

혈소판 농축액이 이식된 지방의 생존에 미치는 영향

김승준 · 최원일 · 이병일 · 박승하 · 박 철 · 구상환

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

The Effect of Platelet-Rich Plasma(PRP) on the Survival of the Autologous Fat Graft

Seung Jun Kim, M.D., Won Il Choi, M.D.,
Byung Il Lee, M.D., Seung Ha Park, M.D., Chul Park, M.D.,
Sang Hwan Koo, M.D.

Department of Plastic Surgery, Korea University College of
Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Platelet-rich plasma(PRP) contains protein growth factors, which are actively secreted by platelets to promote wound healing. However, it is not clear whether the injection of PRP into the autologous fat grafts increases the survival rate and the degree of angiogenesis.

Methods: New Zealand White rabbit ears were injected fat with PRP, saline, insulin or isoproterenol (n=8/each group) for observation of the survival and degree of angiogenesis of the injected fat. The volume of the harvested fat and the degree of angiogenesis from dorsum of rabbit ears were evaluated 4, 8, and 12 weeks after the autologous fat graft. The degree of angiogenesis was measured with microvascular density (MVD) counts.

Results: The volume of harvested fat decreased in a time-dependent manner after autologous fat grafts, but the decrease rate in volume of harvested fat was slower in PRP-injected group compared to that of other control groups. The difference in the volume of the harvested fat between PRP-injected group and other control groups became significant from 4 weeks after the autologous fat graft, and was maintained up to 12 weeks. However, there was no significant difference between PRP-injected group and insulin-injected group 8 and 12 weeks after the autologous fat graft. On the contrary, MVD counts increased in a time-dependent manner after autologous fat grafts. The MVD counts were significantly

higher in PRP-and insulin-injected groups than in other control groups from 4 weeks after the autologous fat graft, and these differences were maintained up to 12 weeks. There was no correlation between mean platelet numbers and the volume of harvested fat.

Conclusion: The present study demonstrates that PRP-injection into autologous fat grafts increases the survival rate and the degree of angiogenesis. Thus, PRP injection with autologous fat grafts would be a promising tool for maintaining the volume of the grafted fat.

Key Words: Platelet rich plasma, Fat graft

I. 서 론

1893년 Neuber¹에 의해 인체에 처음으로 지방이식(fat transplantation)이 시도된 이래 지금까지 지속적인 연구를 통해 지방이식의 기술과 이론적 배경이 발전해 오고 있으며 최근들어 사용이 계속 증가하는 추세이다.

자가지방이식은 시술의 간편함과 함께 이물반응이 없고 공여부 손실이 적다는 장점에도 불구하고 이식된 지방의 흡수라는 문제 때문에 수혜부의 결과를 정확히 예측하기 어렵다는 단점이 있다. 시술자와 방법에 따라 차이가 있지만 일반적으로 이식된 지방은 8-12개월 동안에 30-60% 정도가 흡수되는 것으로 알려져 있으며,² 지방이식에 있어서 생존율을 향상시키는 것이 지방이식 시술에 가장 큰 과제 중 하나라고 할 수 있겠다.

아직까지 이식된 지방의 생존기전이나 흡수되는 과정에 대해 정확히 알려지지 않고 있으나 지방이식 초기 혈관 재생이 지방세포의 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, *in vitro*에서 인슐린이나 이소프로테레놀과 같은 약물이 혈관신생에 중요한 vascular endothelial growth factor(VEGF)와 같은 사이토카인(cytokine)의 분비를 증가시킴으로써 이식지방의 생존율을 높이는 것이 연구된 바 있다.³ 한편 혈소판은 platelet derived growth factor(PDGF), VEGF, transforming growth factor(TGF), epithelial growth factor(EGF) 등의 성장인자를 분비함으로써 혈관신생을 촉진하고 최근에는 창상치유 등의 다양한 분야에 사용되고 있다.⁴

Received January 24, 2007

Revised February 27, 2007

Address Correspondence: Sang Hwan Koo, M.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Medical Center, 126-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-705, Korea. Tel: 02) 920-5368 / Fax: 02) 922-7437 / E-mail: shkoo@korea.ac.kr

* 본 논문은 고려대학교 특별연구비에 의하여 수행되었음.

따라서 본 연구의 목적은 혈소판이 이식지방의 생존율 증가에도 도움을 줄 것이라는 가설 하에 *in vivo*에서 지방 이식 시 지방과 함께 혈소판이 농축되어있는 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 투여함으로써 생존율과 신생혈관화 정도를 증가시킬 수 있는지 알아보고 생존율 증가 정도를 기존에 알려진 인슐린 등과 같은 약제와의 효과를 비교함으로써 이식지방의 생존율을 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 찾는 것이다.

II. 재료 및 방법

가. 실험동물 및 약제

실험동물로서 수컷 백색 가토(New Zealand White rabbit) 24마리를 대상으로 지방이식을 시행하고, 이식된 지방을 회수한 다음 이식된 지방조직의 생존 정도와 혈관 신생 정도를 비교 관찰하였다. 실험 전 이들의 체중은 2.5-3.0 kg(평균 2.7 kg)이었으며 실험기간 동안 평균 320g의 체중 증가가 있었다.

인슐린은 Humalog[®] 주사액(Insulin lispro injection 100 IU/ml, Lilly, France) 10 nmol(약 1.3 IU)을 주사용 생리식염수로 희석하여 0.5 ml의 용량으로 만들어 지방이식 시 이식지방에 같이 주사하였다.

이소프로테레놀은 Isuprel[®](Isoproterenol hydrochloride 0.2 mg/ml, Abbott, U.S.A.) 주사액을 사용하여 역시 10 nmol을 생리식염수로 0.5 ml가 되게 희석하여 지방이식 시 이식지방에 같이 주사하였다.

첨가되는 약제에 따라 대조군(생리식염수), 인슐린 처치군, 이소프로테레놀 처치군, 그리고 혈소판 농축액 처치군으로 나누었으며 각각의 제제가 첨가된 지방을 총 24마리의 가토에서 지방이 이식될 양측 귀 배부를 중심 정맥을 기준으로 각각 두 개의 소지역으로 나누고, 대조군과 세가지 실험군들이 한 마리의 실험동물에 모두 존재하도록 계획하였는데, 이러한 시도는 약물에 따른 실험결과의 해석에 있어 개체간 변이에 따른 오차를 최소화하기 위해서였다.

나. 혈소판 농축액 제작

실험동물의 서혜부 대퇴정맥으로부터 혈액 12 ml를 채혈하여 혈소판 농축액을 제작하였다(Fig. 1). 12 ml의 혈액을 EDTA가 함유된 채혈용 시험관에 4 ml씩 나누어 담고 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 분리하여 두개의 시험관에 나누어 담았다. 다시 두개의 시험관을 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 하층에 침전되어 있는 혈소판 농축액을 제작한 후 하나는 지방이식에 사용하였고 다른 시험관의 혈소판 농축액은 혈소판 개수 측정을 위해 사용하였으며 측정 결과 지방과 함께 투여한 혈소판의

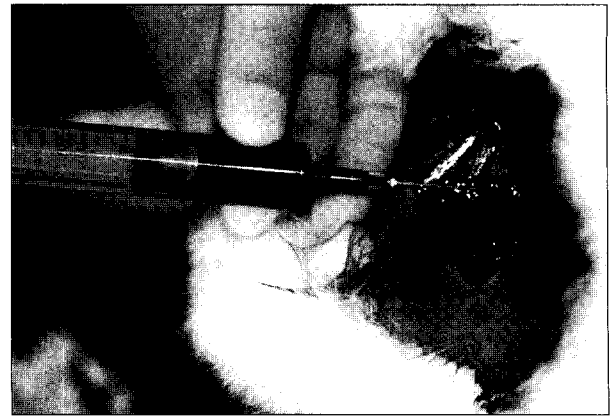


Fig. 1. Blood was collected from femoral vein after removal of fat.

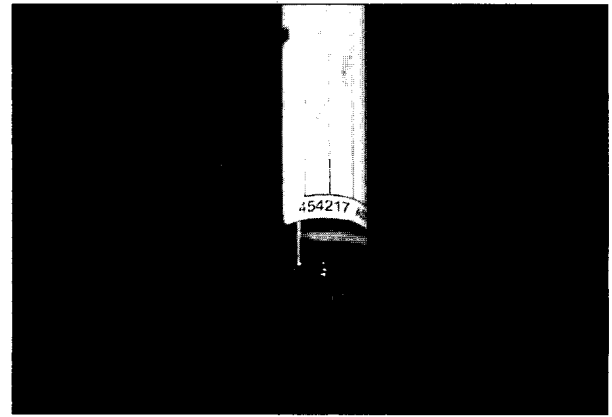


Fig. 2. A layer of whitish platelets and a layer of red cells were seen after 2nd centrifuging.

개수는 평균 $2.59 \pm 0.46 (\times 10^9)$ 개였다(Fig. 2).

다. 지방채취 및 이식

Zoletil[®](Tiletamine 125 mg, Zolazepam 125 mg, Virbac, France)을 실험동물 kg당 15 mg과 Rompun[®](xylazine hydrochloride, 23.32 mg/ml, Bayer Korea Corp., Korea)을 실험동물 kg당 10 mg 혼합하여 근육 내 주사하여 마취하였다.

지방의 공여부인 양측 서혜부를 베타딘으로 소독하고 한쪽 서혜부에 5 cm 길이의 절개를 가한 다음 박리하여 지방조직을 노출하였다. 가능한 주변 근막조직이 적게 포함되도록 순수 지방만을 채취하였으며, 반대쪽 서혜부에서도 같은 조작을 반복하여 최대한의 지방조직을 채취하도록 노력하였다. 채취된 지방조직은 생리식염수에 간단히 씻어 낸 후 거즈로 주변의 물기를 닦아낸 다음 소독된 유리 접시에 옮겨 놓고 수술용 가위를 이용하여 작은 조각으로 자르고 2 ml 주사기를 이용하여 지방이 1 ml가 되도록

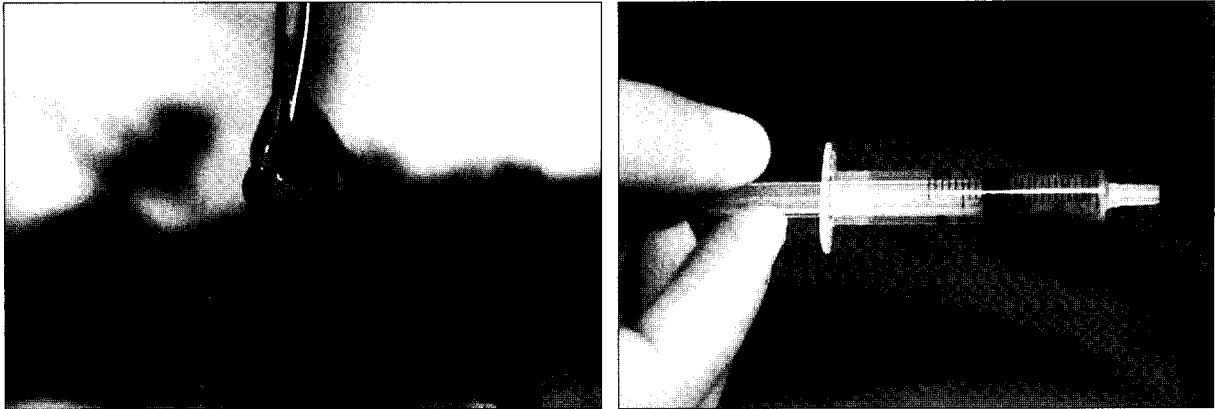


Fig. 3. (Left) A view showing harvested fat tissue in groin. (Right) Fat was prepared for grafting.



Fig. 4. The fat was subcutaneously injected using a cannula.

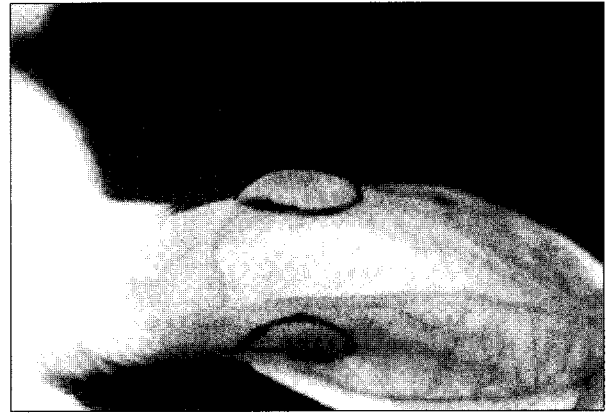


Fig. 5. An view immediately after fat grafting.

채운 다음 20 gauge 캐놀라를 통해 주입이 가능하도록 준비하였다(Fig. 3).

지방조직이 거의 존재하지 않는 가토의 귀 배부에 지방 1 ml와 약물 0.5 ml를 혼합하여 20 gauge 캐놀라를 통해 주입하였으며(Fig. 4), 젤라틴폼 스펀지를 이용하여 인슐린과 이소프로테레놀을 일정하게 공급되도록 하였다. 지방이 이식되는 층은 귀 배부의 피부 바로 아래층으로 귀 연골막 상방에 위치하도록 하였으며, 이식 부위는 귀의 근위부 1/3지점에서 수혜부끼리 서로 교통되지 않도록 귀의 중심동맥 양쪽의 변연정맥사이에 각각 한 곳씩, 양측 귀 모두 네 곳에 각각의 약물을 혼합한 지방을 이식하였다. 또한 지방이식 시의 기술적인 오차를 최소화하기 위하여 지방을 넓게 퍼지 않고 한 곳에 덩어리 형태로 주사하였다(Fig. 5).

라. 이식지방의 회수

이식 후 4주, 8주, 그리고 12주가 경과할 때마다 8마리씩 희생시켜 이식된 지방조직을 회수하였다. 육안적으로 부피의 유지 정도를 관찰한 후 지방조직을 회수하였다

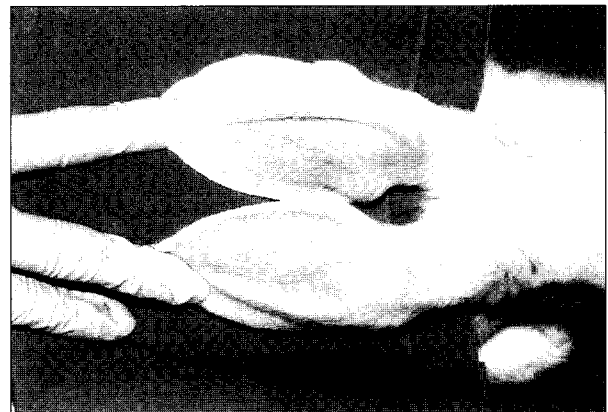


Fig. 6. A view of an ear dorsum at 8 weeks after fat grafting.

(Fig. 6). 귓바퀴의 후면 중앙선 부위에 절개를 가한 다음 우선 이식된 지방조직과 이를 덮고 있는 피부조직의 분리를 시행하고, 이후 연골과의 접착면을 골막 거상기(perioosteal elevator)를 이용하여 이식지방을 수혜부로부터 분리하였다. 이때 가능하면 확실한 주변조직(연골, 진

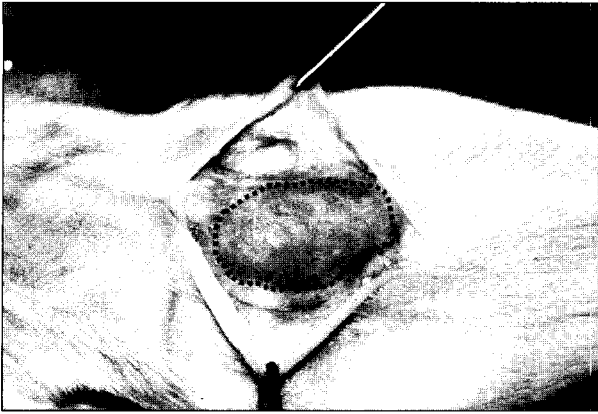


Fig. 7. A grafted fat(dotted area) was seen in subcutaneous area.

피조직)을 제외하고는 모두 지방조직에 붙임으로써, 새롭게 형성된 결체조직이 이식지방조직 내로 자라 들어간 신생혈관이 보존되도록 하였다(Fig. 7).

마. 정량분석

회수한 지방조직을 생리식염수에 세척한 뒤 마른 거즈로 주위의 물기를 제거하였다. 지방조직의 부피 측정을 위해 2 ml 주사기에 생리식염수 1 ml를 채운 후 회수한 지방을 주사기에 넣어 증가된 식염수의 부피로 지방조직의 부피를 간접 측정하여 이식 전과 후의 부피 변화를 비교 분석하였다(Fig. 8).

바. 조직학적 분석

조직학적 검사를 위하여 회수한 지방조직을 hematoxylin-eosin 염색을 한 뒤 슬라이드에 봉입하고 40배와 100배 광학 현미경 하에서 조직학적 소견을 관찰하고 신생 혈관화 정도를 계측하였다.

조직내의 신생 혈관화 정도는 microvascular density (MVD)법을 이용하였다. 절단된 조직에서 최소 2곳 이상의 방향에서 지방조직으로 둘러싸인 결체조직을 중심으로 하여 100배 광학 현미경 시야 상에서 확실한 미세혈관의 개수를 측정하였다. 일정한 내경(lumen)을 확보하고 있는 개체들 중 혈관 외부와의 경계가 명확하고, 내부에 적혈구를 2개 이상 포함하거나, 확실한 혈관 내피세포(endothelial cell)를 갖는 것만을 미세 혈관으로 인정하였다(Fig. 9).

사. 통계처리

모든 결과는 평균과 표준편차를 구하였고, 각각 실험기간에 따른 각 군간의 비교는 비모수적 검정방법인 Mann-Whitney U test를 사용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였으며, 상관관계분석은 Pearson correlation test를 하였

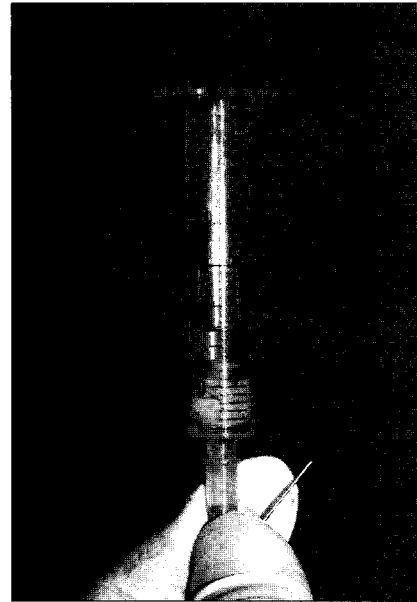


Fig. 8. Liquid overflow method for calculating of the volume of the fat.

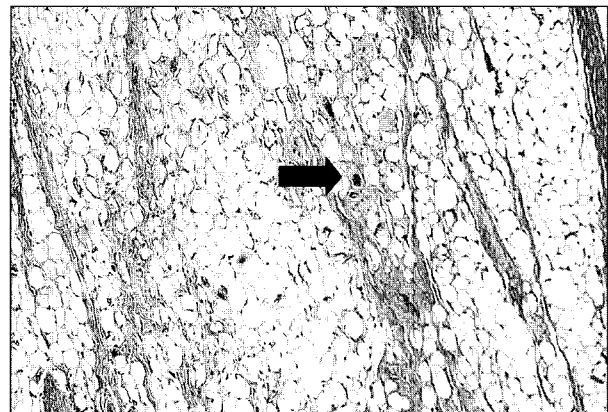


Fig. 9. A microvessel(arrow) with red blood cells and endothelial lining cells were shown (Hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

고 SPSS(Ver.10.0 SPSS inc, USA.)를 이용하였다.

III. 결 과

실험기간 중 1마리의 토끼(4주차 실험 군)가 사망하여 총 23마리의 토끼, 92곳의 지방을 회수하여 실험에 이용하였다.

가. 육안적 소견

이식된 지방조직은 서로 다른 군과의 연결은 관찰할 수 없었고 이식된 지방조직의 회수 과정에서는 대부분 얇은

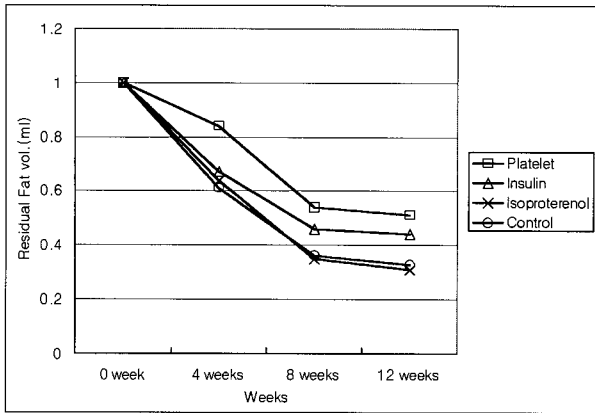


Fig. 10. The amounts of residual fat in control, insulin-treated, isoproterenol-treated and PRP-treated groups at 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks after fat graft.

피막층이 형성되어 있어 주변부와 쉽게 분리할 수 있었다. 이식 후 4주가 지난 군에 비해 이식되어 있는 기간이 늘어남에 따라 팽윤의 정도는 감소하였으나 8주와 12주째에는 육안적인 부피변화를 관찰할 수 없었다. 회수된 지방조직은 실험군 간의 육안적 차이는 뚜렷하지 않았으며, 일부 조직에서 지방조직 중심부의 괴사와 삼출물을 확인할 수 있었다.

나. 이식지방의 부피변화

실험 4주에 회수된 지방의 부피는 혈소판군에서 0.84 ± 0.086 ml로 가장 컸으며 대조군(0.61 ± 0.13 ml), 인슐린군(0.67 ± 0.044 ml), 이소프로테레놀군(0.6 ± 0.013 ml) 등과 비교할 때 통계적으로도 유의하였으나($p < 0.05$), 혈소판군 이외의 다른 군들 사이에는 통계적 유의성이 없었다. 실험 8주와 12주에는 각각 혈소판군이 0.54 ± 0.13 ml, 0.51 ± 0.12 ml로 대조군 0.36 ± 0.084 ml, 0.33 ± 0.092 ml 및 이소프로테레놀군 0.35 ± 0.073 ml, 0.31 ± 0.072 ml에 비해 통계적으로 유의하게 지방부피의 차이가 있었으나($p < 0.05$) 인슐린군(0.46 ± 0.070 ml, 0.44 ± 0.067 ml)과는 통계적 유의성이 없었다. 또한 인슐린군과 대조군 및 이소프로테레놀군 사이에도 통계적으로 유의하게 지방부피의 차이가 있었다($p < 0.05$, Fig. 10).

다. 이식지방내의 신생혈관

실험 4주에는 이소프로테레놀군이 1.9 ± 0.9 개로 혈소판군(3.6 ± 0.98 개)이나 인슐린군(3.9 ± 0.9 개)에 비해 신생혈관의 수가 적었으며($p < 0.05$) 그 외 다른 군 사이에는 통계적 유의성이 없었다. 실험 8주에는 혈소판군이 4.80 ± 1.17 개, 인슐린군이 5.10 ± 1.25 개로 이소프로테레놀군(3.10 ± 1.13 개)이나 대조군(3.30 ± 1.49 개)에 비해 신생혈

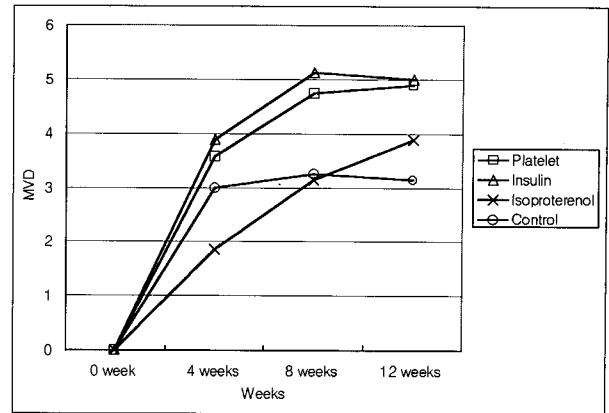


Fig. 11. Microvascular density(MVD) in control, insulin-treated, isoproterenol-treated and PRP-treated groups at 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks after fat graft.

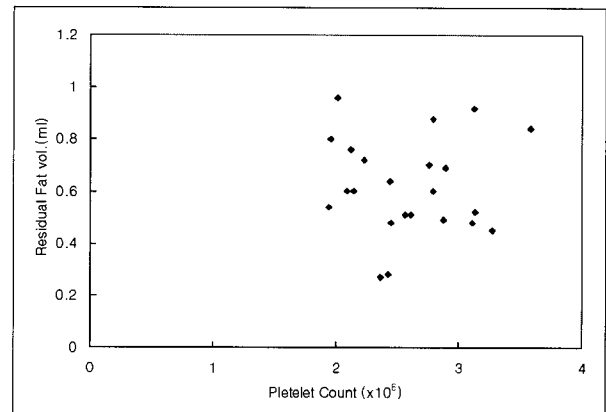


Fig. 12. Distribution chart of platelet count and residual fat volume.

관의 수가 많았다($p < 0.05$). 실험 12주에는 인슐린군이 5.00 ± 1.31 개로 대조군(3.10 ± 1.55 개)에 비해 신생혈관의 수가 많았고($p < 0.05$) 그 외 다른 군들 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 11).

라. 투여한 혈소판 수와 이식지방의 부피 변화와의 상관관계

지방과 함께 투여한 혈소판의 평균수는 $2.59 \pm 0.46 (\times 10^9)$ 개로 Fig. 12에서 보는 바와 같이 이식한 지방의 남아 있는 부피와 투여한 혈소판 수 간에는 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다($R^2 = 0.000$, Fig. 12).

IV. 고 찰

지방이식은 자기조직과 잘 융화되며, 대부분의 사람들에게서 사용 가능한 충분한 양을 확보할 수 있고 필요한

경우 언제든지 제거할 수 있다는 장점 때문에 그 시술이 증대되고 있으나 이식지방의 생존율을 예측하기 힘들다는 단점이 있다.

이식지방조직의 생존에 관해서는 아직 명확히 밝혀진 것은 없지만 현재 두 가지 가설로 설명되고 있다. 첫째는 이식된 지방세포는 모두 사멸하고 섬유조직이나 새로이 형성된 후형 지방(metaplastic fat)으로 대체 된다는 숙주 세포 대체설(host cell replacement theory)과, 둘째는 이식된 지방세포가 조직 내에서 생존을 유지한다는 세포 생존설(cell survival theory)이다.⁵ 최근에는 이런 가설에 더불어 줄기세포에 관한 연구가 활발해지면서 지방조직에서 유래된 줄기세포(adipose tissue derived stem cells)가 이식지방의 생존에 큰 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있으며 특히 지방채취와 이식 과정에서 지방조직이 받는 손상으로부터의 극복과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.^{6,7}

임상적으로 이식지방의 생존율을 향상시키기 위하여 tumescent 용액의 사용, 지방채취 및 주입 시의 케놀라의 종류, 주입하는 깊이, 주입하는 양, 채취지방의 정제 및 보관방법 등에 관한 다양한 방법들이 개발되고 있으나 아직 대부분의 사람으로부터 인정받을 수 있는 표준화된 방법은 없다.⁸⁻¹¹ 또한 인슐린, 베타차단제, 이소프로테레놀 등 다양한 약물의 혼합도 시도되고 있는데 이러한 약물들은 지방의 합성을 증가시키거나 이식지방 내에 VEGF와 관련하여 혈관신생을 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{12,13}

저자는 이식지방의 생존율을 향상시키기 위하여 위에서 언급한 일부 약물들과 함께 최근 만성 창상치유나 유리 골 이식 등과 같은 다양한 방면에서 사용 및 연구되고 있는 혈소판의 효과를 비교하고자 하였다.

혈소판의 알파(a) 과립에는 PDGF, VEGF, TGF, EGF 등의 다양한 성장인자가 함유되어 있어 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PDGF는 창상치유로 섬유모세포, 단핵구, 대식세포를 불러들이는 기능이 있고 섬유모세포, 혈관내피 세포, 혈관평활근세포 등의 분열을 자극하여 섬유화와 혈관신생을 촉진시킨다. TGF- β 는 섬유모세포 등의 증식을 자극하고 혈관 신생 및 섬유화를 촉진시키지만 다른 성장인자나 세포외기질(extracellular matrix)과의 상호작용에 따라 그 역할이 매우 다양하다. VEGF는 혈관투과성을 증가시키고 단핵구를 활성화시키고 혈관 신생을 촉진한다. EGF는 일반적인 상처에서 상피화를 촉진시키는 것으로 보고되고 있다.¹⁴

Eppley 등¹⁵은 55 ml의 혈액에서 6 ml의 PRP를 분리한 후 혈소판 수와 성장인자의 함량을 분석하였는데 6 ml의 PRP에 혈소판 9.6×10^9 개가 있으며 PDGF-BB의 함량이 10 pg/106 platelets라고 보고하였다. 본 연구에서는 PDGF 등의 사이토카인에 대한 정량분석은 하지 않았으나 토끼

의 혈액 12 ml로부터 추출한 PRP에 함유되어 있는 혈소판의 수를 측정된 결과 평균 4.32×10^9 개로 Eppley 등¹⁵에 비해 약 2배 정도 많은 양을 획득할 수 있었다. 본 실험에서 지방 1 ml와 함께 투여한 혈소판의 수는 혈액 약 7 ml (채취한 혈액 12 ml 중에 세포수 측정을 위해 사용된 양 제외)로부터 얻은 것으로 일반적으로 임상에서 이식되는 지방의 양을 생각한다면 상당량의 혈액을 채취해야 할 것으로 생각되나, 실험결과에서 혈소판 수와 잔여 지방간의 상관관계가 통계적으로 의미가 없는 것으로 보아 본 연구에서 사용한 혈소판의 수가 실제 필요양보다 많은 것으로 판단되며 임상에 적용한다면 필요한 혈액의 양은 줄어들 것이다.

본 실험결과 흡수되지 않고 남은 지방의 양은 일반적으로 임상에서 보고되는 양보다 적은 것을 알 수 있는데 이는 임상술기처럼 지방을 이식할 때 넓게 퍼거나 여러 층으로 이식한 것이 아니라 실험과정의 편차를 줄이기 위해 하나의 종괴 형태로 이식했기 때문인 것으로 보이며 실제로 이식한 지방을 회수할 때 육안적으로 중심부의 피사가 있는 조직들을 확인할 수 있었다.

이식지방의 부피를 보면 혈소판군이 통계적으로 유의하게 대조군이나 이소프로테레놀군에 비해 잔여지방의 양이 많은 것을 알 수 있으며 4주에 다른 모든 군보다 가장 높은 생존율을 나타내고 있다. 비록 통계적으로 유의하지는 않으나 8주와 12주에 인슐린 처치 군에 비해서도 잔여 지방의 양이 많았다. 그러나 미세혈관밀도(MVD)를 보면 인슐린 처치 군이 혈소판 처치 군에 비해 더 많은 것을 알 수 있는데 이는 지방생존에 있어서 신생혈관 뿐만 아니라 다른 요소들도 필요하다는 것을 유추하게 한다. 이식지방의 생존에 관한 것은 앞서서도 언급했듯이 정확히 밝혀져 있지 않으나 인슐린과는 다르게 혈소판은 다양한 성장인자를 분비하고 주위의 다른 세포들과 상호 작용함으로써 역할을 하는 것으로 보인다.

혈소판 농축액을 임상에 적용하기 위해서는 적정 혈액 양과 투여방법 그리고 발현 가능한 합병증 등에 대한 문제가 해결되어야 하며 혈소판 농축액의 성분 분석과 이들이 이식된 지방에 작용하여 더 높은 생존율을 나타내는 것에 대한 추가 연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구를 통해 지방이식 시에 혈소판 농축액의 투여는 이식지방의 생존율 향상에 도움을 주는 것을 알 수 있었으며 인슐린과 비교해 볼 때 혈관신생 뿐만 아니라 다양한 경로를 통해 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 앞으로 혈소판농축액 투여에 관한 추가적인 연

구를 통해 임상 적용에 가능할 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Sommer B, Sattler G: Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg* 26: 1159, 2000
2. Shin KS, Kang JS, Kwon KY: Experimental comparison of survival between dermis-fat graft and fascia-fat graft. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 27: 258, 2000
3. Fain JN, Madan AK: Insulin enhances vascular endothelial growth factor, interleukin-8, and plasminogen activator inhibitor 1 but not interleukin-6 release by human adipocytes. *Metabolism* 54: 220, 2005
4. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA: Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 483, 2001
5. Coleman SR: Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 118: 108, 2006
6. Von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S, Staiger H, Pallua N: Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 178: 87, 2004
7. Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N: Cryopreservation of mature human adipocytes: *in vitro* measurement of viability. *Ann Plast Surg* 55: 408, 2005
8. Hunstad JP: Tumescant and syringe liposculpture: a logical partnership. *Aesthetic Plast Surg* 19: 321, 1995
9. Schuller-Petrovic S: Improving the aesthetic aspect of soft tissue defects on the face using autologous fat transplantation. *Facial Plast Surg* 13: 119, 1997
10. Coleman SR: Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 19: 421, 1995
11. Toledo LS, Mauad R: Fat injection: a 20-year revision. *Clin Plast Surg* 33: 47, 2006
12. Ayhan M, Şenen D, Adanali G, Görgü M, Erdoğan B, Albayrak B: Use of beta blockers for increasing survival of free fat grafts. *Aesthetic Plast Surg* 25: 338, 2001
13. Brownsey RW, Edgell NJ, Hopkirk TJ, Denton RM: Studies on insulin stimulated phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase, ATP citrate lyase and other proteins in rat epididymal adipose tissue. Evidence for activation of a cyclic AMP-independent protein kinase. *Biochem J* 218: 733, 1984
14. Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL: Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg* 90: 133, 2003
15. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J: Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 114: 1502, 2004