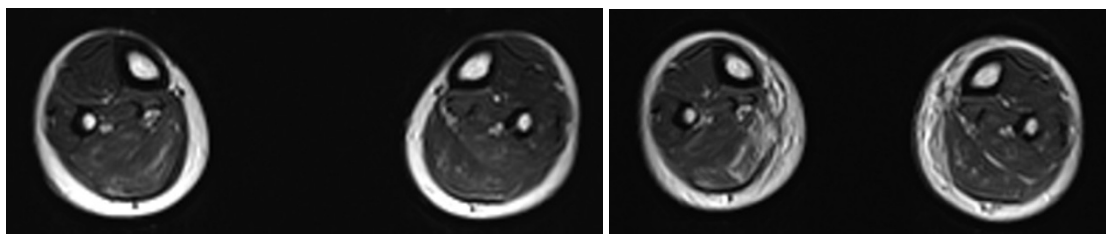


CP pre

CP 6m post

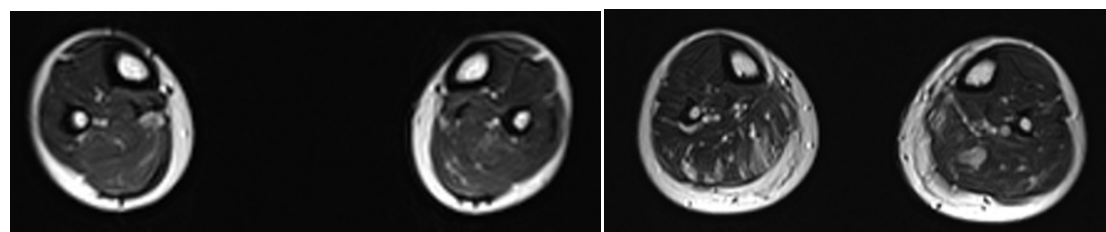
CP pre 1

CP 6m post 1



Aksijalni presek – pre

Aksijalni presek – 6m post



Aksijalni presek – pre 1

Aksijalni presek – 6m post 1

Legenda: AP – prikaz spreda; PP – zadnji prikaz; CP – koronarni presek

Slika 17. Fotografije i prikaz magnetne rezonance pacijenta pre i šest meseci posle

4.10. Proprana mast i dimenzije potkolenice

U tabeli 13. prikazana je korelaciona analiza morfoloških karakteristika proprane masti i obima lista pre i 6m posle operacije.

Tabela 13. Morfološke karakteristike proprane masti i obima lista

		Proprana mast	Površina ćelije	Broj KS/HPM	Prečnik KS	Površina KS
List L1	r	-,260	,017	,005	-,051	,044
	p	,034	,889	,971	,679	,724
List L2	r	-,080	,191	,055	-,117	,038
	p	,520	,121	,661	,345	,760
List D1	r	-,127	,191	-,146	,088	,083
	p	,307	,122	,238	,481	,506
List D2	r	,072	,213	-,053	-,073	,018
	p	,564	,084	,670	,559	,883

r – koeficijent Pirsonove linearne korelacije; p – signifikantnost; KS-krvni sud; L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-posle operacije

Na osnovu rezultata korelacione analize utvrđeno je da je jedino značajna korelacija količine proprane masti i obima lista levo pre operacije. Ova korelacija je negativnog smera i slaba. Jedini koeficijent korelacije koji se još može izdvojiti i koji je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti je korelacija površine ćelija i obima lista desno 6m posle operacije. Ova korelacija je pozitivna i slaba.

Sledeća analiza (Tabela 14.) predstavlja korelacionu analizu karakteristika proprane masti i promene obima lista levo i desno.

Tabela 14. Morfološke karakteristike proprane masti i promena obima lista

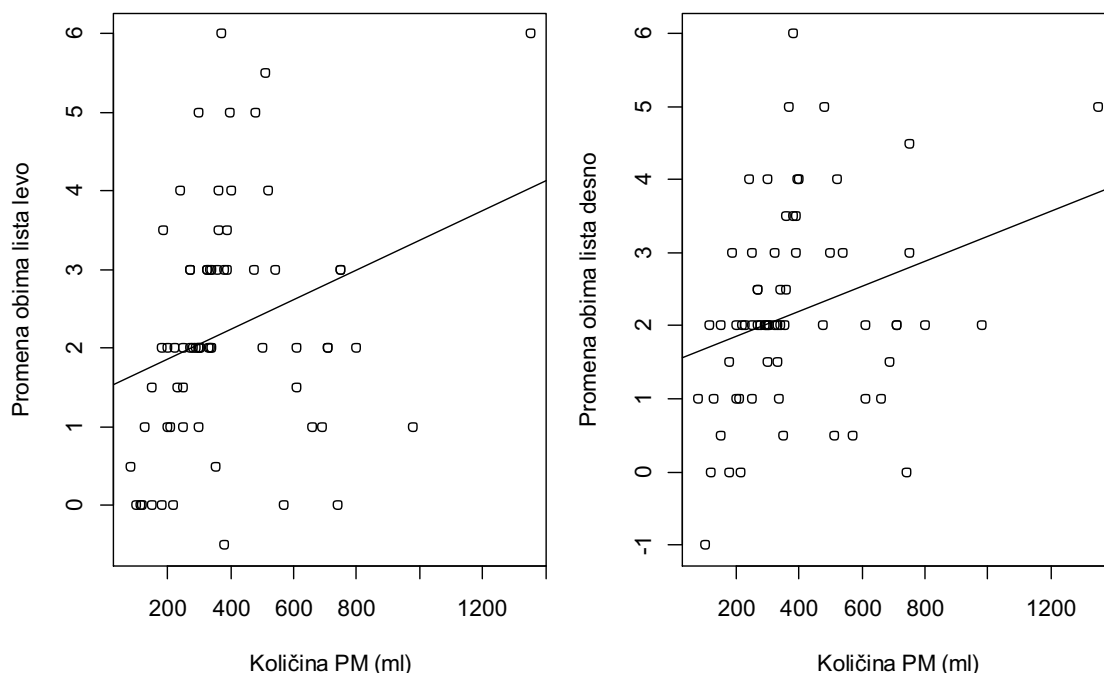
		Proprana mast	Površina ćelije	Broj KS/HPM	Prečnik KS	Površina KS
delta List L	r	,281	,205	,059	-,066	-,018
	p	,021	,096	,636	,596	,885
delta List D	r	,285	-,035	,162	-,225	-,106
	p	,019	,776	,190	,067	,393

r – koeficijent Pirsonove linearne korelacije; p – signifikantnost; KS-krvni sud; L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posle operacije

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da postoji značajna, pozitivna korelacija količine proprane masti i promene obima lista i levo i desno. Korelacija prečnika KS i promene obima desnog lista je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, negativnog je smera i slaba.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 5.).

Grafikon 5. Odnos količine proprane masti i promena obima lista



4.11. Centrifugirana mast i dimenzije potkolenice

U daljoj analizi analizirana je povezanost karakteristika centrifugirane masti i obima potkolenice pre i 6m posle operacije (Tabela 15.).

Tabela 15. Korelacija karakteristika centrifugirane masti i obima potkolenice

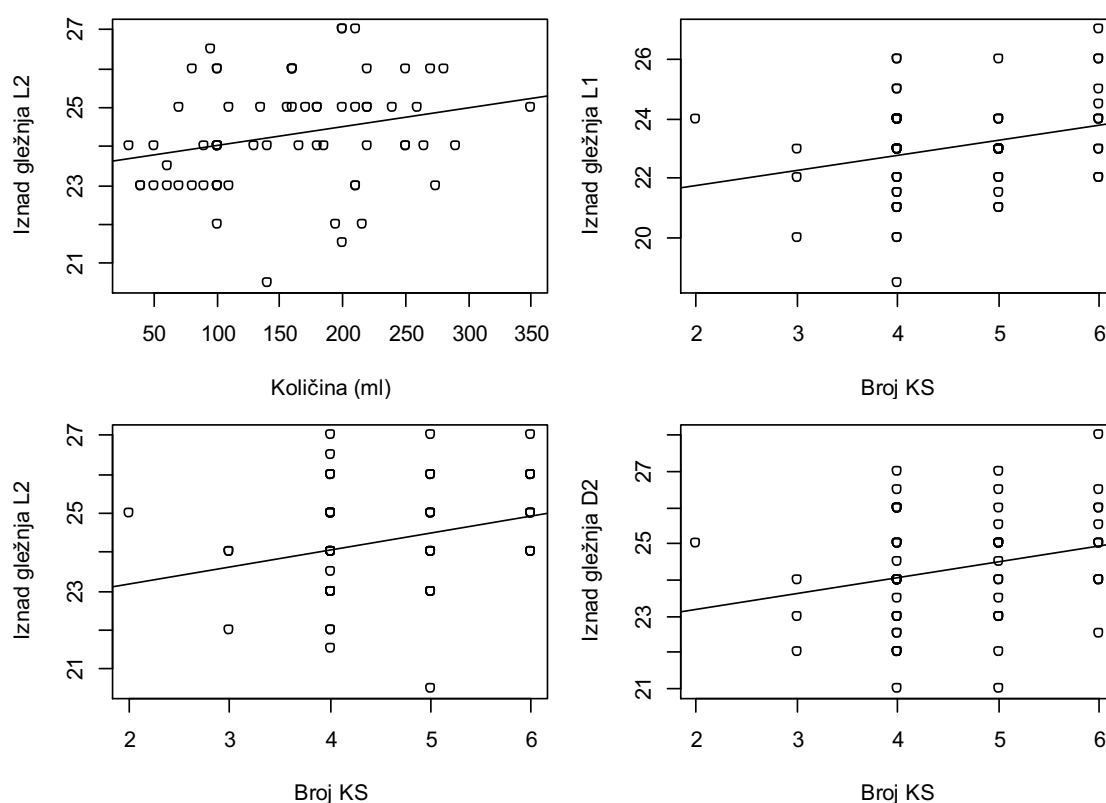
		Količina (ml)	Površina ćelije	Broj KS/HPM	Prečnik KS	Površina KS
Ispod kolena L1	r	,043	,222	,095	-,077	,075
	p	,729	,070	,445	,534	,548
Ispod kolena L2	r	,021	,114	,087	-,072	,059
	p	,864	,360	,486	,565	,636
Ispod kolena D1	r	-,123	,174	-,063	,002	,156
	p	,320	,158	,610	,989	,208
Ispod kolena D2	r	-,084	,082	,032	,029	,143
	p	,498	,510	,797	,813	,247
Iznad gležnja L1	r	,098	,067	,280	,034	-,085
	p	,431	,589	,022	,783	,496
Iznad gležnja L2	r	,261	,059	,284	,198	,042
	p	,033	,633	,020	,109	,735
Iznad gležnja D1	r	,070	-,074	,162	,079	,039
	p	,575	,551	,189	,525	,752
Iznad gležnja D2	r	,178	,069	,257	,192	,019
	p	,150	,578	,035	,120	,880
Gležanj L1	r	,058	-,022	,140	,129	,035
	p	,644	,862	,259	,297	,776
Gležanj L2	r	,092	-,017	,098	,049	,044
	p	,460	,893	,430	,692	,726
Gležanj D1	r	-,031	,020	,137	,109	,016
	p	,803	,874	,268	,382	,899
Gležanj D2	r	,044	,033	,161	,051	-,002
	p	,725	,788	,194	,682	,984

r – koeficijent Pirsonove linearne korelacije; p – signifikantnost; L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posle operacije

Na osnovu rezultata korelacione analize utvrđeno je da postoji nekoliko statistički značajnih korelacija između karakteristika centrifugirane masti i obima potkolenice. Korelacija površine ćelija centrifugirane masti sa dimenzijom ispod kolena na levoj nozi pre operacije blizu konvencionalnog nivoa značajnosti, pozitivnog je smera i male jačine. Takođe, značajne korelacije su između količine centrifugirane masti i obima potkolenice iznad gležnja na levoj nozi 6m posle operacije, kao i broj krvnih sudova sa obimom potkolenice iznad gležnja na levoj nozi pre i 6m posle operacije, kao i obima iznad gležnja na desnoj nozi 6m posle operacije.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 6.).

Grafikon 6. Korelacije karakteristika centrifugirane masti i obima potkolenice od kolena do gležnja



Legenda: L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posleoperacije; KS-krvnisud

Tabela 16. Korelacija količine i morfoloških karakteristika centrifugirane masti i promene obima potkolenice

		Količina (ml)	Površina ćelije	Broj KS/HPM	Prečnik KS	Površina KS
delta	r	-,037	-,186	-,019	,014	-,030
Ispodkolena						
L	p	,765	,132	,880	,912	,812
delta	r	,079	-,160	,138	,035	-,052
Ispodkolena						
D	p	,524	,197	,266	,777	,674
delta	r	,169	-,023	-,054	,182	,164
Iznadgležnja						
L	p	,172	,853	,666	,142	,184
delta	r	,132	,200	,101	,137	-,033
Iznadgležnja						
D	p	,288	,105	,418	,270	,792
delta	r	,012	,013	-,092	-,124	-,005
Gležanj L						
	p	,925	,919	,461	,316	,966
delta	r	,101	,007	-,032	-,114	-,028
Gležanj D						
	p	,417	,952	,795	,357	,820

Iz tabele se vidi da nema statistički značajnih korelacija između količine i morfoloških karakteristika centrifugirane masti i promene obima potkolenice levo i desno.

4.12. Faktori rasta i dimenzije potkolenice

Dalja analiza obuhvatila je testiranje razlike faktora rasta centrifugirane masti i obima potkolenice. Deskriptivna i analitička statistika PDGF faktora rasta i obima potkolenice je prikazana u tabeli 17.

Tabela 17. PDGF centrifugirane masti i obimi potkolenice

	CM PDGFR ekspresija				P vrednost
	slaba (n=9)		umerena (n=58)		
	A.S.	SD	A.S.	SD	
Ispod kolena L1	30.94	2.21	31.06	2.22	,885
Ispod kolena L2	32.78	2.05	32.89	2.15	,886
Ispod kolena D1	31.94	2.55	31.18	2.17	,340
Ispod kolena D2	33.33	2.12	33.07	1.86	,698
List L1	33.56	2.83	33.49	2.16	,937
List L2	35.89	2.71	35.69	1.71	,766
List D1	34.67	1.35	33.48	2.20	,123
List D2	36.83	.87	35.66	1.74	,053
Iznad gležnja L1	23.11	1.54	23.06	1.67	,932
Iznad gležnja L2	24.33	1.00	24.29	1.44	,936
Iznad gležnja D1	23.33	1.58	23.20	1.73	,824
Iznad gležnja D2	24.44	.88	24.29	1.61	,784
Gležanj L1	20.50	1.54	20.40	1.38	,837
Gležanj L2	21.61	1.41	21.47	.94	,706
Gležanj D1	20.44	1.59	20.49	1.42	,928
Gležanj D2	21.44	1.26	21.54	1.02	,794

L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posle operacije; CM-centrifugirana mast

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika. Jedino je razlika na samoj granici konvencionalnog nivoa značajnosti kada je u pitanju list desno posle operacije.

Sledeća analiza predstavlja faktor rasta VEGF u odnosu na iste parametre kao i u prethodnoj analizi. Rezultati analize su prikazani u tabeli 18.

Tabela 18. VEGF centrifugirane masti i obima potkolenice

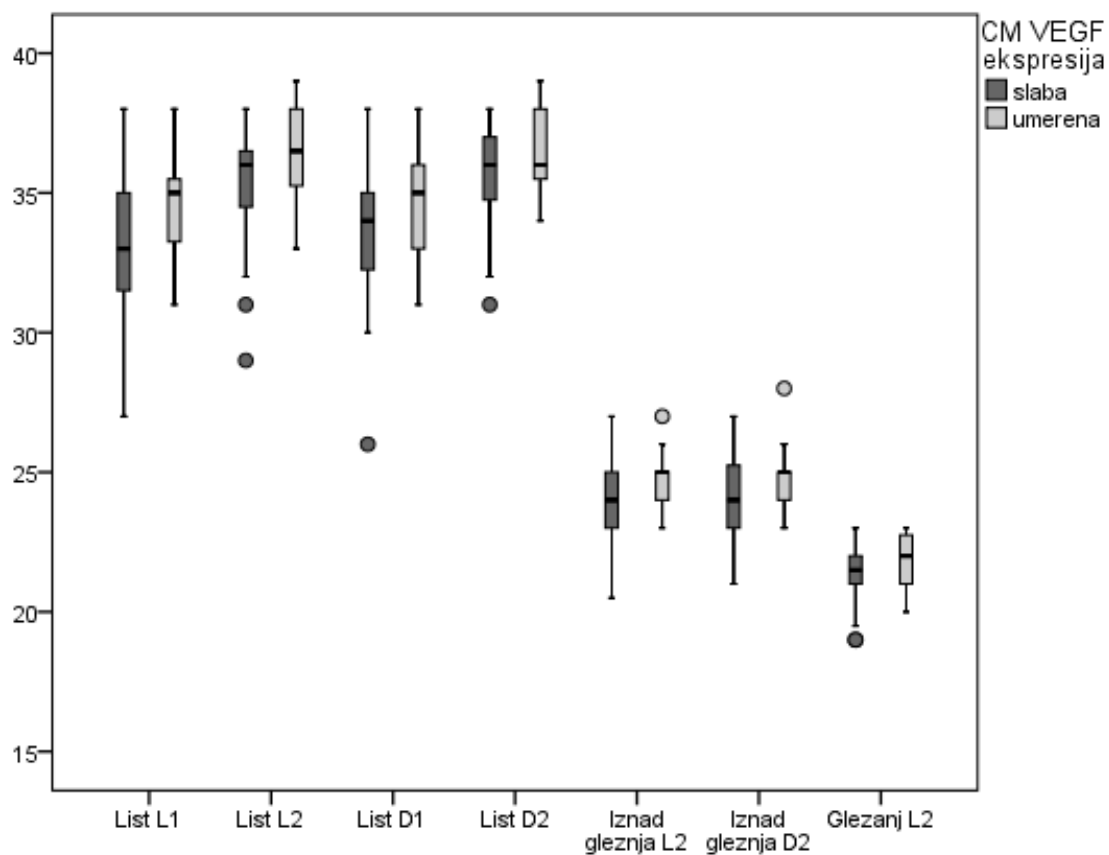
	CM VEGF ekspresija				p vrednost
	slaba (n=47)		umerena (n=20)		
	A.S.	SD	A.S.	SD	
Ispod kolena L1	31.11	2.30	30.90	2.00	,729
Ispod kolena L2	32.89	2.15	32.82	2.11	,905
Ispod kolena D1	31.40	2.35	31.00	1.89	,499
Ispod kolena D2	33.06	1.86	33.20	1.98	,788
List L1	33.06	2.31	34.53	1.67	,013
List L2	35.35	1.86	36.58	1.55	,012
List D1	33.31	2.18	34.43	1.87	,050
List D2	35.52	1.69	36.53	1.51	,025
Iznad gležnja L1	22.93	1.73	23.40	1.39	,281
Iznad gležnja L2	24.10	1.49	24.78	.98	,066
Iznad gležnja D1	23.02	1.78	23.67	1.43	,154
Iznad gležnja D2	24.07	1.63	24.87	1.10	,023
Gležanj L1	20.23	1.25	20.83	1.62	,111
Gležanj L2	21.34	1.00	21.85	.95	,056
Gležanj D1	20.36	1.36	20.78	1.59	,283
Gležanj D2	21.39	1.06	21.85	.96	,102

L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posle operacije; CM-centrifugirana mast

Za razliku od prethodne analize, ovde postoji dosta veći broj značajnih razlika. Te razlike odnose se na razliku između grupa po obimima lista levo i desno, pre i 6m nakon operacije, obimima iznad gležnja 6m nakon operacije levo i desno, gležanj levo 6m nakon operacije.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 7).

Grafikon 7. VEGF centrifugirane masti u odnosu na obime potkolenice



Legenda: L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2- 6m posle operacije

U daljoj analizi, analogno prethodnoj, analizirana je razlika između EGF-a i obima potkolenica (Tabela 19).

Tabela 19. EGF centrifugirane masti i obimi potkolenica pre op i 6m posle operacije

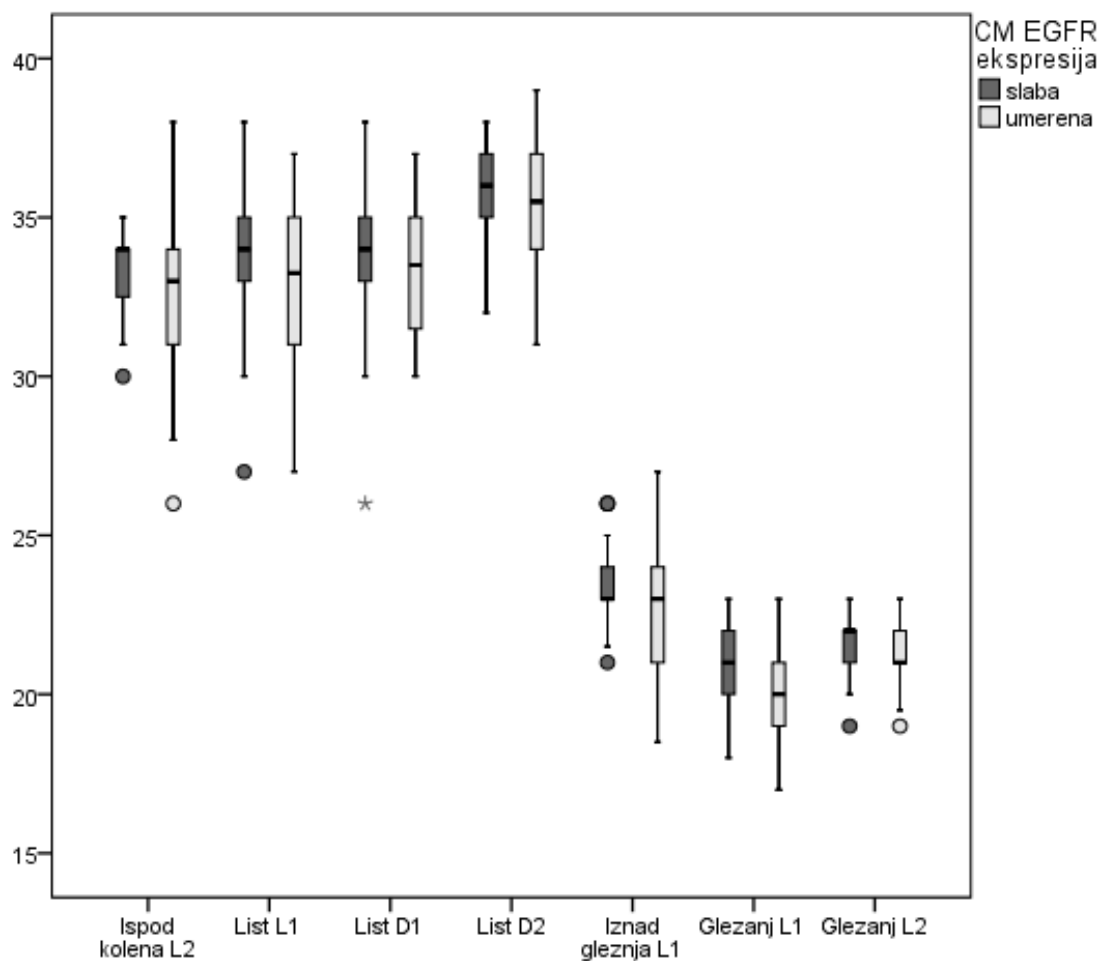
	CM EGF ekspresija				p vrednost
	slaba (n=33)		umerena (n=34)		
	A.S.	SD	A.S.	SD	
Ispod kolena L1	31.38	1.70	30.72	2.58	,224
Ispod kolena L2	33.33	1.22	32.43	2.67	,080
Ispod kolena D1	31.45	2.04	31.12	2.39	,538
Ispod kolena D2	33.44	1.22	32.78	2.32	,152
List L1	34.06	2.20	32.96	2.15	,042
List L2	36.06	1.75	35.38	1.90	,134
List D1	34.11	2.24	33.19	1.97	,080
List D2	36.24	1.42	35.41	1.84	,043
Iznad gležnja L1	23.42	1.30	22.72	1.86	,078
Iznad gležnja L2	24.44	1.21	24.16	1.55	,417
Iznad gležnja D1	23.47	1.61	22.97	1.77	,229
Iznad gležnja D2	24.50	1.27	24.13	1.74	,328
Gležanj L1	20.73	1.33	20.10	1.39	,065
Gležanj L2	21.74	.98	21.25	.98	,043
Gležanj D1	20.70	1.39	20.28	1.47	,236
Gležanj D2	21.74	.92	21.32	1.13	,101

L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posle operacije; CM-centrifugirana mast

Kao što se vidi iz tabele, značajne razlike između grupa su po listu levo pre operacije, listu desno 6m posle operacije, gležnju levo 6m posle operacije. Razlike koje su veoma blizu konvencionalnog nivoa značajnosti su između grupa po dimenzijama ispod kolena levo 6m posle operacije, listu desno pre operacije, iznad gležnja levo pre operacije, gležnja levo pre operacije.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 8).

Grafikon 8. EGF centrifugirane masti u odnosu na obime potkolenica



Legenda: L-levo; D-desno; 1-pre operacije; 2-6m posle operacije

4.13. Korelacija karakteristika centrifugirane masti i recipijentne regije

Dalja analiza obuhvatila je korelacionu analizu centrifugirane masti i recipijentne regije (Tabela 20).

Tabela 20. Korelacija karakteristika centrifugirane masti i recipijentne regije

CM		Količina (ml)	Površina ćelije	Broj KS/HPM	Prečnik KS	Površina KS
RR						
Površina ćelija	r	,064	,162	,060	,142	-,252
	p	,607	,190	,629	,252	,040
Broj KS/HPM	r	-,066	-,041	,127	-,362	-,168
	p	,597	,743	,305	,003	,174
Prečnik KS	r	-,151	-,235	-,043	,135	,057
	p	,222	,056	,732	,275	,649
Površina KS	r	,154	-,070	-,206	-,031	-,032
	p	,215	,576	,094	,805	,800

r – koeficijent Pirsonove linearne korelacije; p – signifikantnost; KS-krvni sud; CM-centrifugirana mast; RR-recipijentna regija

Na osnovu rezultata korelacione analize utvrđeno je da postoji značajna povezanost prečnika KS centrifugirane masti i broja KS recipijentne regije. Takođe, postoji značajna povezanost površine KS centrifugirane masti i površine ćelija recipijentne regije. Obe navedene korelacije su značajne, solidne jačine i negativnog smera.

Zatim je urađena komparacija centrifugirane masti i recipijentne regije i deskriptivna statistika i rezultati testiranja su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Razlika karakteristika centrifugirane masti i recipijentne regije

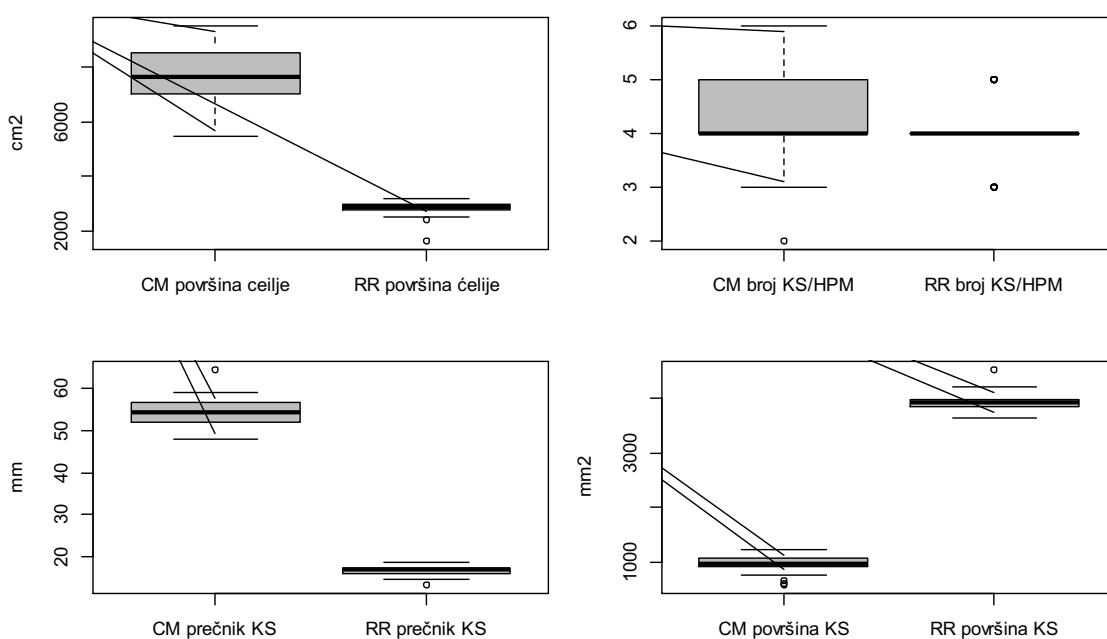
	Centrifugirana mast	Recipijentna regija	p vrednost ^a
Površina ćelije (μm^2)	7723.7±907.9	2850.5±233.3	<0.001
Broj KS/HPM	4.57±0.89	3.99±0.48	<0.001
Prečnik KS (μm)	54.33±3.18	16.56±1.06	<0.001
Površina KS (μm^2)	998.9±141.8	3916.4±132.8	<0.001

^at test za vezane uzorke

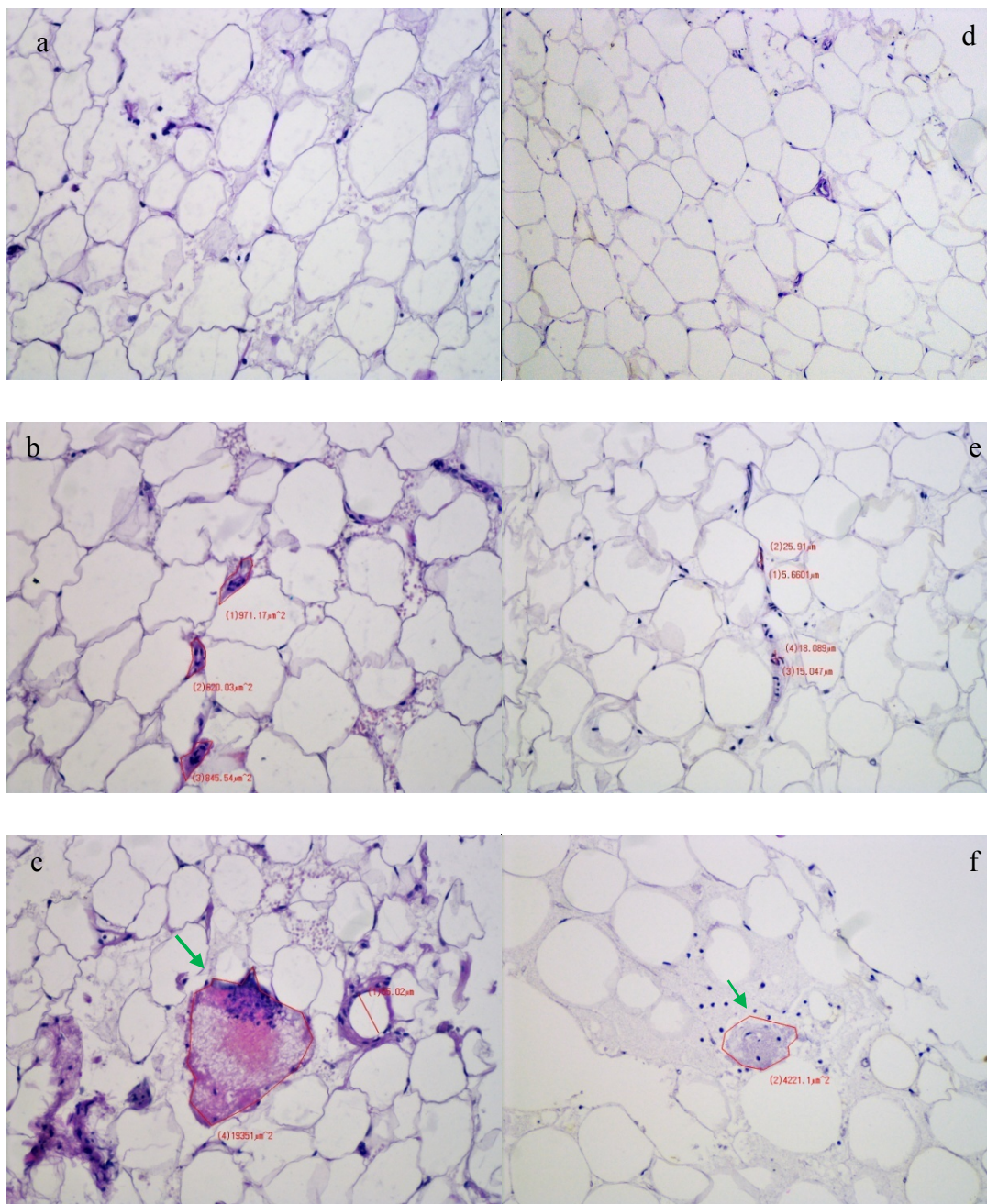
Iz tabele se vidi da su sve razlike statistički značajne. Naime, recipijentna regija ima tri puta manju površinu ćelije kao i prečnik ćelije. Ali, recipijentna regija ima četiri puta veću površinu KS, dok je broj krvnih sudova centrifugirane masti nešto veći od recipijentne regije.

Rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 9.).

Grafikon 9. Razlike centrifugirane masti i recipijentne regije



Legenda: CM-centrifugirana mast; RR-recipijentna regija; KS-krvni sud



Slika 18 (a-f). Razlike centrifugirane masti i recipijentne regije (HE, 100x): Lipociti u centrifugiranoj masti su diskohherentni, naboranih membrana, krvni sudovi su pojedinačni i sitni (a,b). Recipijentna mast pokazuje ćelijsku koheziju, glatke membrane ćelija i vaskularni sincicijum u intersticijumu (d,e). Fokusi nekroze u recipijentnoj masti su značajno manji. (strelice)

4.14. Odnos ekspresije faktora rasta recipijentne regije i karakteristika centrifugirane masti

U tabeli 22. prikazana je deskriptivna i analitička statistika odnosa ekspresije faktora rasta recipijentne regije i karakteristika centrifugirane masti.

Tabela 22. Ekspresija faktora rasta recipijentne regije i karakteristika centrifugirane masti

Centrifugirana mast (CM)	Ekspresija faktora rasta RR			p vrednost ^a
	Slaba	Umerena	Izražena	
PDGF RR (n) ^b	1	37	29	
Količina (ml)	170	161.32±76.07	151.59±73.32	0.602
Površina ćelije (μm ²)	8559.6	7806.3±889.9	7589.6±933.9	0.340
Broj KS/HPM	4.00	4.65±0.82	4.48±0.99	0.459
Prečnik KS (μm)	55.03	54.39±3.41	54.23±2.98	0.844
Površina KS (μm ²)	1186.8	999.1±116.9	992.2±169.0	0.846
VEGF RR (n)	15	52		
Količina (ml)	165.00±68.92	155.00±75.78		0.648
Površina ćelije (μm ²)	7454.1±974.9	7801.5±882.2		0.194
Broj KS/HPM	4.80±0.77	4.50±0.92		0.254
Prečnik KS (μm)	54.19±3.29	54.37±3.18		0.847
Površina KS (μm ²)	1032.9±137.5	989.1±142.9		0.295
EGF RR (n)	59	8		
Količina (ml)	164.39±71.88	104.50±71.28		0.030
Površina ćelije (μm ²)	7692.8±925.9	7952.2±775.1		0.452
Broj KS/HPM	4.59±0.89	4.38±0.92		0.520
Prečnik KS (μm)	54.47±3.18	53.33±3.22		0.346
Površina KS (μm ²)	996.9±135.6	1013.7±192.6		0.755

^at test; n-broj uzoraka; ^bZa PDGFR nije testirana kategorija slaba (samo 1 pacijent); RR-recipijentna regija

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da su razlike između kategorija ekspresije faktora rasta recipijentne regije po karakteristikama centrifugirane masti bez statističke značajnosti, osim kada je u pitanju količina centrifugirane masti i EGF faktor rasta recipijentne regije. Naime, postoje određene razlike kada je u pitanju površina ćelije,

ali konvencionalni nivo statističke značajnosti nije dostignut. Obzirom da PDGF ima tri kategorije, paralelno je urađena i Spirmanovakorelaciona analiza ali su korelacioni koeficijenti u rasponu od -0.123 do 0.007 i svi su bez statističke značajnosti što samo potvrđuje prethodnu analizu (međugrupne razlike).

4.15 Faktori rasta centrifugirane, proprane i recipijentne regije

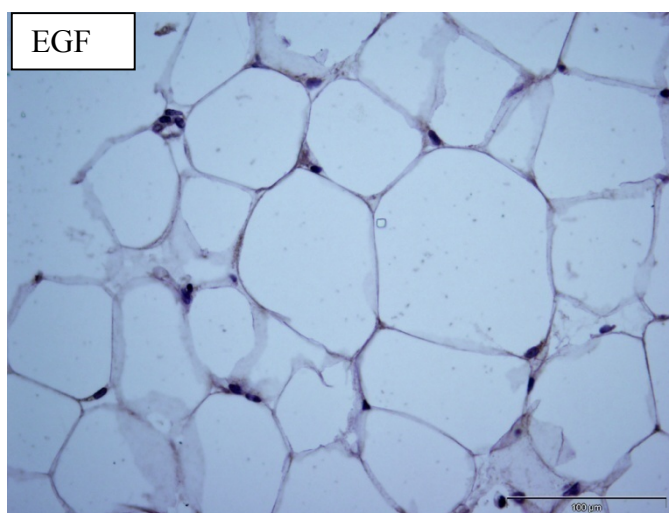
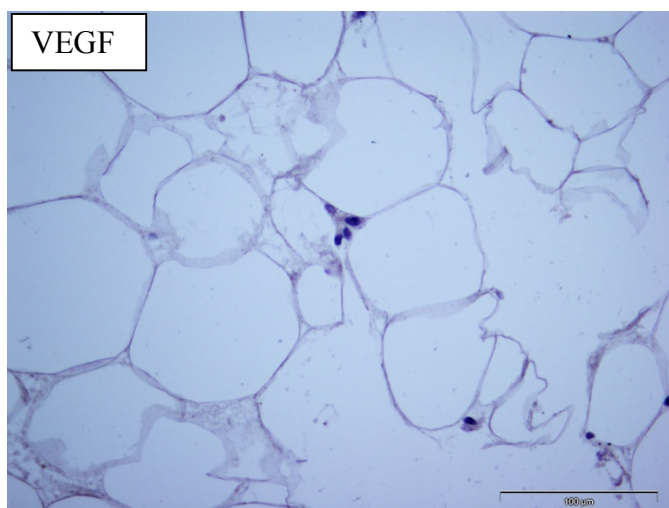
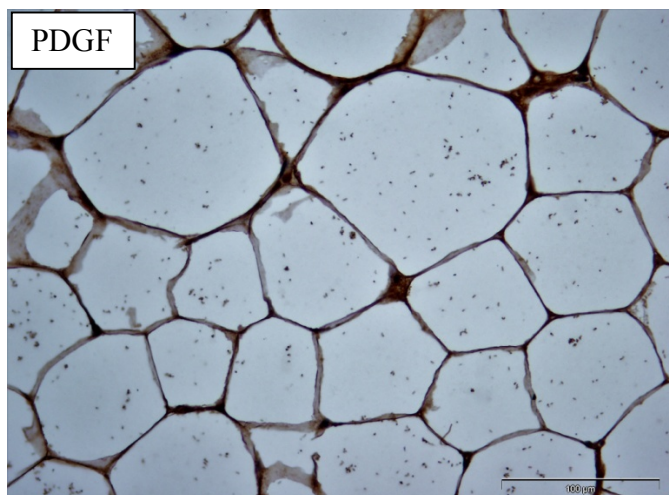
Distribucija pacijenata u odnosu na ekspresiju faktora rasta (PDGF, VEGF i EGF) prikazana je u tabeli 23.

Tabela 23. Ekspresija faktora rasta u različitim uzorcima

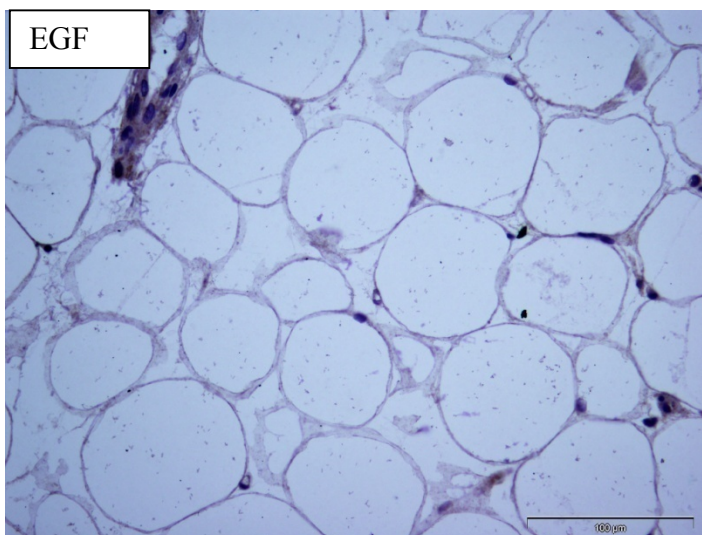
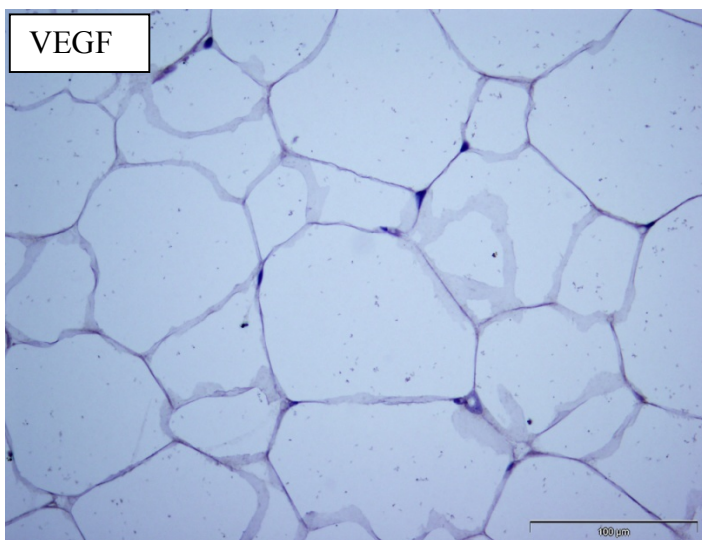
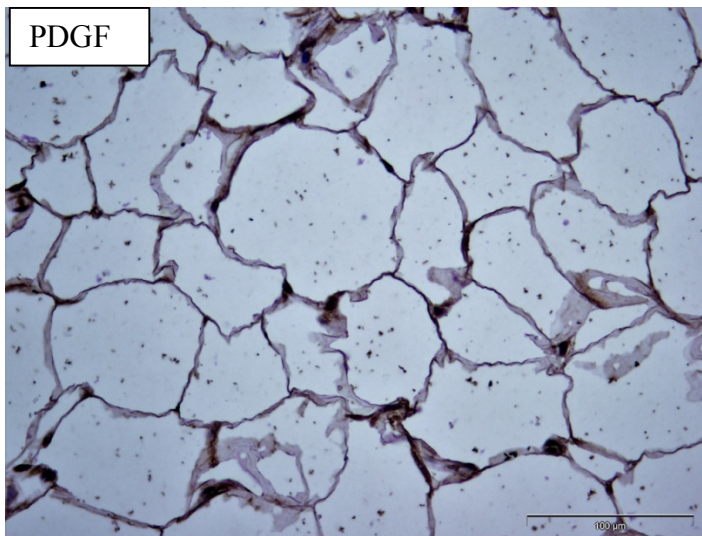
		bez	slaba	umerena	izražena
CM PDGF	N		9	58	
	%		13,4%	86,6%	
CM VEGF	N		47	20	
	%		70,1%	29,9%	
CM EGF	N		33	34	
	%		49,3%	50,7%	
PM PDGF	N	2	60	5	
	%	3,0%	89,6%	7,5%	
PM VEGF	N	49	18		
	%	73,1%	26,9%		
PM EGF	N	57	10		
	%	85,1%	14,9%		
RR PDGF	N		1	37	29
	%		1,5%	55,2%	43,3%
RR VEGF	N		15	52	
	%		22,4%	77,6%	
RR EGF	N		59	8	
	%		88,1%	11,9%	

CM-centrifugirana mast; PM-proprana mast; RR-recipijentna regija

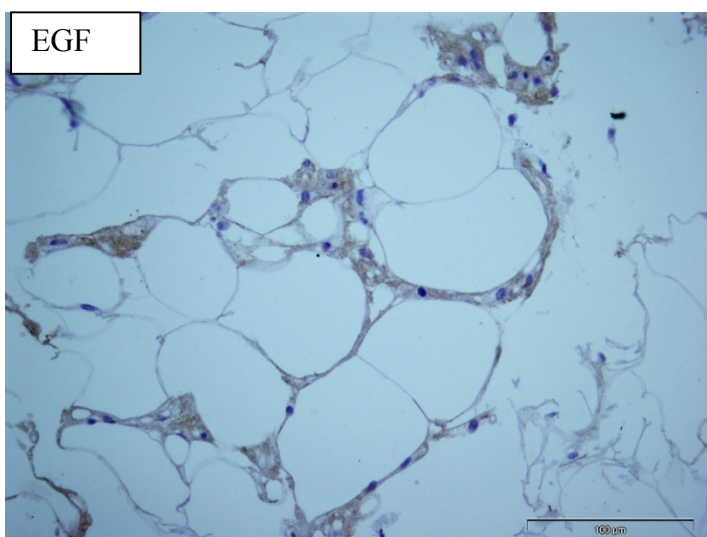
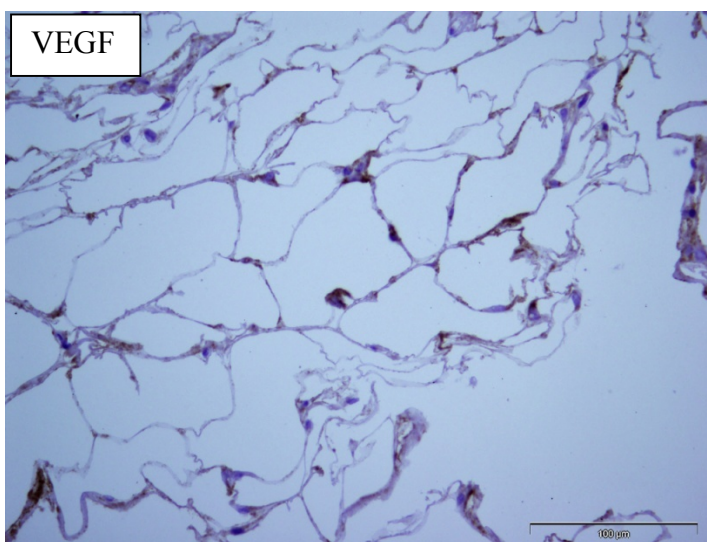
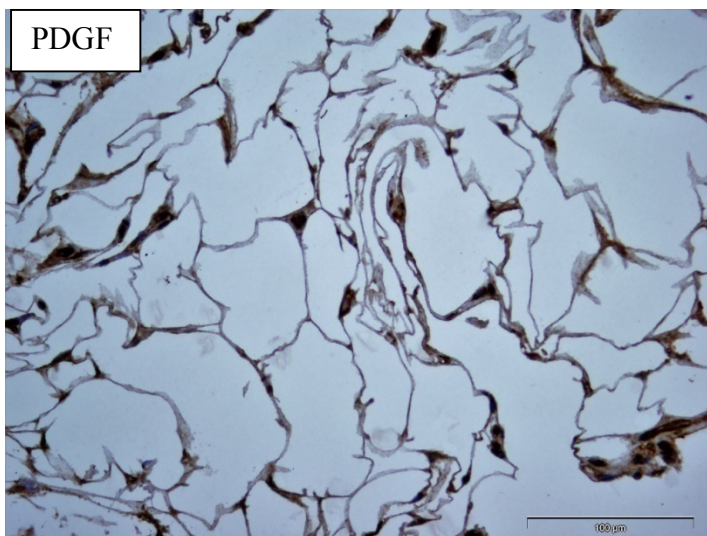
Iz tabele se vidi da je najveći procenat pacijenata sa slabom, a zatim umerenom ekspresijom. Pojedini pacijenti nemaju ekspresiju faktora rasta u propranoj masti; najveće je odsustvo EGF-a najmanje PDGF-a. PDGF ima izraženu ekspresiju u recipijentnoj regiji.



Slika 19. Ekspresija faktora rasta u centrifugiranoj masti (IHH, 400x): Ispitivani faktori rasta pokazuju umerenu ekspresiju. A najzastupljenji je PDGF.



Slika 20. Ekspresija faktora rasta u propranoj masti (IHH, 400x): Ekspresija faktora rasta je najvećem broju uzoraka bila slabog intenziteta. Najmanje je bio zastupljen EGF.



Slika 21. Ekspresija faktora rasta u recipijentnoj masti (IHH, 400x): Primećeno je značajno povećanje ekspresije svih faktora rasta u odnosu na donorsku mast.

Sledeće tabele predstavljaju distribuciju faktora rasta centrifugirane masti irecipijentne regije (Tabela 24, 25, 26).

Tabela 24. Odnos ekspresije PDGF faktora rasta u centrifugiranoj masti i recipijentnoj regiji

			RR PDGF			Ukupno
			slaba	umerena	izražena	
CM PDGF	slaba	N	0	5	4	9
		%	0,0%	55,6%	44,4%	100,0%
	umerena	N	1	32	25	58
		%	1,7%	55,2%	43,1%	100,0%
Ukupno	N	1	37	29	67	
	%	1,5%	55,2%	43,3%	100,0%	

CM-centrifugirana mast: RR-recipijentna regija

Na osnovu dobijenih rezultata se vidi da se uvećini uzoraka količina faktora rasta održava ili se povećava. Statističkom analizom je utvrđeno da je ova promena visoko statistički značajna ($Z=-5,365$; $p<0,001$).

Tabela 25. Odnos ekspresije VEGF faktora rasta u centrifugiranoj masti i recipijentnoj regiji

			RR VEGF		Ukupno
			slaba	umerena	
CM VEGF	slaba	N	9	38	47
		%	19,1%	80,9%	100,0%
	umerena	N	6	14	20
		%	30,0%	70,0%	100,0%
Ukupno	N	15	52	67	
	%	22,4%	77,6%	100,0%	

CM-centrifugirana mast: RR-recipijentna regija

Na osnovu dobijenih rezultata se vidi da u velikom procentu uzoraka ekspresija VEGF postaje intenzivnija (menja se od slabe ka umerenoj). Statističkom analizom je utvrđeno da je ova promena visoko statistički značajna ($Z=-4,824$; $p<0,001$).

Tabela 26. Odnos ekspresije EGF faktora rasta u centrifugiranoj masti i recipijentnoj regiji

		RR EGF		Ukupno	
		slaba	umerena		
CM EGF	slaba	N	31	2	33
		%	93,9%	6,1%	100,0%
	umerena	N	28	6	34
		%	82,4%	17,6%	100,0%
Ukupno	N	59	8	67	
	%	88,1%	11,9%	100,0%	

CM-centrifugirana mast: RR-recipijentna regija

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da u najvećem procentu uzoraka količina ekspresije EGF-a se nemenja odnosno ekspresija je slabog intenziteta. Takođe utvrđeno je da postoji promena umerene ekspresije u slabu ekspresiju kod pojedinih uzoraka. Statističkom analizom je utvrđeno da je ova promena statistički značajna ($Z=-4,747$; $p<0,001$).

Distribucija uzoraka pacijenata u odnosu na promenu ekspresije faktora rasta je prikazana u tabeli 27.

Tabela 27. Distribucija u odnosu na promenu ekspresije faktora rasta

		smanjenje	nepromenjeno	povećanje
PDGF	N	1	32	34
	%	1,5%	47,8%	50,7%
VEGF	N	6	23	38
	%	9,0%	34,3%	56,7%
EGF	N	28	37	2
	%	41,8%	55,2%	3,0%

Na osnovu distribucije, PDGF i VEGF kod polovine pacijenata raste, dok EGF kod nešto manje od polovine pacijenata ima smanjenje.

Dalja analiza predstavlja deskriptivnu statistiku promene ekspresije faktora rasta u odnosu na promene obima potkolenice (Tabela 28., Tabela 29., Tabela 30).

Tabela 28. Promena ekspresije faktora rasta PDGF u odnosu na promenu obima potkolenice

Promena obima u cm	PDGF ekspresija			p vrednost ^a	Rho ^b
	Smanjenje (n=1)	Nepromenjeno (n=32)	Povećanje (n=34)		
Ispod kolena L	3.0	1.9±1.5	1.7±1.2	0.642	-0.123
Ispod kolena D	2.5	1.7±1.2	1.9±1.7	0.685	-0.049
List L	3.0	2.4±1.7	2.0±1.4	0.307	-0.146
List D	2.0	2.3±1.5	2.1±1.3	0.637	-0.050
Iznad gležnja L	2.0	1.4±1.3	1.0±1.1	0.226	-0.139
Iznad gležnja D	1.0	1.3±1.3	1.0±1.1	0.305	-0.091
Gležanj L	0	1.1±1.1	1.1±1.0	0.972	0.067
Gležanj D	0	1.1±0.9	1.0±0.9	0.878	0.022

^aRezultati t test između kategorija nepromenjeno i povećanje ^bKoeficijentSpirmanove korelacije (nema značajnih korelacija)

Na osnovu dobijenih rezultata se vidi da je prosečna promena obima slična kod pacijenata sa nepromenjenom ekspresijom i sa povećanjem. Čak su pacijenti sa povećanjem ekspresije imali nešto manje prosečne promene obima potkolenice, ali ova razlika nije statistički značajna. S obzirom da samo jedan pacijent ima smanjenje, on nije uzet u analizu. Isti zaključak dobija se i kada se uradi Sprimanovakorelaciona analiza i kada se uzmu sve tri kategorije promene ekspresije. Naime, korelacioni koeficijenti kreću se od -0.146 do 0.067 i nijedna korelacija nije statistički značajna.

Tabela 29. Promena ekspresije faktora rasta VEGF u odnosu na promenu obima potkolenice

Promena obima u cm	VEGF ekspresija			p vrednost ^a	Rho ^b
	Smanjenje (n=6)	Nepromenjeno (n=23)	Povećanje (n=38)		
Ispod kolena L	1.3±2.4	2.2±1.0	1.7±1.3	0.261	-0.136
Ispod kolena D	1.8±1.2	1.9±1.3	1.7±1.6	0.894	-0.106
List L	1.3±1.4	2.5±1.4	2.2±1.6	0.220	0.026
List D	1.4±1.1	2.2±1.3	2.3±1.5	0.368	0.094
Iznad gležnja L	1.5±0.8	1.4±1.3	1.1±1.2	0.438	-0.163
Iznad gležnja D	1.4±1.0	1.1±1.4	1.1±1.0	0.785	-0.007
Gležanj L	1.2±1.7	1.0±1.1	1.1±0.9	0.965	0.039
Gležanj D	1.6±1.4	0.9±0.9	1.0±0.8	0.266	-0.013

^aRezultati ANOVA testa ^bKoeficijentSpirmanove korelacije (nema značajnih korelacija)

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da nema značajnih razlika između VEGF promena po promenu obima potkolenice. Ali, evidentno je da postoje određene razlike u pojedinim nivoima potkolenice. Korelacionom analizom je utvrđeno da se korelacioni koeficijenti kreću između -0.163 i 0.094, ali bez značajnosti.

Tabela 30. Promena ekspresije faktora rasta EGF u odnosu na promenu obima potkolenice

Promena obima u cm	EGFR ekspresija			p vrednost ^a	Rho ^b
	Smanjenje (n=28)	Nepromenjeno (n=37)	Povećanje (n=2)		
Ispod kolena L	1.6±1.5	2.0±1.2	2.3±2.5	0.272	0.138
Ispod kolena D	1.7±1.3	1.9±1.6	1.5±2.1	0.521	0.016
List L	2.6±1.6	1.9±1.5	2.0±0	0.084	-0.198
List D	2.2±1.4	2.1±1.4	2.0±0	0.813	-0.064
Iznad gležnja L	1.6±1.3	1.0±1.1	1.3±0.4	0.049	-0.258*
Iznad gležnja D	1.3±1.3	0.9±1.1	1.8±0.4	0.297	-0.096
Gležanj L	1.1±1.1	1.1±0.9	0.5±2.1	0.865	-0.017
Gležanj D	1.1±0.9	1.0±0.9	1.0±2.1	0.953	0.001

^aRezultati t testa između kategorija smanjenje i nepromenjeno ^bKoeficijentSpirmanove korelacije (*p<0.05)

Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da postoji značajna razlika između kategorija nepromenjeno i povećanje. Isti zaključak dobijen je i korelacionom analizom. Praktično, što je ekspresija išla u pravcu smanjenja, to je promena obima potkolenice bila veća.

5. DISKUSIJA

Prema našim saznanjima, do sada nema istraživanja koja su se bavila komparativnom analitikom procene preživljavanja masti in vivo na pacijentima, niti da su primenjivani savremeni koncepti sagledavanja ovog problema. Istraživanje je koncipirano kao klinička, studija preseka i dalo je rezultate vezane za ispitivanje preživljavanja adipocita u potkolenici 6 meseci (6m) nakon implantacije.

Rezultati istraživanja ukazuju na to da je došlo do značajne promene obima na svim nivoima potkolenica i da je ona povezana sa količinom infiltrirane masti. Pacijente koje smo pratili tehnikama vizuelizacije fotografisanjem i magnetnom dijagnostikom pre i 6m posle operacije, pokazali su promenu obima potkolenica i vizuelno prisustvo masnog tkiva po tipu podebljavanja potkožnog masnog tkiva i prisustva masti između mišićni grupa i mišićnih vlakana. Takođe, histološkim ispitivanjima i histometrijskim merenjima se ukazalo na različitost ćeliskih karakteristika između proprane i centrifugirane masti sa jedne strane i sa druge strane masnih ćelija u recipijentnoj regiji. Utvrđeno je da pojedine karakteristike krvnih sudova imaju značaj na preživelu mast u recipijentnoj regiji. Ćelije u recipijentnoj regiji su manje površinom ali površina krvnih sudova je veća. Imuno-histohemijska bojenja na ekspresiju trombocitnog faktora rasta (PDGF), vaskularno endotelnog faktora rasta (VEGF) i epidermalnog faktora rasta (EGF) su pokazala da starost i agresivnija manipulacija masnim tkivom u toku pripremanja za injektiranje i implantaciju, menja ekspresiju svih ispitivanih faktora rasta. Takođe, ispitivanjem masnog tkiva uzetog iz recipijentnog regiona je utvrđeno da u procesu preživljavanja dolazi do značajne promene ekspresije faktora rasta. Ali, da promena ekspresije faktora rasta ne utiče na samu promenu obima potkolenica sem epidermalnog faktora rasta EGF.

U našem kliničkom ispitivanju učestvovalo je 67 ispitanika ženskog pola od 20 do 54 godina, prosečne starosti $38,9 \pm 10,3$ godina. Svim ispitanicima je merena telesna masa i indeks telesne mase, obimi potkolenice u četiri nivoa i svi pacijenti su vizuelno praćeni fotografisanjem pre operacije i 1m, 3m, i 6m posle operacije. Studija je rađena multidisciplinarnim pristupom koji je uključivao klinički nalaz, radiološka, histološka, morfometrijska i imuno-histohemijska ispitivanja uz statističku analizu koja je rađena na

merama pre operacije i 6m posle operacije. Prosečna telesna masa je iznosila $62,78 \pm 7,36$ kg, a posle 6m je iznosila $61,82 \pm 7,09$ kg, dok je prosečni indeks telesne mase pre operacije iznosio $26,43 \pm 4,81 \text{ kg/m}^2$ a 6m nakon operacije $25,68 \pm 4,38 \text{ kg/m}^2$ (Tabela 1.) Iako nije bilo većeg odstupanja u promeni telesne mase niti u samom indeksu telesne mase ovo smanjenje se smatra visoko statistički značajnim $p < 0,001$.

Od ukupne količine aspirirane masti koja je u proseku iznosila $1012,5 \pm 428,7 \text{ ml}$ su odvojene količine proprane masti prosečno $387,24 \pm 228,47 \text{ ml}$, koja se injektirala u mišiće lista i centrifugirane masti u proseku $157,24 \pm 73,91 \text{ ml}$, koja je injektirana u potkožu u svim nivoima potkolenice. Njihove morfološke i funkcionalne karakteristike su prikazane u tabela 2.

Analiza dobijenih rezultata podrazumevala je deskriptivnu, semikvantitativnu i kvantitativnu komparaciju morfoloških i funkcionalnih karakteristika reprezentativnih uzoraka proprane, centrifugirane i recipijentne masti.

Prosečna površina ćelija proprane masti je iznosila $9946,59 \pm 1113,67 \mu\text{m}^2$, centrifugirane $7723,76 \pm 907,94 \mu\text{m}^2$, a masne ćelije iz recipijentnog regiona $2850,46 \pm 233,28 \mu\text{m}^2$. Kod pripreme masti površina ćelije se menjala u zavisnosti od agresivnosti obrade. Stoga pri grubljoj manipulaciji površina ćelije se smanjuje, kao i broj i površina krvnih sudova, dok prečnik krvnih sudova ostaje isti. Takođe svi faktori rasta pokazuju veću ekspresivnost sa povećanjem agresivnosti obrade masti. Morfološki i funkcionalni prikaz masti uzete nakon 6m iz recipijentnog regiona govori u prilog razvoja mladih adipocita. U recipijentnom tkivu prisutni su adipociti manje površine, manji broj i prečnik krvnih sudova čija je površina znatno veća nego kod centrifugirane masti. Takođe i ekspresivnost VEGF i PDGF u recipijentnom tkivu je povećana, a EGF smanjena.

Pojedinačnom deskriptivnom analitikom obrađivanih uzoraka masnog tkiva, pokazano je da ćelije proprane masti imaju najveću prosečnu površinu $9946,59 \pm 1113,67 \mu\text{m}^2$. U propranoj masti je broj krvnih sudova $6,18 \pm 0,74 \text{ KS/HPM}$, njihov prečnik je $54,38 \pm 2,75 \mu\text{m}$, a njihova prosečna površina je iznosila $1,622,7 \pm 432,3 \mu\text{m}^2$ (Tabela 3). Takođe, u tabeli 3. Prikazana je prosečna ukupna količina injektirane proprane masti za obe potkolenice, $387,24 \pm 228,47 \text{ ml}$, koja je injektirana cirkumferentno u mišiće lista. Proprana mast je mikroskopski očuvane histološke građe, ćeliska membrana je jasna

u kontinuitetu. Jedra su vijabilna, očuvane prebojenosti i periferno postavljena. Mestimično se uočavaju mikroskopska polja nekroze. Vaskularni elementi redukovani, endotel vijabilan. (Slika 10.).

Funkcionalno ispitivanje na ekspresiju faktora rasta je prikazano u tabeli 4. gde se se vidi da je kod 89,6% uzoraka prisutna slaba ekspresija PDGF; VEGF nije prisutan kod 73,1% ispitanika, a EGF 85,1%, što ukazuje da minimalna manipulacija masti prilikom propiranja nije podstakla izlučivanje faktora rasta u uzorku proprane masti.

U uzorku centrifugirane masti prikazano u tabeli 5. ćelije su manje površine $7723,7 \pm 907,9 \mu\text{m}^2$, manji je i prosečan broj krvnih sudova $4,57 \pm 0,89 \text{KS/HPM}$ i njihova površina $998,9 \pm 141,9 \mu\text{m}^2$ od proprane masti, ali je prosečan prečnik krvnih sudova gotovo jednak kao kod proprane masti $54,33 \pm 3,18 \mu\text{m}$. Međutim priprema centrifugirane masti procesom centrifugiranja na 2700rpm dovodi do pražnjenja masne ćelije od triglicerida, smežuravanja ćeliske membrane i smanjivanja vaskularnog prostora (Slika 11.). Histološki se uočavaju lobulusi delom očuvanog, a delom oštećenog masnog tkiva. Lipociti neznatno variraju u veličini i obliku sa značajno naboranom ćelijskom membranom. Jedra su očuvana, vidljiva, lateralno postavljena. U uzorku se uočavaju mikroskopski fokusi nekroze. Vaskularni elementi su prisutni, očuvane širine lumena i debljine zida uz očuvani vijabilni endotel. Smanjivanje vaskularnog prostora sa eksudacijom eritrocita i drugih krvnih produkata se odvaja u špricu kao poseban sloj (Slika 7b.), kao posledica toga dolazi do smanjivanje broja i površine krvnih sudova, čiji dijametri ostaju isti. Postupak agresivnije obrade masnog tkiva i pokretanje eksudacionog procesa kako iz vaskularnog odeljka tako i iz ćelije adipocita, koji se manifestuje oslobađanjem triglicerida i definisanjem uljanog sloja u špricu, stimuliše porast ekspresije faktora rasta. Za razliku od proprane masti koja je prevažodno bila sa slabom ekspresijom PDGF, kod centrifugirane masti je bila zastupljena umerena ekspresija PDGF kod 86,6% ispitanika (Tabela 6.). Vaskularni endotelni faktor rasta se slabo ekspimiraju kod 70,1%, a umereno kod 29,1% ispitanika kod uzorka centrifugirane masti, za razliku od proprane gde nije bilo ekspresije. Procesom centrifugiranja došlo je i do porasta epidermalnog faktora rasta koji nije bio prisutan u propranoj masti. U centrifugiranoj masti EGF je pokazao slabu ekspresiju kod 49,3% i umerenu kod 50,7% ispitanika (Slika 12.).

Analogno centrifugiranoj i propranoj masti, šest meseci nakon operacije je uzet uzorak masnog tkiva iz potkože na histološku i imunohistohemisku analizu i to je predstavljeno kao masno tkivo iz recipijentnog regiona. Da su zastupljene mlade ćelije u recipijentnoj regiji pokazano je u tabeli 7. jer je njihova površina adipocita znatno manja nego kod centrifugirane i proprane masti i prosečno iznosi $2850,4 \pm 233,3 \mu\text{m}^2$. Neznatno je manji prosečan broj krvnih sudova $3,99 \pm 0,48$ KS/HPM od centrifugirane masti. Dosta manji prečnik krvnih sudova $16,56 \pm 1,06 \mu\text{m}$, sa mnogostruko većom površinom $3916,4 \pm 132,9 \mu\text{m}^2$, koja je distribuirana u tkivu, govori o mladom preživlom i dobro vaskularizovanom masnom tkivu u recipijentnom regionu. (Slika 13.).

Proces obrade i injektiranje masti kao slobodnog grafta u dobro vaskularizovan region potkolenice je dovelo i do značajnog porasta faktora rasta (Tabela 8.) Slaba i umerena ekspresija PDGF u centrifugiranoj masti je u recipijentnoj regiji umerena kod 55,2% i intezivna kod 43,3% ispitanika. Vaskularni endotelni faktor rasta je takođe pokazao povećanje ekspresije u okviru istih grupa slabe i umerene, s'tim da je skok sa 70,1% slabe ekspresije u centrifugiranoj masti, pojačao ekspresiju na 77,6% umerene ekspresije u recipijentnom regionu. Međutim, podjednaka zastupljenost slabe i umerene ekspresije epidermalnog faktora rasta u centrifugiranoj masti je pokazala znatni pad na slabu ekspresiju u 88,1% ispitanika. Dobijeni rezultati govore u prilog tome da EGF, između ostalog, stimuliše pojačanu sekreciju kolagenaze koja uvodi tkivo u ožiljavanje, a u uzorku masti iz recipijentnog regiona je jasno pokazano da nema povećanog prisustva fibrocita ili pojačane sinteze kolagena (Slika 14.)

Prikazani histološki parametri odgovaraju prvom laboratorijskom delu studije i u drugom delu istraživanja su korelirani sa epidemiološko-antropološkim karakteristikama pacijenata. Korelaciju smo započeli ispitivanjem uticaja starosti pacijenata na karakteristike masnog tkiva u recipijentnom regionu (Tabela 9.). U studiji smo pokazali da starost nema uticaja na morfologiju masti ali da postoji značajna razlika u ekspresiji VEGF i EGF, odnosno funkcionalnosti masnog tkiva. Umerena ekspresija VEGF je bila veća kod starijih pacijenta $p=0,006$, dok je ekspresija epidermalnog faktora rasta EGF sa povećanjem godina bila manja $p=0,013$ (Tabela 10.), što je prikazano i u grafikonu 1.

Pitanje koje okupira pažnju mnogih istraživača, pa i nas je „Kolika je količina masti neophodna za uvećanje pojedinih regiona potkolenica kao i kolika je promena

obima u pojedinačnim regionima potkolenice?" (Tabela 11.). Količina masti koja je infiltrirana u potkolenice određivana je po kliničkim indikacijama: stepen elasticiteta tkiva recipijentnog regiona, elasticitet mišića, fascija, potkoža i koža, mast je infiltrirana dokle god nije bila ugrožena cirkulacija ili region nije promenio boju. Shodno tome, desna strana potkolenice je uvek primala manju količinu masti, a promena obima je bila ista (Grafikon 2.i 3.) Sve promene obima su pokazivale visoki nivo značajnosti $p < 0,001$. U našem istraživanju se pokazalo da je uvećanje pojedinih regiona potkolenice, na šestomesečnoj kontroli, u značajnoj povezanosti sa preoperativnim obimom i količinom infiltrirane masti u većini ispitivanih regiona (Tabla 12.). Shodno tome, uvećanje obima je bilo značajno povezano ne samo sa preoperativnim obimom, već i količinom infiltrirane masti u svim regionima osim iznad gležnja i gležanj levo (Grafikon 4.). Što je pojedinačni obim potkolenice bio manji, uvećanje je bilo veće i što je bila veća količina ubačene masti, imali smo veći i obim. Pojedinačni obimi su začano bili veći u onim situacijama kada su se popunjavale potkolenice u svim regionima (ispod kolena, list, iznad gležnja, gležanj), nego kod onih kod kojih su se popunjavali samo pojedinačni regioni (Grafikon 4.)

Vizuelno praćenje rezultata promene oblika i obima kroz fotodokumentaciju pre i 6m posle operacije, kao i verifikacija prisustva masnog tkiva putem magnetne rezonance je prikazano na (Slika 15., Slika 16., Slika 17.).

Pacijent (Slika 15.) preoperativno se vidi na slici „AP pre” nedostatak unutrašnje i spoljašnje konture potkolenice čitavom dužinom koja nije u skladu sa kolenom i konturom natkolenice. U „PP” prikazu zadnje strane vidi se mišićna hipoplazija obe glave *m. gastrocnemius*-a i *m. soleus*-a, što se uočava i na aksijalnim presecima magnetne rezonance u „Aksijani presek - AP pre” i „Aksijani presek - AP pre1”. Na slikama „AP 6m post” se uočavaju izraženije konture kako spoljašnje tako i unutrašnje linije potkolenice koje prate liniju kolena i natkolenice. Na prikazu zadnje strane „PP 6m post” uočava se bolja mišićna popunjenost i izražena definicija obe glave *m. gastrocnemius*-a, što je verifikovano na aksijalnim presecima snimaka magnetne rezonance. „Aksijani presek - 6m posle” i „Aksijani presek - 6m posle1.” potvrđuje trakasto prisustvo masnog tkiva unutar mišićnih vlakana. Na koronarnim presecima „CP 6m posle” i „CP 6m posle1.”, uočava se u potkožnom sloju veća količina masnog tkiva nego na prikazu „CP pre” i „CP pre1”.

Pacijent (Slika 16.) na preoperativnim fotografijama se vidi na slici „AP pre” nedostatak spoljašnje konture ispod kolena, iznad gležnja i gležanj kao i cela dužina unutrašnje konture potkolenice. Izražena vidljivosti površinskog venskog sistema govori o slabo razvijenom potkožnom masnom sloju. Sa zadnje strane slika „PP pre” vidi se hipoplazija unutrašnje glave *m. gastrocnemisu*-a i *m. soleus*-a. Popunjavanjem ispod kolena cirkumferentno, iznad gležnja i gležanj kao i mišića unutrašnje glave *m. gastrocnemius*-a i *m. soleus*-a se dobio bolji linijski sklađ kolena i natkolenice sa potkolenicom prikazano na slici „AP 6m post” i „PP 6m post”. Na prikazu magnetne rezonance u „Aksijalnom preseku - 6m post” i koronarnom „CP 6m” post se vidi prisustvo inter- i intramuskularno masti, a što se neuočava na slikama magnetne rezonance u „Aksijalni presek pre” i „Aksijalni presek pre I.” i koronarnim presecima „CP pre” i „CP pre I”. U magnetnoj dijagnostici se često koristi sprečavanje signala masnog tkiva FS (engl. *Fat suppression*) kada diferencijalno dijagnostički želi da se isključi prisustvo ovog tkiva. Da bi potvrdili prisustvo masti, signal prisustva masti je sprečavan, što je prikazano na slikama „Aksijalni presek FS 6m post I” i koronarnog „CP FS 6m post I”. Rastojanje koje je mast zauzimala merena je u kompjuterskom programu i iznosila je od 9,7 do 14,3mm na pojedinim mestima.

Pacijent (Slika 17.) preoperativno se vidi nedostatak potkožnog sloja očuvanost konture u nivou lista, nedostatak konture ispod kolena, iznad gležnja i gležanj spolja i iznutra kao, prikazano na fotografiji „AP pre”, a hipoplastični izgled muskulature je prikazan na fotografiji „PP pre”. Promena izgleda spoljašnje linije potkolenice kao i popunjavanje i preoblikovanje unutrašnje linije prikazano je na fotografiji „AP 6m post”. Takođe se vidi i bolji kavalitet kože. Na fotografiji „PP 6m post” se uočava bolja popunjenost mišića i uspostavljanje antropološkog sklada čitavom dužinom potkolenice. Na slikama magnetne rezonance u koronarnim presecima „CP 6m post” i „CP 6m post I”, uočava se prisustvo masti u mišićima u obliku „pera” između mišićnih vlakana. Dok na „Aksijalni presek - 6m post” i „Aksijalni presek - 6m post I.”, vidi se znatno zadebljanje potkožnog masnog sloja kao i međufilamentna prisutnost masti u odnosu na sliku „Aksijalni presek pre” i „Aksijalni presek pre I”.

Kod svih naših ispitanika nije bilo potrebe za intravenskom aplikacijom gadolinijumskog kontrastnog sredstva, jer nije uočeno postojanje područja nekroze i cistične degeneracije. Kod većine pacijenta postoperativno dolazi do povećanja obima

listova sa приметnom razlikom u sadržaju masti između i unutar skeletnih mišića. Mast je prisutna u mišićima, kako inter, a tako i intramuskularno. Karakterističan je MR prikaz intramuskularne masti koja daje sliku nalik peru. Takođe je i od velikog značaja i povećanje debljine potkožnog masnog tkiva potkolenice. Opisane promene bile su najizraženije u *m. soleus*-u i medijalnoj glavi *m. gastrocnemius*-a. Kod svih naših ispitanika nisu videne značajne zone edema i atrofije. Promene opisane na MR-u predstavljaju pozitivni efekat sprovedene procedure koja u istraživanju podrazumeva infiltrisanje proprane i centrifugirane masti u regione od interesa.

U našem istraživanju proprana mast je injektirana u region mišića lista. Prikazano je u (Tabela 13.) da nema konvencionalne značajnosti između količine infiltrirane masti i dimenzija lista desno pre i 6m posle operacije kao i 6m posle operacije list levo. Statistička značajnost negativnog smera utvrđena je između količine infiltrirane masti i obima leve potkolenice pre operacije. Manji preoperativni obim lista levo implicira potrebu da se infiltriše veća količina masti. Klinički gledano svi ispitanici su imali dominantnu desnu stranu i imali su manji list leve potkolenice i za istu promenu obima infiltrirana im je veća količina masti. Ali same morfološke karakteristike masnih ćelija u propranoj masti nisu imale statistički značaj na promenu samog obima lista. Površina adipocita u listu desno 6m nakon operacije bile su na granici statističke značajnosti. Tako da postoji mogućnost da veličina adipocita bi mogla da ima uticaj na povećanje potkolenice desno ukoliko bi ispitivani uzorak bio veći.

Korelacionom analizom između količine infiltrirane masti i promene obima potkolenice u nivou lista je utvrđena značajnost, što ide u prilog hipotezi “Što je više masti ubrizgano u mišiće, obim lista će biti veći” (Tabela 14.) Važno je napomenuti da korelacija prečnika KS i promene obima potkolenice desno je blizu konvencionalnog nivoa značajnosti $p < 0,67$ pa bi i tu korelaciju trebalo analizirati i diskutovati, jer je moguće da bi sa većim uzorkom i ova korelacija bila statistički značajna. Navedena korelacija je negativnog smera, odnosno što je veći prečnik KS to je manja promena lista desno. (Grafikon 5.)

Za razliku od proprane masti, pokazano je da centrifugirana mast ima uticaja na obim iznad gležnja obostrano tako što povećan broj krvnih sudova povećava i obim gležnja (Tabla 15.). Interesanto je da ni jedna morfološka karakteristika centrifugirane

masti, kao ni količina, nije uticala na samu promenu obima pojedinih regiona potkolenice prikazano (Tabeli 16.), što nam u daljijim istraživanjima otvara mogućnost ispitivanja recipijentnog regiona i njihove anatomske i histološke značajnosti.

U daljem ispitivanju pojedinačnih uticaja faktora rasta na promenu obima potkolenice smo pokazali da PDGF centrifugirane masti sa svojom slabom i umerenom ekspresijom nema značajnog uticaja na promenu potkolenice u svim njenim regionima sem u regionu lista desno 6m nakon operacije, gde se nalazi na granici konvencionalnog nivoa značajnosti (Tabela 17.). Međutim, analizirajući pojedinačno rezultate primećujemo da je uvećanje potkolenice u regionu lista, iznad gležnja i gležanj bio jednak i kod slabe i kod umerene ekspresije PDGF, dok je promena obima potkolenice bila veća u regionu ispod kolena kod ispitanika sa slabijom ekspresijom trombocitnog faktora rasta.

Za razliku od PDGF-a, VEGF je pokazao značajnost u promeni obima potkolenice i to obostrano u regionu lista, pre i 6m posle operacije, obostrano iznad gležnja (Tabela 18.). Analizirajući uvećanje obima potkolenice ispod kolena levo pokazali smo pozitivnu korelaciju sa ekspresijom VEGF. Negativna korelacija je uočena između VEGF i obima potkolenice iznad gležnja levo. Svi ostali regioni su, bez obzira na nivo ekspresije, imali identično povećanje obima rezultati su i grafički prikazani (Grafikon 7.)

Ispitivanjem uticaja EGF-a na promenu obima potkolenice pokazalo je povećanje obima u region iznad oba gležnja i ispod kolena, lista levo. Smanjena ekspresija EGF-a bila je udružena sa povećanjem obima kolena desno (Tabela19.). U nivou gležnja promena obima je bila ista bez obzira na nivo ekspresije EGF (Grafikon 8.).

Pored ispitivanja uticaja pojedinih tipova masti na promenu obima potkolenice u različitim regionima analizirali smo i morfološke različitosti i njihovu eventualnu povezanost donorskih masti sa recipijentnom regijom.

Analizirajući korelacije karakteristika centrifugirane masti i uzorka masti uzete iz recipijentnog regiona potkolenice pokazana je značajna povezanost prečnika krvnih sudova centrifugirane masti sa brojem krvnih sudova u recipijentnom regionu (Tabela.20.). Korelacija je bila negativnog smera što znači da manji prečnik krvnog suda u centrifugiranoj masti, odgovara većem broju krvnih sudova u recipijentnom regionu. Takođe je manja površina krvnih sudova u centrifugiranoj masti, praćena povećanjem

površine adipocita u recipijentnom regionu. Obrnuta veza je uočena i između površine adipocita u centrifugiranoj masti i prečnika krvnih sudova u recipijentnom regionu.

Poredeći podatke morfoloških karakteristika ćelija masti u obradi centrifugom i masti uzete iz recipijentnog regiona uočili smo visoko statistički značajne razlike (Tabela 21.). Uzorak masti iz recipijente regije ima višestruko veću površinu krvnih sudova od centrifugirane masti, kao i manju površinu adipocita. Takođe, u komparativnoj analitici dve tabele sasvim jasno je da veći prečnik krvnog suda u centrifugiranoj masti dao neznatno ali manji broj krvnih sudova u recipijentnoj regiji. Kao što je i površina adipocita iz centrifugirane masti manja od recipijentne regije i ima značajni uticaj na četverostruko manji prečnik krvnih sudova u recipijentnom regionu potkolenice (Grafikon 9.).

U našem istraživanju smo pokazali da dolazi do značajnog pomeranja inteziteta ekspresije faktora rasta između ekspresije faktora rasta centrifugirane masti i faktora rasta iz recipijentnog regiona. U tabeli 22. je prikazano da količina centrifugirane masti, morfološke karakteristike adipocita i krvnih sudova nisu značajno promenjene različitom ekspresijom ispitivanih faktora rasta. Ostale su približno iste površine adipocita, broj, prečnik i površine krvnih sudova u gotovo istoj količini centrifugirane masti. Jedino je EGF pokazao značajnost promene ekspresije u odnosu na količinu centrifugirane masti.

Kako je poznato da različitim procesima pripreme masti nastaju različite morfološke promene, što je i ova studija pokazala, ispitivali smo, da li i različita obrada tkiva rezultira i različitom ekspresijom faktora rasta.

Naši rezultati su potvrdili da različite pripreme masti za injektiranje menjaju jačinu ekspresije faktora rasta (Tabela 23.). Tako da je proprana mast veoma siromašna VEGF-om i EGF-om, a sa slabom ekspresijom PDGF-a. Za razliku od nje pojačana obrada masti, po tipu centrifugiranja, dovela je do skoka ekspresije faktora rasta. U našim uzorcima je najviše bilo masti sa umerenom ekspresijom PDGF-a, sa slabom ekspresijom VEGF-a i podjednako zastupljenom slabom i umerenom ekspresijom EGF-a. Samo injektiranje i proces preživljavanja transplantirane masti je pokazao skok faktora rasta u recipijentnom regionu u odnosu na centrifugiranu, a još intezivnije u odnosu na propranu mast. Tako da je PDGF pojačao kategoriju ekspresije podjednako na umerenu i izraženu, VEGF u

najviše ispitanika sa slabe na umerenu ekspresiju, dok je EGF pokazao pad ekspresije sa umerene na slabu u recipijentnom regionu.

Pošto je najveći značaj u ovom istraživanju, sa aspekta histologije i imuno-histohemije, imala centrifugirana mast poredili smo odnos faktora rasta u centrifugiranoj masti sa faktorima rasta u recipijentnom regionu. U sledećim tabelama (Tabela 24., Tabela 25., Tabela 26.) je pokazana visoka statistička značajnost u promeni inteziteta faktora rasta. Količina PDGF-a je porasla iz slabe u umerenu i iz umerene u izraženu ekspresiju. Tako da su svi ispitanici koji su imali slabu ekspresiju PDGF u centrifugiranoj masti 6m nakon operacije u recipijentnoj regiji pokazuju umerenu ili izraženu ekspresiju. Kod 34 ispitanika došlo do povećanja ekspresije, 1 pacijent je imao smanjenje, a 32 pacijenata je ostalo sa neizmenjenom umerenom ekspresijom PDGF (Tabela 24.)

Takođe, VEGF je pokazao skok sa slabe na umerenu ekspresiju kod 38 ispitanika, 14 ispitanika ostalo je sa umerenom ekspresijom vaskularnog faktora rasta, dok je 15 ispitanika smanjilo ekspresiju VEGF u recipijentnom regionu (Tabela 25.)

EGF je pokazao pad ekspresije u recipijentnoj regiji sa umerene na slabu kod 28 ispitanika, kod 31-og je ostao sa slabom ekspresijom i kod 6 ispitanika j sa umerenom ekspresijom. Samo 2 pacijenta su povećali ekspresiju sa slabe na umerenu (Tabela 26.).

Sumirajući promene svih faktora rasta primećujemo da kod većine ispitanika ekspresija PDGF i VEGF je bila ili nepromenjena ili povećana, jedino kod EGF je ekspresija bila u velikom broju ispitanika smanjena i nepromenjena (Tabela 27.)

Međutim, jedno od značajnijih pitanja u našem istraživanju je: "Koliko je promena ekspresije faktora rasta zaista uticala na promenu obima potkolenica ispitanika?". Iznenadjuće, odnos promene ekspresije rasta na promenu obima potkolenice nije pokazala statističku značajnost. Ali, uočili smo da je promena obima potkolenica bila veća kod ispitanika sa nepromenjenom ekspresijom PDGF, a sa povećanjem ekspresije obimi su bili manji, sem u regionu ispod lista desno gde je sa povećanjem ekspresije i obim bio veći. (Tabela 28.)

Analizom VEGF takođe nije bilo statističke značajnosti između promene obima potkolenice i promene ekspresije faktora rasta (Tabela 29.). Međutim, veće povećanje

obima potkolenica je bilo kod pacijenta koji su imali nepromenjenju ekspresiju od onih kod kojih je ekspresija bila povećana, sem u regionu - list desno, gde je povećanje i dovelo do povećanja obima. Zapažali smo da je i smanjenje ekspresije VEGF dalo veće povećanje kod 6 pacijenata u nivou iznad gležnja i gležnja.

Promena ekspresije EGF u smislu smanjenja ekspresije je značajno doprinela promeni obima potkolenice sa negativnom korelacijom; obim bio veći što je smanjenje bilo veće. Samo kod dva pacijenta je obim ispod kolena levo pokazalo povećanje obima sa povećanjem ekspresije. (Tabela 30.)

Upoređujući rezultate malobrojnih istraživanja transplantacije masnog tkiva u potkolenice, njihov broj ispitanika bio znatno manji, nije postojala čistoća uzorka u odnosu na pol, rasu, tip deformiteta, nisu uključivali obe potkolenice u istraživanje.

Pojedini autori govore o utcaju promene telesne mase na postojeće preživjele adipocite u recipijentnom regionu. Mast kao preživeli graft, menja se sa promenom telesne težine. Tako da pacijent koji dobija ili gubi telesnu masu može da očekuje asimetrije korigovanog regiona i varijacije u rezultatima. Takođe, to postaje sve izražajnije u regionima sa povećanom i boljom cirkulacijom u recipijentnom regionu (Hall i sar., 2015). U našem istraživanju ispitanici nisu imali promenu telesne mase, prosečan gubitak telesne mase u periodu pre i 6m nakon operacije, bio je 1kg, što znači da težina nije mogla da utiče na hipertrofiju ili hipoplaziju adipocita, da bi diskutovali o uticaju promene telesne mase na promenu obima potkolenice.

Većina istraživanja su metodološki pratili pacijente, vizuelizacijom-fotografisanjem, dok pojedini autori su radili i volumetrijska merenja obima potkolenica ali samo u nivou lista (Hoppmann i sar., 2013; Mojallal i sar., 2008; Stamos, 2001; de Pedroza, 2000; Pereira, 1996). Dok smo u našem istraživanju uključili metodološki čistu grupu ispitanika koji su bili istog pola, rase, sa obostrano jednakim deformitetom i to hipoplazijom potkolenica tipa III. Do sada nije bilo radova koji su prikazivali rezultate popunjavanja čitave dužine potkolenica, već samo pojedinih njenih delova i to najčešće region lista (Mundinger i Vogel, 2016; Hoppmann i sar., 2013; Mojallal i sar., 2008). Većina autora govori o velikom procentu resorpcije masti nakon njegovoj injektiranja on se kreće od 17 do 85% i to u prvih dva meseca (Hall i sar., 2015; Herold i sar., 2013; Erol

i sar., 2008; Yoshimura i sar., 2008). Da bi obezbedili bolje preživljavanje transplantiranih adipocita dodavali su izdvojenu stromalnu vaskularnu frakciju *SVF* u masni transplantat (Gentile i sar., 2012), i dobijali 37% resorpcije masti. Sve više istraživača dodaje plazmu obogaćeni trombocitima (Gentile i sar., 2012; Keyhan i sar., 2013), objavili su da je resorpcija masti od 23-31% u prvih šest meseci. Pojedini autori su masno tkivo obogaćivali progenitorima (Yoshimura i sar., 2010), prijavili su da je procenat resorpcije 44%. Har-Shai je pripremljenu mast obogaćivao sa ćeliskom kulturom mediuma nakon čega je procenat resorpcije bio od 40-50% (Har-Shai Y i sar., 1999). U slobodan transplantat masti su dodavali fibrin obogaćen trombocitima i na taj način resorpcija masti je bila 18% (Keyhan i sar., 2013). Dodavanje mezenhimnih ćelija u lipoaspirat doveo je do 45% resorpcije masti (Zocchi i Zuliani, 2008). Dok u našem istraživanju resorpcija masti je bila različita, kako između pojedinih regiona potkolenice, tako i u odnosu na samu stranu tela. Shodno da nije bilo promene obima između trećeg i šestog meseca, možemo smatrati da je proces resorpcije definitivno završen sa tri meseca i da je transplantirana mast završila sa procesom preživljavanja i resorpcije. Promenu obima između prvog i šestog meseca smo prikazali procentom resorpcije masti. Tako da je u nivou tuberositas tibie - ispod kolena resorpcija iznosila (levo: 22.53%, desno: 24.11%), na sredini lista (levo: 26.47%, desno: 26.75%), iznad gležnja (levo: 22.43 %, desno: 14.18%) i gležanj (levo: 20.58 %; desno: 15.63 %). Značajno veća resorpcija masti sa desne strane, kako u nivou gležnja, tako i iznad gležnja, govori u prilog tome da svi pacijenti su imali dominantnu desnu stranu tela, a samim tim i veći intezitet svih pokreta. Sa druge strane kao što smo videli iz (Tabela 11.), leva strana potkolenice je klinički dozvoljavala veću infiltraciju masti nego desna strana, tako da je u desnu stranu infiltrirana minimalno ali ipak veća količina masti tako da je i promena obima leve strane potkolenice je bilo beznačajno veća nego sa desne strane. Predeo iznad gležnja je bogat perforatorima koji spajaju duboki i površinski arteriski pleksus sa jedne strane, a sa druge je opterećen venskim i limfatičnim sistemom, tako da povećanje pokreta povećava cirkulaciju ali isto tako stajanje ili sedenje povećava dotok venske krvi i povećava limfni otok. Što govori u prilog tome koliko je postoperativna kompresija bitna u procesu preživljavanja adipocita (Mundinger i Vogel, 2016).

Postoje brojne hipoteze u analiziranju povećanja procenta preživljavanja adipocita koje su vezane za samu proceduru uzimanja i obrade masti. Brojni autori

diskutuju o načinu obrade masti, veličini kanila za uzimanje masti iz donorskog regiona ili kanila za injektiranje masti u recipijentni region (Tabit i sar., 2012; Ferraro i sar., 2011; Minn i sar., 2010). Pojedine diskusije su usmerene ka jačini vakuma tako da visoki negativni pritisak od -1atm dovodi i do 90 % oštećenja adipocita, za razliku od uklanjanja masti špricovima čiji je jačina vakuma dosta manja i iznosi 108mm Hg. Takođe je pri tome bitna i minimalna ekpozicija masnog grafta na vazduhu (Tabit i sar., 2012; Hoareau i sar., 2013). Sa druge strane pojedini autori govore o tome da povećani pritisak prilikom uzimanja graftova ne utiče na viabilitet adipocita, čak kada je pritisak i veći od -1 atm odnosno iznosi -6 atm i da veličina, kao i sam histološki nalaz adipocita se neće promeniti (Lee i sar., 2013). Neki od istraživača diskutuju o važnosti brzine centrifugiranja masti koja može da se kreće od 500 do 3000 rpm/3min. i da sama brzina utiče na očuvanost adipocita, a da se sa brzinom od 3000 rpm u celosti narušava membrane adipocita i njegov vaskularni prostor (Ferraro i sar., 2011). Propiranje masti kroz gazu ima visestruku prednost u odnosu na ostale tehnike, centrifugiranja i propiranja kroz metalnu rešetku jer smanjuje proces oštećenja ćelija, polja nekroze i inflamacije (Minn i sar., 2010). Takođe pojedini autori govore da manja agresija na samo adipocitno tkivo ne samo da povećava mogućnost preživljavanja, nego da i održava bolji kvalitet ASC-a, koje pomažu u samom preživljavanju grafta i stvaranju neovaskularizacije (Hoareau i sar., 2013; Condé-Green i sar., 2010). Druga grupa autora govori suprotno da propiranje masti uništava ćeliju, da samo odstranjivanje fibrinskih detritusa iz tkiva narušava adipocitni viabilitet, kao i da propiranje slanim rastvorom 0,9% NaCl-om narušava elektrolitni balans koji dovodi do oštećenja membrane adipocita. (Chajchir i sar., 1990). Treća grupa autora govori da način obrade masti ne utiče na sam proces preživljavanja masti i da mast podjednako preživljava bez obzira na način uzimanja i prerade masti (Smith i sar., 2006; Rohrich i sar., 2004).

U našem istraživanju smo za uklanjanje masti koristili špriceve sa slabim vakumom i kanile od 3mm sa tri otvora od 2mm, na taj način smo obezbedili da ćelije što manje budu oštećene prilikom preuzimanja. Mast je bila u kratkoj vazdušnoj ekpoziciji i to samo ona koju smo propirali kroz gazu 0,9% NaCl rastvorom da bi je oslobodili fibrinskog detritusa. Količina masti koja je planirana za centrifugiranje premeštana je iz 50ml šprica u špic od 10 ml zatvorenom metodom sigurnosnog konektora.

Centrifugiranje masti obavljali smo na 2700 rpm/3min. Histološkom analizom smo utvrdili da je centrifugirano masno tkivo bilo podjednako očuvanog integriteta membrane, jedra i vaskularne strome kao i proprana mast, nije bilo polja hijalinizacije, nekroza niti pojačane fibrocitne aktivnosti. S tim da je centrifugirana mast bila manje ćeliske površine, površine krvnih sudova i broja krvnih sudova dok je prečnik krvnih sudova bio jednak. (Tabela 3., Tabela 5.). Dosta kontraverznih stavova oko obrade masti su predmet brojnih savremenih istraživanja. Mi smo u našem istraživanju dokazali da se kvalitet donorskog masnog tkiva značajno ne razlikuje u ovim tipovima obrade. Postavlja se pitanje na koji način su navedeni autori uzimali mast, koja je bila brzina i agresivnost u pokretima kanile. Mi smo uzimali mast pažljivo, dosta sporo i precizno u pokretima, uvek ravnomerno i paralelno sa površinom kože i to od površine ka dubljim strukturama potkožne masti. Smatramo da i sam proces infiltracije 0,9% rastvora NaCl-a sa adrenalinom, kao i samo uzimanje ne treba da bude agresivno i da to dosta poboljšava samo očuvanje ćelijskih elemenata.

Mnogi autori diskutuju o tehnikama infiltracije masti koje omogućavaju bolje preživljavanje, smanjivanje razvoja fibroznog-ožiljnog tkiva ili pak nekroze adipocita i formiranja masnih cisti. Ukoliko se koriste velike kanile veće od 1,2mm i ubacuju odjednom veće količine masti, adipociti neće preživeti. Značaj je u ubacivanju manjih količina masnog grafta ne većeg od 2mm, da bi se obezbedio bolji kontakt sa vaskularizacijom recipijentnog regiona. Na taj način bi se brže omogućila neoangiogeneza i izbegao proces nekroze, ožiljavanja ili formiranja masnih cisti. Manji graftovi sa većom površinom imaju bolji procenat preživljavanja od većih graftova, zbog toga je popularnost mikroinjektiranja sve veća. Veći graftovi nisu u punom kontaktu sa okolinom koja je bogata vaskularizacijom u centru velikog grafta je najveća mogućnost ishemije i nekroze i na taj način se mast uvodi u bržu resorpciju (Hall i sar., 2015; Hoareau i sar., 2013; Tabit i sar., 2012; Yoshimura i sar., 2008). Takođe veća količina infiltrirane masti stvara povećan pritisak u lokalnom tkivu, koji mehanički može da zatvori arterijsku cirkulaciju. Mada, ne postoji dovoljno studija koje mogu potvrditi, da postoji linearni odnos između količine infiltrirane masti i stepena preživljavanja u recipijentnom regionu (Yu i sar., 2015; Khouri i sar., 2012).

U našem istraživanju infiltrirali smo propranu mast u mišiće potkolenice sa kanilom od 3mm sa otvorima od 1,5mm, postepeno, lagano vodeći računa o pravcu pružanja mišićnih vlakana. Infiltraciju masti smo obavljali prilikom retrogradnog izvlačenja kanile oslobađajući male količine masti. Bilo je bitno da ubacimo što više masti ali u različitim nivoima mišića potkolenice. Nakon toga je rađena masaža lista da bi se graftovi rasporedili u što tanjem sloju u odnosu na okolno tkivo. Proprana mast ima veliku masnu ćeliju ali ona se ubacuje u dobro vaskularizovan mišić i to difuzno u tankim slojevima, tako da su masni graftovi bili u celosti pokriveni recipijentnom vaskularizacijom. Da je naš metod dobar prikazano je i na magnetnoj rezonanci (Slika15., Slika16., Slika 17.), gde se ne vide polja nekroze, masnih cisti i degenaracije, već zdravo i preživelo masno tkivo, ravnomerno raspoređeno između i unutar mišićnih grupa.

Celom dužinom potkolenice cirkumferentno smo ubacivali centrifugiranu mast u potkožni sloj, ali ovog puta tankim kanilama promera 1,2mm, sa jednim otvorom veličine 0,5mm. Dobra vaskularna mreža potkolenice koja postoji kao spoj između dermalnog i fascijalnog vaskularnog plexusa zahteva manji masni graft da bi spoj između, definitivno, sitnijih krvnih sudova nego u mišićima i masnog grafta, bio bolji i da bi mogućnost preživljavanja bila veća. Takođe, infiltrirali smo pri retrogradnom izvlačenju kanile, manje količine masti su bile ravnomerno raspoređene. Infiltracija je bila unakrsna i ravnomerna u više nivoa potkože, na taj način smo bili sigurni da smo pokrili čitavu površinu određenog regiona potkolenice. Nakon infiltracije dodatno smo uradili masažu potkolenice radi ravnjanja i istanjivanja kontaktne površine između grafta i recipijentnog regiona. Analizu preživljavanja infiltriranog masnog tkiva smo radili nakon 6 meseci histološkom analizom uzetog uzorka iz recipijentnog regiona (Tabela 7.) Na histološkom preparatu smo uočili masne ćelije znatno manje površine, što govori u prilog mladih adipocita. Prečnik krvnih sudova je bio manji, kao i neznatno manji broj krvnih sudova, ali zato površina krvnih sudova je bila znatno veća od donorske masti. Razgranatost krvnih sudova govori od bogatoj neovaskularizaciji u recipijentnom regionu (Slika 14.)

Značaj povećanog pritiska u lokalnom tkivu je veliki, jer sa povećanjem pritiska smanjuje se mogućnost preživljavanja adipocita. Otok doprinosi povećanju pritiska i kompromitovanju lokalne cirkulacije u tkivu sa svežim masnim graftovima, zbog toga bi graftovi trebali da budu blago fiksirani za recipijentno tkivo (Tan i sar., 2016). Druga

grupa autora smatra da kompresija graftova i masaža loše utiče na preživljavanje masti u potkolenicama (Mundinger i Vogel, 2016). U našem istraživanju da bi povećali mogućnost preživljavanja transplantirane masti, fiksirali smo potkolenice elastičnim flasterima u obliku crepa i kompresivnim čarapama od 15 mmHg, koje su dinamično dozvoljavale povećanje otoka ali istovremeno sprečavale da se taj otok i održi. Sa druge strane, pacijenti su u neposrednom postoperativnom periodu u toku boravka u bolnici postavljeni na aparat za kontinuiranu vensku drenažu, a nakon izlaska iz bolnice su obavezno svakodnevno šetali. Savetovani su da pri sedenju i spavanju, noge im budu u elavaciji. Smatramo da otok dodatno šteti u procesu preživljavanju adipocita jer ugrožava lokalnu cirkulaciju. Kompresiju treba optimizovati u skladu sa kliničkim nalazom potkolenice nakon popunjavanja, odnosno u zavisnosti od stepena napetosti kože i mišića. Što je potkolenica napetija kompresija je manja i obrnuto. Kada je napetost manja, otok će biti veći i iz tog razloga pravimo veću kompresiju potkolenice, da predupredimo nastanak većeg otoka koji bi ugrozio preživljavanje adipocita.

Pri injektiranju devaskularizovanog grafta u vaskularizovani recipijentni region, u prvih četiri dana infiltrirana mast se nalazi u fazi hipoksije i ćelije se hrane prostom difuzijom, a nakon toga započinje progresivna mikrovaskularna invazija (Trojahn Kølle i sar., 2012; Topcu i sar., 2012). Jedan od brojnih procesa koji započinju je i parakrina podrška ASC-a iz SVF koja ima regenerativni efekat na lokalno tkivo (Caviggioli i sar., 2010; Klinger i sar., 2008). ASC-a započinju izlučivanje faktora rasta VEGF i najveći nivo ovog faktora rasta se beleži sedam dana nakon infiltracije grafta (Nishimura i sar., 2000). Fukumura, Hurtly i Aoki govore da endotelne ćelije imaju simulišući efekat na preadipocite upravo preko VEGF (Fukumura i sar., 2003; Aoki i sar., 2003; Hurtly i sar., 2001). Pored brojnih drugih faktora rasta koji se aktiviraju u ovoj fazi FGF, HGF, aktivira se i EGF. Epidermalni faktor rasta inhibira ASC i adipogenetsku diferencijaciju. Usled lokalnog krvarenja iz trombocita se oslobađa PDGF koji takođe stimuliše ASC-e. (Tsuji i sar., 2014). U našem istraživanju i potvrđeno (Tabela 27.) da je došlo do porasta ekspresije u recipijentnom regionu PDGF i VEGF, a smanjena ekspresija EGF je doprinela boljoj adipogenezi.

Dobijeni rezultati se uklapaju u navedene studije i podržavaju stavove o uticaju ispitivanih faktora rasta na adipogenezu. Elias i saradnici ističu VEGF kao ključni činilac

angiogeneze, ali i značajan medijator zapaljenja, koji bi mogao da ima uticaj na metabolizam adipocita (Elias i sar., 2013). Povećanjem koncentracije VEGF moguće je podstaći produkciju mrkog masnog tkiva, koje je po svojim histološkim karakteristikama i elementima nezrelosti slično tkivu recipijentne regije. Iz literature je poznato da masno tkivo gojaznih pokazuje hipovaskularizaciju, znake nekroze, reaktivne inflamacije kao i pojačanu fibrozu u sklopu reparacije. Dodavanjem VEGF, u eksperimentalnim uslovima, ovakvom tkivu poboljšava se metabolizam favorizujući vaskularizaciju. (Kai Sun i sar., 2012). Kako je naša studija potvrdila povećanje ekspresije VEGF-a u recipijentnom regionu, u odnosu na donorski region, kao i značajne morfološke razlike ispitivaih tkiva, moguće je da porast ekspresije VEGF podstiče i morfološke izmene u recipijentnoj masti, koje su posledica poboljšanja metabolizma.

Pored VEGF, kao osnovnog faktora rasta krvnih sudova, postavlja se pitanje uticaja PDGF na neovaskularizaciju u procesu preživljavanja, histogeneze, ali i reparacije nakon autologne transplantacije masti. Posebno se ističe veliki uticaj PDGF, preko PDGF-B-PDGFR β signalnog puta koji podstiče razvoj mladih krvnih sudova u masnom tkivu (Onogi i sar., 2017). Nesumnjivi pozitivni uticaj PDGF na razvoj masnog tkiva preko krvnih sudova, dodatno je pojačan mogućnošću razvoja lipocita, odnosno potencijalom lipoblastične diferencijacije ćelija fibro/adipogenih progenitora, specifičnog imunofenotipa CD15+/PDGFR α +CD56-, koje se nalaze između skeletno mišićnih vlakana (Arrighi i sar., 2015). Razmatrajući navedene činjenice iz literature, kao i značajnu elevaciju PDGF u našim uzorcima recipijente masti, mogli bismo da pretpostavimo da je tako dobar rezultat korekcije u predelu lista, gde je mast bila ubrizgavana intramuskularno, između ostalog i pozitivan efekat povećanja PDGF.

Dosta se polemíše i o ulozi EGF, kao regulatora metabolizma u masnom tkivu. Pojedini autori naglašavaju da je masno tkivo izuzetno osteljivo na minimalne korekcije koncentracije EGF, koji u zavisnosti od histogenetskog razvoja adipocita i vremena u kome se menja može imati pro ili antilipogeno dejstvo (Rogers i sar., 2012; Adachi i sar., 1994.). Rogers je u svojoj studiji pokazao da vodeću ulogu u adipogenezi ima ErbB1 receptor iz familije EGF receptora. Smanjenje zastupljenosti ovih receptora u tkivu vodi u disfunkciju masnog tkiva. Postoje studije koje ističu da visoke koncentracije EGF inhibiraju, a niže podstiču preadipocitnu diferencijaciju (Harrington i sar., 2007). Rezultate koje smo mi

dobili koreliraju sa Haringtonovim nalazima. U recipijentnom tkivu, kod naših pacijenata je primećena značajna redukcija EGF u odnosu na donorsko tkivo, što bi govorilo u prilog intenzivnije preadipocine diferencijacije. Mišljenja smo da je smanjenje EGF pozitivan signal za ekstracelularni matriks koji aktivira preadipocitogenezu.

Antropološki, morfometrijski i imunohistohemijski rezultati koje smo naveli, oslanjaju se i kompatibilni su sa ostalim studijama koje se odnose na ispitivanje masnog tkiva. Zajedno, nedvosmisleno ukazuju na kompleksnost ovog tkiva i velike mogućnosti za dalja istraživanja u ovoj oblasti, koja je nemoguće odvojiti od iskustva dobijenog kliničkom praksom, a koja bi bila potpuno nesvršishodna bez inkorporacije u klinički rad. Rad rekonstruktivnog i plastičnog hirurga unapred je određen brojnim faktorima, a pre svega proporcijom tela.

Proporcije tela kao i dužina ili debljina nogu je jasno determinisana etiloškim faktorima, rasom ljudi koji žive na određenim meridijanima (Bogin 2010; Benslimane 2012). Narušavanje genetski definisanog izgleda nogu može nastati i fenotipski, tako da ekpresija raznih deformiteta može biti uslovljena, bolešću, hipovitaminozom, lošom ishranom u doba razvoja, neurološkim oboljenjima ili povredama. Brojne studije su rađene radi rešavanja problema nerazvijenih ili slabo razvijenih potkolenica aloplastičnim materijalima (Von Szalay 1985; Niechajev 2005; Cuenca-Guerra i sar., 2009), koji su uvećavali srednju trećinu potkolenice - region lista. Umetanjem implantanata subfascijalno u unutrašnji i/ili spoljašnji *m. gastrocnemius* nezadovoljava u potpunosti antropološki oblik potkolenice kod kompletne atrofije ili hipotrofije. Kod hipolazija III, IV i V tipa muskulatura je hipoplastična ili atrofična tako da umetanje implantanata može dovesti do kompartment sindroma, mišićne ishemije, nekroze i dehiscencije rane kao i do odbacivanja aloplastičnog materijala (Erol i sar., 2008; Cuenca-Guerra i sar., 2009). Rešavanje defekata na potkolenicama slobodnim masnim transplantatom pokazala je značajnost u povećanju obima potkolenice. Povećanje obima je zavisilo od količine infiltrirane masti, ali svakako to ne bi značilo da su kapaciteti recipijentnog regiona beskonačni. Klinički nalaz na potkolenicama u trenutku injektiranja nama je bio važan, da bi odredili tačnu količinu masti koju možemo injektirati. Tom prilikom nismo smeli da ugrozimo cirkulaciju potkolenice, koja nam je neophodna za preživljavanje transplantirane masti u recipijentnom regionu. Kroz naše istraživanje smo prikazali da brojni faktori utiču na proces preživljavanja masti

kao što su: način uzimanja masti iz donorskog regiona, vrste kanila za uzimanje iz donorskog regiona i za injektiranje u različita tkiva recipijentnog regiona, jačine vakuma pri uzimanju masti, načina obrade masti. Takođe i način injektiranja je jako bitan, da je ravnomeran, cirkumferentan, atraumatski, injektiranje manjih količina masnog tkiva ravnomerno raspoređenih u recipijentnom regionu, obezbeđuje bolji kontakt sa vaskularizacijom recipijentnog tkiva. Poboljšavanje kontakta između grafta i tkiva recipijentnog regiona se takođe uspostavlja masažom i pritiskom potkolenica fiksacionim flasterima i antiedematoznim kompresivnim čarapama, tako da na potkolenicama bude minimalni otok. Potencijalne komplikacije kao što su masne embolije i duboke tromboze, nismo imali ni kod jednog pacijenta. U neposrednom postoperativnom toku svi pacijenti su bili na aparatu za kontinuiranu vensku drenažu. Pacijenti su rano postoperativno mobilisani i od njih je zahtevana umerena fizička aktivnost. Takođe, sa druge strane kod ispitanika promena telesne mase je bila minimalna pa smo isključili mogućnost uticaja promena metaboličkih procesa i pojačane sekretorne aktivnosti masnih ćelija na proces preživljavanja masti. Ne treba isključiti da sam proces uzimanja masti i injektiranja masnih ćelija remeti, a samim tim i pokreće ekstracelularni matriks i stromalnu vaskularnu frakciju. ECM i SVF pokreću brojne inflamatorne i reparatorne procese i na taj način brojne mehanizme koji pomažu u procesu preživljavanja i obnavljanja adipocita. Shodno tome da slobodno masno tkivo može bolje da oblikuje potkolenice od aloplastičnih materijala, jer može da postigne sklad sa antropološkim zahtevima, da očuva konkavitet i konveksitet oblika, kao i da obezbedi očuvanje odgovarajućih proporcija između delova noge, mast se pokazala kao idealni augmentacioni materijal.

Ovo istraživanje neophodno je sagledati kroz prednosti, ali i potencijalna ograničenja koja mogu uticati na rezultate i njihovu dalju interpretaciju. Smatramo da je najvažnija limitacija ovog istraživanja činjenica da faktori rasta započinju svoju ekspresiju od petog do sedmog dana nakon injektiranja masti u recipijentni region, a da smo mi uzorak uzimali iz recipijentnog regiona ispitanika šest meseci nakon operacije. Značajnost istraživanja bi bila veća da je multiplim uzimanjem uzoraka masti nakon mesec i nakon tri meseca bilo moguće pratiti kontinuitet i eventualne promene koncentracije faktora rasta. Na taj način bi imali precizan uvid u kretanje ekspresije faktora rasta u periodu primanja masti, kao i u periodu resorpcije od mesec do tri meseca nakon injektiranja. Međutim, ovakav način praćenja bi mogao dovesti u pitanje neophodnost dodatnih intervencija,

etičnost invazivne dijagnostike kod pacijenata koji su zadovoljni postignutim rezultatima. Takođe, period praćenja nije bio dug, jer zbog zadovoljstva rezultatima, većina pacijenta nisu pokazivali želju za dolazak na kontrole nakon šest meseci, što je onemogućilo u punoj meri longitudinalno sagledavanje i antropološko merenje. Ipak, imajući u vidu da je navedeno istraživanje prevazišlo limitacije prethodnih studija koje su uključile manji broj ispitanika, nedovoljno čist uzorak po polu, rasi, tipu deformiteta potkolenica, obostranost popunjavanja, ili popunjavanje tačno istih regiona potkolenice, smatramo da navedena studija pruža dodatne, nove informacije vezane za preživljavanje masti u potkolenici.

Važno je naglasiti da je jedna od najvećih prednosti aktuelnog istraživanja naturalistički, klinički uzorak, čime je postignuta značajna validnost rezultata ne samo u strogo istraživačkom već i u aplikativnom, kliničkom smislu. Kao posebna prednost istraživanja ističe se i sinhronizacija radiološkog, histološkog i kliničkog ispitivanja.

Naučni doprinos ovog rada je da sprovedena studija predstavlja multidisciplinarni pristup analizi preživljavanja autolognih adipocita u rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji primenom antropoloških, radiološko-vizelizacionih i histoloških metoda. Ovo je prva studija koja objedinjuje i komparira makroskopske i mikroskopske karakteristike donorske i recipijentne regije, uključujući morfometrijska ispitivanja adipocita i vaskularnih elemenata masnog tkiva, kao i imunohistohemijsku ekspresiju faktora rasta. Dobijeni rezultati ukazuju na negativnu korelaciju između karakteristika krvnih sudova donorske regije i osobina tkiva recipijentne regije, kao i koncentracije EGF-a i promene obima potkolenice. Opisane korelacije mogu predstavljati dalju osnovu za nova istraživanja koja će se odnositi na druge faktore rasta, ostale regije tela ili ovde neispitivane histološke karakteristike masnog tkiva.

6. ZAKLJUČCI

1. Volumetrijska i MR ispitivanja su potvrdila da je promena obima potkolenice svuda prisutna, ali je najizraženija u srednjem nivou lista.
2. Na osnovu morfometrijskih analiza utvrđene su značajne razlike u površini ćelija, broju i površini krvnih sudova između proprane i centrifugirane masti. Proprana mast ima veću površinu ćelija, kao i veći broj i površinu krvnih sudova.
3. Na osnovu imunohistohemijskih analiza utvrđene su značajne razlike u količini faktora rasta (PDGF, VEGF i EGF) između proprane i centrifugirane masti, pri čemu je količina svih faktora rasta veća u centrifugiranoj masti.
4. Recipijentna mast morfometrijski ima manje ćelije, manji broj i prečnik krvnih sudova, ali veću površinu krvnih sudova u odnosu na donorsku mast.
5. Imunohistohemijski je potvrđeno da se količina faktora rasta PDGF i VEGF održava ili povećava u recipijentnoj regiji u odnosu na donorsku mast, a da se EGF smanjuje.
6. Korelacionom analizom je utvrđena značajna povezanost prečnika KS centrifugirane masti i broja KS recipijentne regije, površine KS centrifugirane masti i površine ćelija recipijentne regije. Obe navedene korelacije su solidne jačine i negativnog smera.
7. Negeativna korelacija je utvrđena između ekspresije EGF i promena obima potkolenice, intenzivnija ekspresija je praćena manjim povećanjem obima. Korelacija između VEGF i PDGF sa promenom obima potkolenice nije pokazana.

7. LITERATURA

1. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Effect of scaling and root planing on serum interleukin-10 levels and glycemic control in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(2):188-93.
2. Adachi H, Kurachi H, Homma H, Adachi K, Imai T, Morishige K, Matsuzawa Y, Miyake A. Epidermal growth factor promotes adipogenesis of 3T3-L1 cell in vitro. *Endocrinology*. 1994;135:1824–1830.
3. Anderson N. Lawsuit Science: Lessons from the Silicone Breast Implant Controversy. *New York Law School Law Review*. 1997;41(2): 401–07.
4. Aoki S, Toda S, Sakemi T, Sugihara H. Coculture of endothelial cells and mature adipocytes actively promotes immature preadipocyte development in vitro. *Cell Struct Funct*. 2003;28(1):55-60.
5. Arrighi N, Moratal C, Clément N, Giorgetti-Peraldi S, Peraldi P, Loubat A, Kurzenne JY, Dani C, Chopard A, Dechesne CA. Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1733.
6. Austad ED, Rose GL. A self-inflating tissue expander. *Plast.Reconst.Surg*.1982;70:588
7. Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th edition, Churchill Livingstone, 2013, Elsevier
8. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2084-2089.
9. Benslimane F. The Benslimane's Artistic Model for Legs Beauty. *Aesthetic Plast Surg*. 2012;36:803-812
10. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005;96:939-949.
11. Bertholet AM, Kazak L, Chouchani ET, Bogaczyńska MG, Paranjpe I, Wainwright GL, Bétourné A, Kajimura S, Spiegelman BM, Kirichok Y.

- Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. *Cell Metab.* 2017;25(4):811-822.e4.
12. Bertossi D, Zancanaro C, Trevisiol L, Albanese M, Ferari F, Nocini PF. Lipofiling of the lips: ultrastructural evaluation by transmission electron microscopy of injected adipose tissue. *Arch Fascial Plast Surg* 2003;5(5):392-8.
 13. Bogin B, Varela-Silva MI (2010) Leg length, body proportion and health: a review with a note on beauty. *Int J Environ Res Public Health* 7:1047–1075.
 14. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture-expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013;15(6):641-8.
 15. Bjørbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:305-331.
 16. Britton KA, Fox CS. Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* 2011;124:e837-e841.
 17. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic diseases. *J Endocrinol* 2014; 220:47-59.
 18. Caviggioli F, Maione L, Vinci V, Klinger M. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids. *Plast Reconstr Surg* 2010;126:1130–1131.
 19. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res.* 2012;53(2): 227–246.
 20. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(6):270-7.
 21. Cedikova M, Kripnerová M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, Mullerova D, Kuncova J. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6067349.

22. Chajchir A, Benzaquen I, Wexler E, et al. Fat injection. *Aesthetic Plast Surg* 1990;14(2):127e36.
23. Chang YC, Chang TJ, Lee WJ, Chuang LM. The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism* 2010; 59:93-99.
24. Chen X, Du X, Zhu J, Xie L, Zhang Y, He Z. Correlations of circulating peptide YY and ghrelin with body weight, rate of weight gain, and time required to achieve the recommended daily intake in preterm infants. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(7): 656–664.
25. Chechi K, van Marken Lichtenbelt WD, Richard D. Brown and beige adipose tissues: phenotype and metabolic potential in mice and men. *J Appl Physiol* (1985). 2017 Mar 16:jap.00021.2017.
26. Cherry GW, Austad E, Pasyk K, McClatchey K, Rohrich RJ. Increased survival and vascularity of random-pattern skin flap elevated in controlled, expanded skin. *Plast Reconstr Surg.* 1983;72(5):680-7
27. Chong BM, Reigan P, Mayle-Combs KD, Orlicky DJ, McManaman JL. Determinants of Adipophilin's Function in Milk Lipid Formation and Secretion. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(6): 211–217.
28. Clauser LC, Consorti G, Elia G, Galié M, Tieghi R. Three-dimensional volumetric restoration by structural fat grafting. *Craniofac Trauma Reconstr.* 2014;7(1):63-70.
29. Claro F Jr, Figueiredo JC, Zampar AG, Pinto-Neto AM. Applicability and safety of autologous fat for reconstruction of the breast. *Br J Surg.* 2012; 99(6):768-80
30. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 1995;19(5):421-5.
31. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg* 2001; 28(1):111-9.
32. Coleman SR. *Structural Fat Grafting.* Quality Medical Publishing: St Louis, 2004.
33. Coleman WP III. Fat transplantation. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2008;16(4):451-8.

34. Cohen P, Miyazaki M, Soccia ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002;297:240-243.
35. Condé-Green A, de Amorim NF, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: A comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010; 63(8):1375-81.
36. Consorti G, Tieghi R, Clauser LC. Frontal linear scleroderma: longterm result in volumetric restoration of the fronto-orbital area by structural fat grafting. *J Craniofac Surg* 2012;23(3):e263–e265
37. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs *Cell Stem Cell*. 2008;3:301–313.
38. Cronin TD, Gerow FJ. Augmentation Mammoplasty: A New "natural feel" Prosthesis. *Excerpta Medica International Congress Series*. 1963;66:41.
39. Cuenca-Guerra R, Daza-Flores JL, Saade Saade AJ. Calf Implants. *Aesthetic Plast Surg*. 2009;33:505-513.
40. Czerny V. Plastischer Ersatz der Brust durch ein Lipoma". *Zentralblatt für Chirurgie*. 1895;27:72.
41. de Pedroza LV (2000) Fat transplantation to the buttocks and legs for aesthetic enhancement or correction of deformities: long-term results of large volumes of fat transplant. *Dermatol Surg* 26(12):1145-9.
42. Ebrahimi-Mamaeghani M, Mohammadi S, Arefhosseini SR, Fallah P, Bazi Z. Adiponectin as a potential biomarker of vascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:55–70.
43. Elias I, Franckhauser S, Bosch F. New insights into adipose tissue VEGF-A actions in the control of obesity and insulin resistance. *Adipocyte*. 2013; 2(2):109-12.
44. El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and

- C/EBPalpha. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7946-51.
45. Erol O, Gurlek A, Agaoglu G (2008) Calf augmentation with autologous tissue injection. *Plast Reconstr Surg*121(6):2127–2133.
 46. Ersoy C, Sadikoglu G, Orhan H, Guclu M, Sarandol E, Akgun MD, Ozcakil A, Imamoglu S. Body fat distribution has no effect on serum visfatin levels in healthy female subjects. *Cytokine*. 2010;49(3):275-8.
 47. Farmer, S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 4, 2006;263–273.
 48. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *Faseb J* 2002;16:1335-1347.
 49. Ferraro GA, De Francesco F, Tirino V, Cataldo C, Rossano F, Nicoletti G, D'Andrea F. Effects of a new centrifugation method on adipose cell viability for autologous fat grafting. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(3):341-8.
 50. Forte R, Pesce C, De Vito G, Boreham CA. The Body Fat-Cognition Relationship in Healthy Older Individuals: Does Gynoid vs Android Distribution Matter? *Nutr Health Aging*. 2017;21(3):284-291.
 51. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother* 2016;43(4):268-274.
 52. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-247
 53. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005;307:426-430.
 54. Fukumura D, Ushiyama A, Duda DG, et al. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res*. 2003; 93(9):e88-e97.
 55. Gartner L, Hiatt J. Color atlas and text of histology. Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
 56. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.

57. Gentile P, Oriandi A, Scioli MG, Kurita M, Oshima Y, Sato K, et al. A comparative translational study: The combined use of enhanced stromal vascular fraction and platelet-rich plasma improves fat grafting maintenance in breast reconstruction. *Stem Cell Transl Med* 2012;1:341-51.
58. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249-60.
59. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology.* 2013;154(9):2992-3000.
60. Glitzenstein J. Correction of amyotrophies of the limbs with silicone prosthesis inclusions. *Rev Bras Cir.* 1979;69:117.
61. Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552-2563.
62. Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:1216783.
63. Hall M, Heffelfinger R. Autologous Fat Transfer as a Facial Filler: Current and Future Applications *Curr Otorhinolaryngol Rep* 2015;(3):33-41.
64. Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2010;115(5):957-964.
65. Harris RB et al. Direct and Indirect Effects of Leptin on Adipocyte Metabolism *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):414-423.
66. Harrington M, Pond-Tor S, Boney CM. Role of epidermal growth factor and ErbB2 receptors in 3T3-L1 adipogenesis. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(3):563-71.
67. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;14:9-12.

68. Har-Shai Y, Lindenbaum ES, Gamliel-Lazarovich A, Beach D, Hirshowitz B. An integrated approach for increasing the survival of autologous fat grafts in the treatment of contour defects. *Plast Reconstr Surg* 1999;104:945-54.
69. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RBS, Wilson PW, et al. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3165-3172.
70. Herold C, Ueberreiter K, Busche MN, Vogt PM. Autologous fat transplantation: volumetric tools for estimation of volume survival. A systematic review. *Aesthetic Plast Surg*. 2013; 37(2):380-7.
71. Hoareau L, Bencharif K, Girard AC, Gence L, Delarue P, Hulard O, Festy F, Roche R. 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.
72. Hoppmann R, Meruane M, Gonzales D, Wisnia P, Hasbun A, Villalobos B. Calf lipo-reshaping. *J Plast Reconstr Aest Surg*. 2013;66:951-961.
73. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor- α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:854-858.
74. Hutley LJ, Herington AC, Shurety W, et al. Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(5):E1037-E1044.
75. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(5):591-7.
76. Japundžić M., Lačković V., Milićević S., Bumbaširević V. The use of silver methenamine for selective staining of chromatin and ribosomes of semifine and ultrathin sections. 20th Congress of the Union of the Yugoslav Associations of Anatomists, Novi Sad, Abstracts 91-92, 1985.
77. Jumabay M, Zhang R, Yao Y, Goldhaber JJ, Boström KI. Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes. 2010; *Cardiovasc. Res*. 85: 17-27.
78. Kang L, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Induced pluripotent stem cells (iPSCs)--a new era of reprogramming. *J Genet Genomics*. 2010;37(7):415-21.

79. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548-56.
80. Keyhan SO, Hemmat S, Badri AA, Abdeshahzadeh A, Khiabani K. Use of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in combination with fat graft: Which is more effective during facial liposuction? *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71:610-21.
81. Klinger M, Marazzi M, Vigo D, Torre M. Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction. *Aesthet Plast Surg* 2008;32:465–469.
82. Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *Int J Stem Cells.* 2015;8(2):121-7.
83. Korah TE, Ibrahim HH, Badr EA, El Shafie MK. Serum resistin in acute myocardial infarction patients with and without diabetes mellitus. *Postgrad Med J* 2011;87:463-467.
84. Khouri RK, Eisenmann-Klein M, Cardoso E, Cooley BC, Kacher D, Gombos E, et al. Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: Results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129:1173-87.
85. Lačković V., Japundžić M., Vuzevski V., Bumbaširević V., Stefanović B. Use of silver methenamine staining in the study of the dark cell - light cell phenomenon. *Med Sci Res*, 1990;18:615-6.
86. Lačković V., Japundžić M., Milićević S., Japundžić I., Bumbaširević V. The use of silver nitrate solution for light and electron microscopic detection of heavy metal (iron) in lysosomes. *IRCS Med Sci*, 1984;12:556-7.
87. Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):358–369.
88. Lewandowska E, Zieliński A. White adipose tissue dysfunction observed in obesity. *Pol Merkur Lekarski.* 2016;40(239):333-6.
89. Lee JH, Kirkham JC, McCormack MC, Nicholls AM, Randolph MA, Austen WG Jr. The Effect of Pressure and Shear on Autologous Fat Grafting. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(5):1125-36.
90. Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP.

- Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(3):663-72
91. Li K, Gao J, Zhang Z, Li J, Cha P, Liao Y, Wang G, Lu F. Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. *Aesthetic Plast Surg.* 2013;37(1):153-8. Dec 12.
 92. Lord GM. Leptin as a proinflammatory cytokine. *Contrib Nephrol.* 2006;151:151-164.
 93. Majewska KA, Majewski D, Skowronska B, Fichna P. Serum resistin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus-negative relation to body fat mass. *Endokrynol Pol* 2014;65:342-347.
 94. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(8):1277-92.
 95. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* 2008;215:210–222.
 96. Mazzola RF, Cantarella G, Torretta S, Sbarbati A, Lazzari L, Pignataro L. Autologous fat injection to face and neck: from soft tissue augmentation to regenerative medicine. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2011;31(2):59-69.
 97. Minn KW, Min KH, Chang H, Kim S, Heo EJ. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34(5):626-31.
 98. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002;415:339-343.
 99. Mirancea N, Mirancea D. The ultrastructure of the white subcutaneous adipose tissue. *Proc. Rom. Acad., Series B*, 2011, 3, p. 206–211.
 100. Mojallal A, Veber M, Shipkov C, Ghetu N, Foyatier JL, Braye F. Analysis of a series of autologous fat tissue transfer for lower limb atrophies. *Ann Plast Surg* 2008;61:537-43.
 101. Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Brenton P, Foyatier JL. Improvement of skin quality after fat grafting: clinical observation and an animal study. *Plast*

- Reconstr Surg 2009;124(3):765-74.
102. Momiyama Y, Ohmori R, Uto-Kondo H, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, et al. Serum resistin levels and cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *J Atheroscler Thromb* 2011; 24; 18:108-114.
 103. Montgomery WW, Pierce DL. Anterior osteoplastic fat obliteration for frontal sinus: clinical experience and animal studies. *Trans Am Acad Ophthalmol. Otolaryngol*, 1963;69:46.
 104. Munding GS, Vogel JE. Calf Augmentation and Reshaping with Autologous Fat Grafting. *Aesthet Surg J*. 2016;36(2):211-20.
 105. Murray I, Köhl J, Cianflone K. Acylation-stimulating protein (ASP): structure-function determinants of cell surface binding and triacylglycerol synthetic activity. *Biochem J*. 1999; 342(Pt 1):41–48.
 106. Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation*. 1998;63(4):193-200.
 107. Neuber G. Fettransplantation. *Chir Kongr Verhandl Deutsche Gesellsch Chir*. 1893;20:66.
 108. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in survival of free grafts. *Laryngoscope* 2000;110 (8):1333-1338.
 109. Niechajev I (2005) Calf augmentation and restoration. *Plast Reconstr Surg* 116(1):295–305.
 110. Onogi Y, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, Kimura K, Inoue H, Yamamoto S, Ishii Y, Koya D, Tsuneki H, Sasahara M, Sasaoka T. Adipose Tissue Expansion and Glucose Metabolism via Vascular Remodeling in Diet- Induced Obesity. *Diabetes*. 2017;66(4):1008-1021.
 111. Panetti P, Accorsi D, Marchetti L, Sgrò F, Sbarbati A. Large-breast reconstruction using fat graft only after prosthetic reconstruction failure. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(5):703-8.
 112. Pereira LH, Radwanski HN (1996) Fat grafting of the buttocks and lower limbs. *Aesthetic Plast Surg* 20(5):409-16.
 113. Ploplis VA. Effects of Altered Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression on

- Cardiovascular Disease *Curr Drug Targets*. 2011;12(12): 1782–1789.
114. Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 2010;12:576–8.
 115. Report on autologous fat transplantation. ASPRS Ad-Hoc Committee on New Procedures. *Plast Surg Nurs* 1987;7:140–141.
 116. Rodbell M, Jones AB. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase c (clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem*. 1966; 241: 140–142.
 117. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem*. 1966;241:3909–3917.
 118. Rogers C, Moukdar F, McGee MA, Davis B, Buehrer BM, Daniel KW, Collins S, Barakat H, Robidoux J. EGF receptor (ERBB1) abundance in adipose tissue is reduced in insulin-resistant and type 2 diabetic women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):E329-40.
 119. Ross HM, Pawlina W. *Histology: Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. Philadelphia: Wolter Kluwer Health, 2016; 254-264.
 120. Rosen ED, Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat Cell. 2014;156(0): 20–44.
 121. 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(1):391-5.
 122. Saga Y, Takeda H. The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. 2001; *Nat Rev Genet* 2:835-845.
 123. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5(2):103-10.
 124. Saverio C. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* Published 21 October 2009 Vol. 297 no. 5, E977-E986.

125. Scott MM, Williams KW, Rossi J, Lee CE, Elmquist JK. Leptin receptor expression in hindbrain Glp-1 neurons regulates food intake and energy balance in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2413-2421.
126. Sbarbati D, Accorsi D, Benati L, Marchetti G, Orsini G, Rigotti P. Panettiere. Subcutaneous adipose tissue classification. *European Journal of Histochemistry*. 2010;54:e48.
127. Skorobac Asanin V, Sopta J. Lower Leg Augmentation with Fat Grafting, MRI and Histological Examination. *Aesthetic Plast Surg*. 2017;41(1):108-116.
128. Smith B, Bosnijak S, Nesi F, Lisman R. Dermis-fat orbital implantation :118 cases *Ophthalmic Surg* 1983;14:941.
129. Smith P, Adams Jr WP, Lipschitz AH, et al. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte survival. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(6):1836-44.
130. Sommer B, Sattler G. Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg* 2000; 26(12):1159-66.
131. Sowa Y, Yokota I, Itsukage S, Nakatsukasa K, Sakaguchi K, Taguchi T, Numajiri T. Evaluation of the severity of capsular contracture using elastography after breast implant reconstruction. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017 Feb 17.
132. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008; 453(7196):783-7.
133. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52:812-817.
134. Stamos M, Xepoulas P (2001) Fat transplantation for soft tissue augmentation in the lower limbs. *Aesthetic Plast Surg* 25(4):256-61.
135. Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, Brekken RA, Scherer PE. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 10;109(15):5874-9.

136. Tabit CJ, Slack GC, Fan K, Wan DC, Bradley JP. Fat Grafting Versus Adipose-Derived Stem Cell Therapy: Distinguishing Indications, Techniques and Outcomes. *Aesth Plast Surg* 2012;36(3):704-13.
137. Tan SS, Ng ZY, Zhan W, Rozen W. Role of Adipose-derived Stem Cells in Fat Grafting and Reconstructive Surgery. *J Cutan Aesthet Surg*. 2016;9(3):152-156.
138. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;9(5):667–684.
139. Teboul L, Gaillard D, Staccini L, Inadera H, Amri EZ, Grimaldi P A. Thiazolidinediones and Fatty Acids Convert Myogenic Cells into Adipose-like Cells. *J. Biol. Chem.* 1995;270:28183–28187.
140. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Current Opinion In Genetics & Development*. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5(5):571-6.
141. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(2):706-15.
142. Topcu A, Aydin OE, Ünlü M, Barutcu A, Atabey A. Increasing the viability of fat grafts by vascular endothelial growth factor. *Arch Facial Plast Surg*. 2012 Jul-Aug;14(4):270-6.
143. Trojahn K, Kølke SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Elberg JJ, Fischer-Nielsen A, Drzewiecki KT. Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg* 2012; 46(2):59-68.
144. Tsai CC, Lin SD, Lai CS, Lin TM. Aesthetic Analysis of the Ideal Leg. *Aesth Plast Surg*. 2000;24:303-305.
145. Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells* 2014;6(3): 312-321
146. Von Szalay L. Calf augmentation: a new calf prosthesis. *Plast Reconstr Surg*. 1985;75(1):83–87.

147. Wang G, Ren Y, Cao W, Yang Y, Li S. Liposculpture and fat grafting for aesthetic correction of the gluteal concave deformity associated with multiple intragluteal injection of penicillin in childhood. *Aesthetic Plast Surg*. 2013;37(1):39-45.
148. Wang P, Xu TY, Guan YF, Su DF, Fan GR, Miao CY. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovasc Res* 2009;81:370-380.
149. 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(1):48-55.
150. Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, et al. Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J* 2010;16:169-75.
151. Yu NZ, Huang JZ, Zhang H, Wang Y, Wang XJ, Zhao R, Bai M, Long X1. A systemic review of autologous fat grafting survival rate and related severe complications. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(9):1245-51.
152. Zac-Varghese S, Trapp S, Richards P, Sayers S, Sun G, Bloom SR, Reimann F, Gribble FM, Rutter GA. The Peutz-Jeghers kinase LKB1 suppresses polyp growth from intestinal cells of a proglucagon-expressing lineage in mice. *Dis Model Mech*. 2014;7(11):1275-86.
153. Zepf FD, Rao P, Moore J, Stewart R, Ladino YM, Hartmann BT. Human breast milk and adipokines--A potential role for the soluble leptin receptor (sOb-R) in the regulation of infant energy intake and development. *Med Hypotheses*. 2016;86:53-5.
154. Zocchi ML, Zuliani F. Bicompartamental breast lipostructuring. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32:313-28.
155. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
156. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
157. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer J, Morrison SJ. Leptin Receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 2014; 15(2): 154-168.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Violeta Skorobać Ašanin rođena je 09.02.1970. u Beogradu. Završila je Prvu beogradsku gimnaziju u Beogradu 1988. godine kao nosilac Vukove diplome i đak generacije. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je 08.02.1994. godine sa prosečnom ocenom 8.87. Diplomski ispit položila je sa ocenom 10 na temu „Elongacija ekstremiteta metodom po Ilizarovu“. Školske 1994/95. godine obavila je obavezan lekarski staž i započela specijalizaciju iz plastične i rekonstruktivne hirurgije na Klinici za opekotine, plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju KCS. Od 1996-2001. godine zaposlena na IKVB „Dedinje“.

Magistarski rad na temu „*Digitus malleus i mogućnosti lečenja*“ odbranila 21.02.2000. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Specijalistički ispit iz oblasti plastične i rekonstruktivne hirurgije položila sa odličnom ocenom 25.04.2000. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2001-2005. godine osnivač i vlasnik Specijalističke ordinacije za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju „DIONA“.

Od 2005. godine i dalje vlasnik i osnivač Specijalne bolnice za plastičnu, rekonstruktivnu i estetsku hirurgiju „DIONA“ u Beogradu.

Predavač je na brojnim međunarodnim i nacionalnim kongresima i kursovima. Nacionalni sekretar je u međunarodnoj organizaciji za plastičnu i estetsku hirurgiju ISAPS od 2012. godine i dalje. Dobitnica nagrade za najbolje rezultate iz oblasti ultrazvučne liposukcije 2003. godine od Američkog udruženja za kozmetičku hirurgiju. Dobitnica je nagrade „Cvet uspeha za ženu Zmaja 2012“ za pionirski preduzetnički poduhvat.

Predsednik je udruženja estetskih plastičnih hirurga Srbije „SRBSAPS“ od 2016 godine. Osnivač i član izvršnog odbora Asocijacije privatnih zdravstvenih ustanova i privatne prakse od 2014. godine. Počasni član udruženja estetskih hirurga Rumunije „RAAS“ i udruženja estetskih, plastičnih hirurga kneževine Monako „SMDRECPE“, od 2016 godine. Reviewer u časopisu „*Aesthetic Plastic Surgery Journal*“ od 2016. godine. Osnivač i član udruženja ISAPS Women od 2017. godine. Član je nacionalnog i evropskih i međunarodnih udruženja za plastičnu, rekonstruktivnu i estetsku hirurgiju.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Violeta Skorobać Ašanin

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Analiza preživljavanja autolognih adipocita u rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.09.2017. god.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Violeta Skorobać Ašanin

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada Analiza preživljavanja autolognih adipocita u rekonstruktivnoj i
plastičnoj hirurgiji

Mentor prof.dr Jelena Sopta

Potpisani Violeta Skorobać Ašanin

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.09.2017. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Analiza preživljavanja autolognih adipocita u rekonstruktivnoj i plastičnoj hirurgiji koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.09.2017. god.