

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA CURCUMİNİN OTOLOG YAĞ GREFTLERİNİN
SAĞ KALIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ: DENEYSEL
ÇALIŞMA

Dr. Mahmut ÖZGÜL

Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2017

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ UNİVERSİTESİ
TIP FAKULTESİ

SIÇANLARDA CURCUMİNİN OTOLOG YAĞ
GREFTLERİNİN SAĞ KALIMINA ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ: DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. Mahmut ÖZGÜL

Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. Yakup KARABAĞLI

ESKİŞEHİR
2017

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Mahmut ÖZGÜL'e ait "Sıçanlarda curcuminin otolog yağ greftlerinin sağ kalımına etkisinin belirlenmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Cengiz ÇETİN
Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Yakup KARABAĞLI
Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM
Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun

Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Alparslan BİRDANE
Rektör Yardımcısı
Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında tamamladığım uzmanlık ve tezi sürecinde; tecrübe, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşarak her ihtiyacım olduğunda yardımcı olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Cengiz ÇETİN, Prof. Dr. A. Aydan KÖSE, tez danışmanım Prof. Dr. Yakup KARABAĞLI ve Yrd.Doç.Dr. A. Emre KOÇMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezimin histoloji ayağında desteklerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ'e ve preperatların hazırlanmasında yardımcı olan Yücel OKATALI'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Özgül, M. Sıçanlarda curcuminin otolog yağ greftlerinin sağ kalımına etkisinin belirlenmesi: deneysel çalışma. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2016 Curcumin, C. longa bitkisinin (Zerdeçal) kökünden ekstrakte edilen, uzun zamandır doğu tıbbında, ağrı ve enfeksiyonlarda semptomatik tedavi amaçlı kullanılan, son 20 yıldır modern tıpta kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılan bir maddedir. Kemoterapi rejimlerinin toksisitelerinin azaltılmasında, diabetes mellitusta- mikrovasküler komplikasyonların önlenmesinde, gözde inflamasyon ile giden hastalıkların tedavilerinde, yara iyışelmesi ile ilgili yapılan birçok çalışmada kullanılmış ve olumlu sonuçlar raporlanmıştır.^{19,21,69} Çalışmada 84 adet Sprague Dawley (dişi) cinsi sıçanda inguinal yağ yastıklarından yağ greftleri alınarak, ağırlık ve volumleri ölçüldükten sonra ensede cilt altında oluşturulan bir cebe yerleştirildi. Sıçanlar 5 grupta [sham, control, oral curcumin(OC), topikal curcumin(TC), oral + topikal curcumin(OTC)] olacak şekilde çalışma planlandı. Her gruptan (sham hariç) ikişer sıçan çalışmanın 1., 4., 7., 14. günlerinde (erken dönem), geriye kalanlar 98. gününde (geç dönem) sakrifiye edilerek volum ve ağırlık ölçümleri ve perilipin ile immunohistokimyasal ve Hemotoksilen Eozin ile mikroskopik incelemeleri yapıldı. Topikal curcumin uygulanan gruplarda (TC, OTC) yağ greftlerinin ağırlık ve hacimlerdeki “yüzde değişim” topikal uygulanmayan gruplarınkine göre (C, OC) istatistiksel açıdan anlamlı- anlamlıya yakın oranda az olarak gerçekleşti. (p< 0,05- p= 0,062). İmmunohistokimyasal ve histolojik açıdan preparatların incelenmesinde ise topikal curcumin uygulanan yağ greftlerinde erken dönemde adiposit hücre bütünlüğünün daha iyi korunduğu, hücreyel infiltrasyonun, hemorajinin, kist vakuol formasyonlarının daha az olduğu, damarlanmanın daha fazla olduğu saptandı. Yağ greftleri üzerine topikal curcumin uygulanması yağ greftlerinin sağ kalımına katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Yağ grefti, curcumin, perilipin

ABSTRACT

Özgül, M. Effect of curcumin on fat graft survival in rats: experimental study. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Specialty Thesis of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery, Eskişehir, 2016. Curcumin, extracted from the roots of plant *C. Longa*, has been widely used in eastern medicine for centuries for the treatment of infections and pain management, is vastly studied in modern medicine in the last 20 years. In oncology it's studied for its anti-carcinogenic properties and also to reduce toxicity of chemotherapeutics, in diabetes especially to prevent microvascular complications, in ophthalmology for inflammatory diseases, in wound healing and many more and positive results obtained.^{19,21,69} In this study 84 Sprague Dawley rats' (female) inguinal fat pads excised, weight and volume measures recorded and put under the scalp flap as fat grafts. Rats grouped in 5 [sham, control, oral curcumin(OC), topical curcumin(TC), oral + topical curcumin(OTC)] and at the days 1. , 4. , 7. and 14. Days two rats from each group (excluding sham) were sacrificed, grafts extracted and stained with Perilipin for immunohistochemical and Hemotoxilen- Eozin for histological examination. At the day 98 all groups were sacrificed, fat grafts extracted and same stains applied also weight and volume differences recorded. Topical curcumin applied groups' (TC, OTC) weight and volume "percent change" was statistically significantly lower than groups which curcumin not topically applied (C, OC). ($p < 0.05$, $p = 0,062$). Early biopsies' histological and immunohistochemical examinations show that topically curcumin applied groups have more adipocytes that maintain their shape, more neovascularization and less tissue cellular infiltration, hemorrhagy and cyst and vacuol formation. Topically applied curcumin on fat grafts increased fat graft survival rate.

Key Words: Fat graft, curcumin, perilipin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yağ Dokusu Yapısı Fizyolojisi ve Histolojisi	3
2.2. Yağ Grefti	4
2.2.1. Yağ Greftinin Tarihçesi	4
2.2.2. Yağ Greftlerinin Klinik Kullanımı	5
2.2.3. Yağ Greftinde Sağ Kalım Sorunu	6
2.2.4. Yağ Grefti Komplikasyonları	7
2.3. Curcumin	10
2.3.1 Genel Bilgiler	10
2.3.2. Tıbbi Kullanım Alanları ve Rasyonelleri	12
2.3.3. Curcuminin Yağ Dokusu Üzerine Etkileri	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1 Deney Grupları ve Kullanılan Ajanlar	15
3.2 Deney Akış Planı ve Uygulanan Cerrahi İşlemler	16
3.3 Histolojik ve İmmunohistokimyasal Boyamalar	23
3.4 İstatistiksel Yöntemler	26
4. BULGULAR	27
4.1 Makroskopi	27
4.2 Ağırlık ve Hacim Ölçümleri	30

4.3	Histoloji ve İmmunohistokimya	32
4.3.1.	Erken Dönem Histoloji ve İmmunohistokimya	33
4.3.2.	Geç Dönem Histoloji ve İmmunohistokimya	66
5.	TARTIŞMA	75
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	81
	KAYNAKLAR	82



SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	Adenilat Monofosfataz
COX	Siklooksijenaz
DMSO	Dimetilsulfometaksazol
ICAM	Intraselüler hücre adezyon molekülü
IFN	Interferon
IL	Interlökin
LOX	Lipoksijenaz
LT	Lökotrien
NF- KB	Nükleer Faktör – Kappa Beta
PGE	Prostaglandin E
PMNL	Polimorf nüveli lökosit
PRP	Platelet Rich Plasma
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1. Curcumin formülasyonu	10
2.2. Curcuminin oral ve i.v. / i.p. uygulanmasını takiben metabolizması	11
3.1. Tek parça çıkarılan yağ greftlerinin kesit alanları	25



TABLULAR

	Sayfa
2.1. Yağ grefti uygulamasında görülebilen komplikasyonlar	9
3.1. Gruplar, hayvan sayıları (n) ve biyopsilerin alındığı günler	18
4.1. Ağırlıkların yüzde değişiminin gruplar arasında karşılaştırılması	31
4.2. Hacimlerin yüzde değişiminin gruplar arasında karşılaştırılması	31
4.3. Gruplarda günlere göre gelişen skorlamalar	74



RESİMLER

	Sayfa
3.1. 5mg/ ml curcumin uygulanmasını takiben gelişen scalp nekrozu	16
3.2- 3.6 Cerrahi teknik	17
3.8. Su taşıma yöntemiyle greft volumlerinin ölçülmesi	22
3.9. Hassas teraziyle ağırlıklarının ölçülmesi	22
4.1- 4.2. Damarlanması az, yassı ve soluk izlenen greft	27
4.3. Damarlanması fazla, canlı sarı renkte elipsoid izlenen greft	9
4.4. Sham grubuna ait yağ dokularının H/E boyaması	32
4.5. Sham grubu perilipin boyaması	33
4.6- 4.21. Erken dönem grupların histolojik boyamaları	34- 49
4.22- 4.37. Erken dönem grupların immunohistokimyasal boyamaları	50- 65
4.38- 4.41. Geç dönem grupların histolojik boyamaları	66- 69
4.42- 4.45. Geç dönem grupların immunohistokimyasal boyamaları	70- 72

1. GİRİŞ

Yağ grefti uygulamaları günümüzde plastik rekonstruktif ve estetik cerrahi pratiğinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Kontur bozukluklarının giderilmesi, hasar görmüş cilt ve cilt altı doku kalitesinin iyileştirilmesi, estetik amaçlı dolgu (meme, kalça, diz içi, vb.), rekonstruktif amaçlı dolgu (çökük, kötü yara izleri) gibi birçok kullanım endikasyonu mevcuttur. Uygulama ucuz ve pratik olması, toksik olmaması, otolog doku nakli olması nedeniyle rejeksiyon reaksiyonuna neden olmaması, tekrarlanabilir olması gibi nedenlerle avantajlı iken, önceden tahmin edilemeyen rezorbsiyon oranları, yağ dokusu az olan hastalarda yeterli hacimde elde edilememesi gibi nedenlerle dezavantajlı olabilmektedir.

Rezorbsiyon oranlarının azaltılması (sağ kalımın artırılması) için literatürde yapılmış bir çok çalışma vardır. Bu çalışmaların bir kısmında yağ grefti elde edilmesi sırasında oluşan fiziksel etkenler üzerine yoğunlaşmış; santrifugasyon, kanul ve kanul ucu deliklerin çapları gibi değişkenler çalışılmış, bir kısmında ise kimyasal adjuvan maddeler (eritropoetin, PRP, polimerler, epidermal büyüme faktörleri gibi) ile yağ greftinin birlikte uygulanması ile yağ greft sağ kalımını artırmak amaçlanmıştır.¹⁻¹⁰

Yağ grefti uygulamalarından sonra görülen rezorbsiyon oranları farklı çalışmalarda %20- 90 arasında değişiklikler göstermektedir¹¹. Rezorbsiyonun altında yatan mekanizmalar için birçok teori ortaya atılmış olup günümüzde en çok kabul gören Peer'in hücre sağ kalım teorisidir¹². Bu teoriye göre yağ grefti uygulandıktan sonra sağ kalan adiposit sayısı ileriki dönemde greft sağ kalımını belirleyen ana faktördür. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmaya göre ise uygulanan yağ greftinin 300 nm'lik çeperinde sağ kalan adipositler ve adipositlere farklılaşabilen bağ doku içerisindeki adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin ve preadipositlerin ilerleyen dönemde greftin sağ kalımına etkisinin bulunduğunu ortaya koymuşlardır¹³. Genel olarak bakıldığında yağ greftinin sağ kalımını etkileyen baslıca faktörler; alıcı sahanın kanlanma miktarı, aktarılma sırasındaki canlı adiposit sayısı, greftin vasküler yatağa temas halinde olması ve dokuda oluşan inflamasyonun şiddetidir.

Yapılan histolojik çalışmalarda, yağ grefti uygulaması sonrası ilk 24- 48 saatte vasküler yatağa komşu olmayan adipositlerde apoptoz ve nekroz gelişimi, vasküler yatağa komşu adipositler etrafında kısmi revaskularizasyon, 3- 5. günlerde greft alanına uzanım gösteren neovaskularizasyon izlenmiştir^{13,14}. Bu bağlamda erken dönemde gelişen greft revaskularizasyonu sağ kalım için oldukça önem arz etmektedir.

Tüm bu çalışmalara rağmen yağ grefti uygulaması pratiğine rutin olarak girmiş ve genel kabul görmüş standart bir uygulama bulunmamaktadır.

Curcuma, bir bitki ailesi olan *Zingiberacea* içinde *curcuminoidlerin* biyolojik kaynağı olan bir türdür. *Curcuma longa* (Zerdeçal) ,sarı renkli tüberöz kökleri olan ve kökeni Hindistan ve Asya (Güney-Doğu bölgeleri) olan bir bitkidir. Kökten ekstrakte edilen sarı pigmentli fraksiyon ise *curcuminoidleri* içerir. Zerdeçal kökünden izole edilen üç ana *curcuminoid*; *curcumin*, *demethoxy curcumin*, *bisdemethoxy curcumindir*. *Curcumin* zerdeçal kökünde %3-5 oranında bulunmaktadır ve biyolojik aktiviteden sorumlu ana içeriktir¹⁵. Anti- inflamatuvar, anti- oksidan, anti-karsinojenik, anti- viral, anti- mikrobiyal, anjiyojenik ve anti- anjiogenik özelliklerinin yanında, hücre göçü, lenfositler, hücre döngüsü, platelet agregasyonu, apoptoz, yara iyileşmesi üzerine etkileri farklı çalışmalarla ortaya konmuştur¹⁶⁻²³.

Çalışmamızda curcuminin yağ greftlerinin sağ kalımına anti- inflamatuvar, anti-mikrobiyal ve anjiyojenik özellikleri nedeniyle katkı sağlayabileceği veya anti-anjiyojenik ve anti- adipojenik özellikleri nedeniyle yağ grefti sağ kalımını azaltabileceği düşünülmüş ve oral ve topikal kullanımlarda etkisinin araştırılması üzerine çalışma planlanmıştır. Sağ kalıma olumlu yönde oluşabilecek bir etki, tekrarlayan uygulama sayısında azalmaya neden olacak ve buna bağlı olarak cerrahi bir uygulamanın komplikasyon gelişme ihtimalini azaltacak ve de aynı zamanda maliyetinide düşürmüş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Dokusunun Yapısı, Fizyoloji ve Histolojisi

Adipositler (olgun yağ hücreleri) hacimlerinin %90'ına kadar trigliserit depolayabilen mezenşim kaynaklı hücrelerdir. Adipositler yaşamın ilk yıllarından fibroblastların preadipositlere dönüşmesiyle ve preadipositlerin ergenliğe kadar mitoz ile çoğalmasıyla oluşurlar. Ergenlik sonrasında hiperplazi durur, adiposit sayısı sabitlenir, şeker ve yağdan zengin diyetle beslenmeyi takip eden hücre hipertrofiyle yağ hücreleri hacmen büyümeye başlarlar. Yağ hücrelerinin çapları 20- 200 mikrometre arasında olup, hücre çapları 20 kat, hacim olarak ise 1000 kat büyüme gösterebilirler. Adipositler ile birlikte stromal vasküler fraksiyon hücreleri (fibroblastlar, kan hücreleri, preadipositler, endotel hücreleri, mezenşimal kök hücreler) gevşek, yumuşak, tüm vücutta çoğunluğu kas fasyaları ve dermis arasında yerleşimli, ısı regulasyonu, endokrin ve enerji metabolizması üzerine regülasyon etkileri olan yağ dokusunu oluştururlar^{24,25}

Histolojik olarak yağ dokusu hücreleri lipid içeriklerine göre unilokuler ve multilokuler olarak ayrılmaktadırlar. Unilokuler yağ dokusu lipid depolama üzerine özelleşmiş olup diğer adı beyaz yağ dokusudur, hormonal olarak inaktiftir ve asıl görevi lipid depolamaktır. Hücreler içeriklerindeki fazla miktarda trigliseritler nedeniyle hücre çekirdekleri ve organelleri kenara itilmiş olarak görülürler ve sitoplazmalarında geniş lipid vakuelleri izlenmektedir. Multilokuler yağ dokusu ise hormonal aktif yağ dokusudur ve sitoplazmalarındaki fazla sayıda mitokondri içerikleri nedeniyle makroskopik olarak kahverengi görülürler ve bu nedenle diğer isimleri kahverengi yağ dokusudur^{24,26,27}.

Yağ dokusu kandaki yağ asitlerini hücre içine alıp trigliserit olarak depolayabilir (lipogenez), hücre içindeki trigliseritleri yıkarak yağ asitleri (LDL) halinde dokularda kullanılmak üzere (başlıca karaciğer) kana salabilir (lipoliz). Enerji depolama özelliğinin yanı sıra yağda eriyen vitaminleri depolamak, fiziksel bariyer, ısı yalıtma ve regulasyonu, otokrin, parakrin (TNF- alfa, IL-6, TGF- beta, vb...) ve endokrin (leptin ve adiponektin) bir takım fonksiyonları mevcuttur^{19,26}

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yağ dokusu zengin bir kök hücre kaynağı olarak görülmektedir. Yağ dokudan elde edilen kök hücrelerin çeşitli parakrin etkilerinin olduğu izlenmiştir. İzole edilen kök hücreler ile yağ grefti birlikte uygulanarak sağ kalımı artırmaya yönelik çeşitli çalışmalar da literatürde mevcuttur²⁸⁻³⁰

2.2 Yağ Grefti

Greft;vücutta bulunan bir dokunun nörovasküler bağlantılarından ayrılarak başka bir bölgeye aktarılması işlemidir.Aktarıldığı alanda bulunan kan dolaşımı ile yaşayabilirliğini sürdürür. Greft olarak, deri, kıkırdak, kemik, damar, sinir, fasya, yağ, dermis, saç folikülleri ve kök hücreler kullanılabilir. Tek bir doku greft olarak kullanılabilceği gibi, kompozit(birden fazla dokuyu içeren) greftlerde uygulanabilir.

2.2.1 Yağ Greftinin Tarihçesi

İnsanlarda otolog yağ grefti uygulaması literatür bilgilerine göre ilk olarak 1889 yılında Van Der Meulen tarafınan rapor edilmiş olup omental ve karaciğer çevresindeki yağ dokusu diyafram ve karaciğer arasına nakledilmiştir. Bruning 1911 yılında yağ greftlerinin subkutan olarak ilk kez uygulamıştır ve bu uygulamayı yumuşak doku dolgusu olarak tanımlamıştır³¹. Takip eden yıllarda yağ greftleri ile ilgili çalışmalar artmaya başlamıştır. Peer, 1950 yılında yaptığı çalışmada naklettiği yağ greftlerinin birinci yıl sonunda %50 kalıcı olduğunu yayınlamış ve takiben “hücre sağ kalım teorisini” sunmuştur¹². Chajchir 1983 yılında liposuction ile elde ettiği yağ greftleri ile ilgili çalışmalarını yayınlamıştır^{32,33}. Doksanlı yılların başında ise yağ aspirasyonu sırasındaki mekanik travmanın sağ kalıma etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Avrupada 1970’li yıllarda künt uçlu kanüller ve negatif basınç kullanılarak yağ aspirasyonu uygulanmaya başlanmıştır. Fournier mikrokanulleri yağ aspire ve enjekte etmekte kullanarak yöntemi popularize etmiştir³⁴. Klein ise 1987 de tümesan tekniğini tanımlamış ve geniş volumde yağ almanın bu teknikle daha güvenli olduğunu, daha az kanama ve post op ağrı kontrolünde etkinliğini göstermiştir^{35,36}.

Coleman 90'lı yıllarda aspire edilen yağın santrifuj ile ayrıştırılmasını ve santrifugatta bulunan yağın alınarak ufak kanuller yardımıyla farklı doku planlarına çoklu enjeksiyonlar ile verilmesinin önemini vurgulayarak tekniğe “coleman tekniği” ismini vermiş ve 1994 yılında yayınlamıştır^{37,38}.

Tüm bu gelişmeler ile yağ grefti uygulamaları plastik ve rekonstruktif cerrahi pratiğinde kendine yer bulmuş ve sıkça uygulanmaya başlamıştır.

2.2.2. Yağ Greftlerinin Klinik Kullanımı

Yaklaşık otuz beş yıl kadar önce yağ aspirasyon kanullerinin kullanımıyla cilt altındaki yağ dokusunu aspire etme yoluyla yağ elde etme yöntemi tanımlanmış ve zamanla giderek yaygınlaşarak prensiplerinin ve limitlerinin de tanımlanmasıyla *liposuction* güvenli bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Bu sayede alınan yağlarında greft olarak çeşitli alanlarda kullanılması söz konusu olmuştur. İlk zamanlarda plastik cerrahlarca yapılan doku augmentasyonları en sık kullanım alanı olmakla birlikte verildiği alanda reaksiyon oluşturmaması, verildiği alan üzerindeki ciltte oluşturduğu olumlu değişikliklerin gözlemlenmesi yağ grefti uygulamaları üzerine çalışmalar yapılmasına neden olmuştur³⁹. Verildiği doku üzerindeki yalnızca ciltteki yaşlanma belirtilerini- kırışıklıkları azaltmakla kalmamış; ciltte bulunan skarların görünümünde iyileşmeye, radyasyon hasarının neden olduğu bozuk cilt yapısında düzelmeye, memede kapsul kontraktürünün düzelmesine ve vokal kord hasarının azaltılmasına neden olduğu ortaya konmuştur^{38,39}. Bu etkilerin mekanizmalarının tanımlanması için yapılan çalışmalarda aktarılan yağ greftlerinde adipositler dışında adipoz doku kaynaklı stromal hücrelerin, adipoz doku vasküler fraksiyon hücrelerinin ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin bulunduğu saptanmıştır⁴⁰⁻⁴³. Adipoz doku kaynaklı kök ve stromal- vasküler fraksiyon hücrelerinin fonksiyonları üzerine yürütülen çalışmalarda salgıladıkları çeşitli büyüme faktörleri ve farklılaşmayı uyuracak parakrin etkili hormonlar ile yara iyileşmesini hızlandırdıkları ve aktarıldıkları dokuda onarım açısından potent hücreleri (fibroblastlar, damar endoteli vb..) uyurarak çoğalmalarına neden oldukları ortaya konulmuştur⁴⁰. Yağ greftlerinden izole edilen kök hücreler bir çok farklı dokuda iyileşmenin hızlandırılması amaçlı farklı cerrahi branşlarca kullanılmıştır.^{29,30,41,42}Zamanla yağ

grefti ve greft içerisindeki komponentler, yağ grefti ile birlikte veya ayrı şekilde bir çok cerrahi branşta da kullanılmaya başlanmıştır³⁹.

2.2.3 Yağ Greftinde Sağ Kalım Sorunu

Yağ grefti elde edilirken yaratılan mekanik travmaya bağlı ve verildiği alıcı yatakta gelişen iskemik ve inflamatuvar değişikliklere bağlı greft yaşayabilirliği olumsuz etkilenmektedir. Canlı hücre sayısının artırılması için negatif basıncın standardizasyonu, alınan yağ greftinin santrifuj edilerek enjekte edilecek materyalin içinde yalnızca adipositler olması amaçlanarak çalışmalar yapılmıştır⁴⁴.

İlk günün sonunda yağ greftinde bulunan ve alıcı alanda vasküler yatakla temas etmeyen adipositlerde apoptoz ve nekroz gelişmekte, alanda oluşturulan travmaya lokal olarak inflamatuvar bir yanıt olmakta (akut inflamasyon), bölgeye göç eden notrofiller, makrofajlarla ve az miktarda lenfositler ile birlikte ölü adipositler fagosite edilmekte ve hücresel debris temizlenmektedir. Inflamatuvar hücre göçünü takip eden sitokin salınımıyla inflamasyon giderek artmakta, bu durum lokal ödem ve intersistiyel sıvı artışına neden olmakta bunun sonucu olarakta yağ grefti uygulanan alanda genel bir iskemiye neden olmaktadır⁴⁵. Takip eden dönemde parçalanmış adipositlerden açığa çıkan yağ damlacıkları hücrelerce (notrofil) çevrelenerek yağ vakuollerini, yağ kistlerini oluştururlar. Yine zamanla oluşan fibrozis bir miktar kaybolan hacmin yerini almakta fakat kronik süreçte ilk verilen hacme göre mutlaka azalma izlenmektedir¹³. Bazı çalışmalarda ise yağ greftlerinin revaskularize olmasına rağmen hacim kayıplarının devam ettiği gösterilmiş, buna sebep olarak ise parakrin etkiye bağlı adiposit apoptozu gösterilmiştir⁴⁶.

Yapılan bir çok çalışma yağ greftlerinin elde edilirken uğradığı mekanik travmayı ve tumesans tekniğinin geliştirilmesiyle cerrahi sırasındaki kanamayı azaltmak, verilmeden önce santrifuj edilerek aspirattaki adipositleri saflaştırmak gibi konularda yoğunlaşmış ve greft sağ kalımı üzerine olumlu yansımaları neden olmuştur^{34,35,37,38,44}.

Yine alıcı yatakta kanlanmayı, inflamasyonu ve lokal ve sistemik inflamatuvar sitokinlerin salınımını modifiye etme amaçlı bir çok molekül (Insulin, matriks metalloproteinaz 2 inhibitörleri, E vitamini, polimer tedavileri, fibroblast büyüme faktörü, trombosit zengin plazma, eritropoetin, epidermal büyüme faktörü, vb..) yağ grefti uygulamalarında adjuvan olarak kullanılmıştır. Kullanılan bazı moleküller ile ilgili olumlu sonuçlar bildirilmiş ise de kullanılan moleküllerin prosedüre getirdiği ek maliyet ve sağ kalımda belirgin artış olmaması nedeniyle kullanımları yaygınlaşmamıştır. Çoğu fare ve sıçanlarda yapılan bu çalışmalarda kronik dönemde greft sağ kalımının değerlendirilmesi için 3 ay civarında bir süre beklenmiş olup bizde çalışmamızda 98. günü (3.5 ay) çalışmanın sonlandırılacağı gün olarak belirledik.^{1,3,4,6,7,47,48}

2.2.4 Yağ Grefti Uygulamalarının Komplikasyonları

Yağ grefti uygulamaları, kullanım amacına göre, alternatifi olan diğer uygulamalara göre daha güvenli olarak düşünülebilir. Yağ greftinin otolog doku nakli uygulama yöntemi olması bunun başlıca nedenidir^{38,39}. Yüzde yumuşak doku augmentasyonu veya skar revizyonu, vucudda kontur düzeltmek veya yine skar kalitesini artırmak, estetik meme büyütme amaçlı gibi birçok kullanım alanı mevcuttur^{38,49}. Bu uygulamalarda oldukça düşük oranlarda ve az çeşitlilikte komplikasyonlar belirtilmiştir. Mastektomi sonrası meme rekonstruksiyonu için uygulanabilecek bazı fleplere alternatif olarak kullanımları yaygınlaşmaktadır. Mastektomi sonrası meme rekonstruksiyonlarında uygulanan yağ greftlerinde komplikasyon gelişme ihtimali, hem yüksek hacimlerde greft uygulaması yapılması hem de greft uygulaması yapılan dokunun daha önce cerrahi geçirmiş bir doku olması nedeniyle sağlıklı dokuya uygulanmasına göre daha yüksektir. Yayınlanan bir derlemede 33 ayrı makaleden toplam 5502 hastada 461 komplikasyon görüldüğü ve toplam rapor edilen komplikasyon oranı %8.4 olarak bildirilmiştir. Komplikasyonlar arasında; palpe edilebilen yeni nodul gelişimi vakaların % 11.5'inde, kist formasyonu % 6.9'unda, hematoma % 6.3'ünde, yağ nekrozu % 4'ünde izlenmiş olup sık karşılaşılan komplikasyonlar olarak bildirilmiştir. Bunlar dışında; kalsifikasyon gelişimi % 5.2, memede stria gelişimi % 4.4, granülom

formasyonu % 3.6, enfeksiyon veya uygulanan alanda gelişen selülit % 0.8, seroma % 0.8, donor alanda gelişen enfeksiyon % 0.7, abse % 0.6, pneumotoraks % 0.2 ve gecikmiş yara iyileşmesi % 0.2 olarak bildirilmiştir. Pnomotoraks komplikasyonu yağ greftinin kendi yarattığı bir komplikasyon olmayıp enjeksiyon için kullanılan kanullerin plevrayı delmesi ve yağın intra- plevral boşluğa verilmesi sonucu oluşmuş olup tanımlanan diğer yağ greftinin kendisine bağlı komplikasyonlar (enfeksiyon, selülit, abse, kist formasyonu, yağ nekrozu) basit drenaj, antibiyoterapi ve soğuk uygulaması gibi basit müdahalelerle tedavi edilebilmiştir⁵⁰. Tablo 2.1’de komplikasyonlar sıklıklarına göre sıralanmıştır.



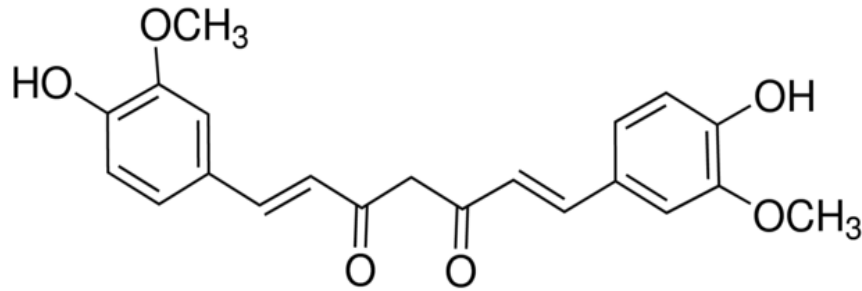
Tablo 2.1. Yağ grefti uygulamasında görülebilen komplikasyonlar

KOMPLİKASYONLAR	SIKLIK
(5502 vaka, 461 komplikasyon)	% 8.4
Palpe edilebilen yeni nodul gelişimi	% 11.5
Kist formasyonu	% 6.9
Hematom	% 6.3
Yağ nekrozu	% 4
Kalsifikasyon gelişimi	% 5.2
Memede stria gelişimi	% 4.4
Granulom formasyonu	% 3.6
Enfeksiyon veya selülit	% 0.8
Seroma	% 0.8
Donor alan enfeksiyonu	% 0.7
Abse	% 0.6

2.3. CURCUMIN

2.3.1 Genel Bilgiler

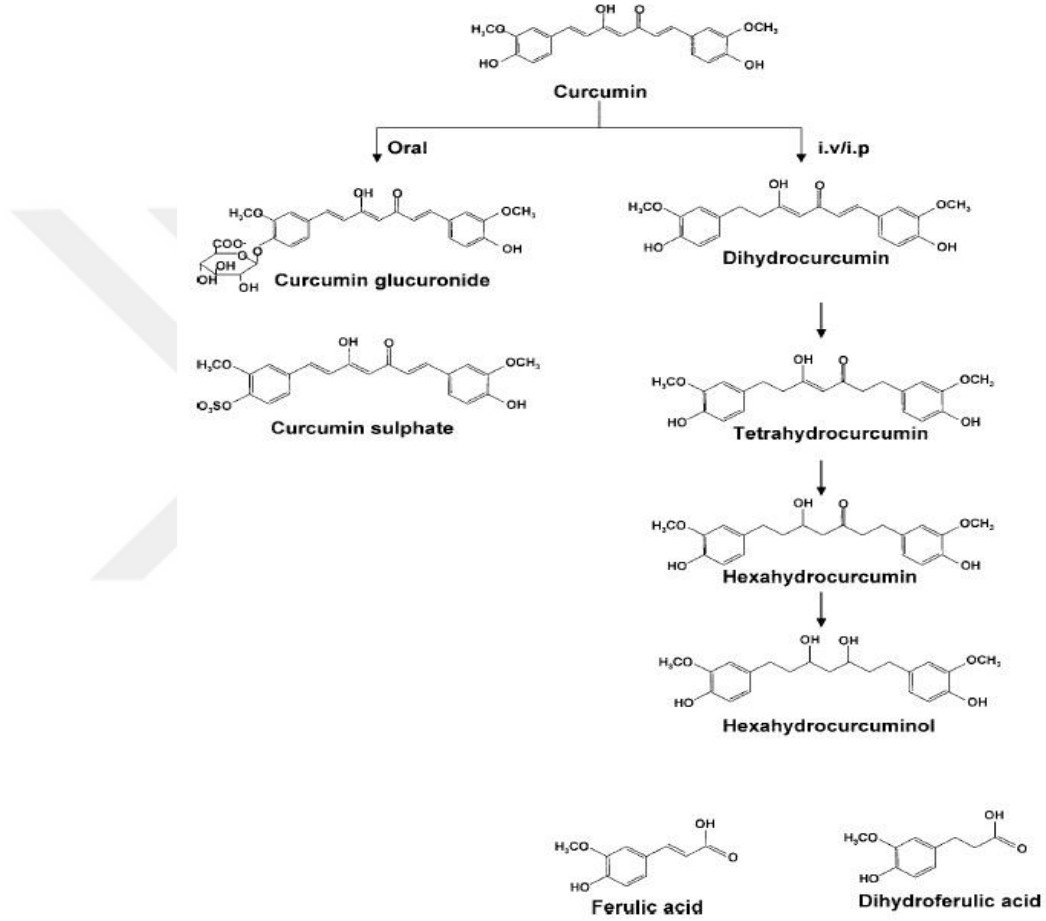
Curcumin, *Curcuma Longa*(zerdeçal) bitkisinin kökünden elde edilen, geniş yelpazede biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip sarı renkli hidrofobik polifenol bir bileşiktir (Şekil 1) Kimyasal yapısı *bis- α , β - unsature β - diketone* (*diferuloymethane*)olan, keto- ve enol- tautomerizm sergileyen, asidik ve notral solusyonlarda predominant keto formda bulunan, alkali solusyonlarda enol formunda bulunan bir polifenoldür. Ticari müstahzarlar yaklaşık % 77 curcumin, % 17 demetoxycurcumin, % 7 bismdetoxycurcumin içeririler. Zerdeçal kökü doğu tıbbında (başlıca hindistan) özellikle antiinflamatuvar etkileri nedeniyle geleneksel tedavide (topikal; merhem, pomad, krem) kullanılmış olup içeriğindeki curcuminin etkilerden sorumlu aktif molekül olduğu ortaya çıkarılmıştır⁵¹.Çeşitli hayvan ve insan çalışmaları çok yüksek dozlarda (insanda 12g/gün) oral kullanıldığında bile bir yan etki oluşturmadığını ve oldukça güvenli olduğunu göstermiştir^{52,53}. Bu özelliklerinin yanında oral kullanımında biyoyararlanımının çok düşük olması nedeniyle rutin tedavi protokollerinde henüz kabul görmemiştir.



Şekil 2.1. Curcumin formülasyonu

Biyoyararlanım için yapılan hayvan çalışmaları çok sayıda olup ratlarda yapılan uygulamalarda oral gavaj ile verilen 340mg/kg, 500mg/ kg, 1g/kg, 2g/kg dozlarında ilk 30dk- 1 saat arasındaserum ve plazma konsantrasyonları 6.5 ± 4.5 nM, 0.06 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ ml}$, 1.35 ± 0.23 $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçülmüş ve post- gavaj birinci saatten sonra plazmada ölçülemeyen düzeylere gerilemiştir⁵⁴⁻⁵⁷. Düşük intrinsik

aktivite, barsaklardan zayıf absorpsiyonu, yüksek hızda metabolize olması (sulfatasyon ve glukronidasyon), inaktif metabolik bileşiklerinin olması, vucuddan temizlenmesinin hızlı olması ve hücre membranlarından pasif difüzyon ile geçebilmesi bu denli kısa süreli ve düşük serum ve plazma piklerinin olmasının başlıca nedenleridir⁵¹. Curcuminin oral ve i.v. yoldan verilmesini takiben metabolizması şekil 2 de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Curcuminin oral ve i.v. / i.p. uygulanmasını takiben metabolizması

Biyoyararlanımı artırmak üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Glukronidasyon ve sulfatasyon inhibisyonu amacıyla ratlarda yapılan bir çalışmada piperine adjuvan olarak kullanılmış ve curcuminin pik plazma düzeyini 2-4 kat artırmış ve eliminasyon yarı- ömrünü uzatmış, toplamda biyoyararlanımda %154 artış sağlamıştır⁵⁴. Nanosuspansiyon ve mikrosuspansiyon şeklinde hazırlanan

formulasyonlarında küçültülen curcuminin absorpsiyonunun daha fazla olacağı düşünülmüş fakat yapılan rat çalışmalarında modifiye edilmemiş suspansiyona göre anlamlı biyoyararlanım farkı izlenmemiştir. Yine aynı çalışmada fosfolipid kompleks içinde curcumin ve amorfoz solid dispersyonlar ile serum maksimum konsantrasyonlarında anlamlı artış gözlenmiştir⁵⁸. Farklı çalışmalarda fosfolipid kompleksler ve lipozomal curcumin formulasyonları ile biyoyararlanımda artış gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmalarda kullanılan komplekslerin ticari müstahzarları bulunmamaktadır^{59,60}.

2.3.2 Tıbbi Kullanım Alanları ve Rasyonelleri

Curcuminin anti- oksidan, anti- inflamatuvar^{61,62}, anti- mikrobiyal ve anti-karsinojenik⁶³⁻⁶⁶ aktivitelerine ek olarak karaciğer ve böbrek üzerine koruyucu etkileri^{67,68}, tromboz baskılayıcı ve myokardiyal infarktüs koruyucu etkileri^{69,70} ve hipoglisemik⁷¹ özellikleri ortaya konmuştur.

Curcumin geniş yelpazede moleküler aktiviteler göstermektedir. Anti inflamatuvar etki mekanizmaları detaylı olarak araştırılmıştır. Pro- inflamatuvar sitokinlerin (TNF- alfa, IL- 1, IL- 12, IFN- gamma) salınımını nükleer faktör K β (NF- KB) gen inhibisyonu ile azaltarak ve lökosit adezyon molekülleri ve antijen prezente eden hücrelerin membran proteinlerinin sentezini (ICAM- 1, VCAM- 1, E- selektin) NF- KB ile B- lenfosit Kappa hafif zincir polipeptid gen indukleyicisinin nükleer faktör inhibitörü (IKK) ile bağlanmasını engelleme yoluyla azaltarak gerçekleştirir. Aynı zamanda araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz- 2 (COX-2), lipoksijenaz (LOX) ve fosfolipaz A2, C ve D enzimlerini inhibe ederek inflamatuvar mediatorler olan TXA₂, PGE₂, LTB₄, LTC₄ ve araşidonik asit prekürsörlerinin oluşumunu azaltır (Δ 5 desaturaz enzim inhibisyonu ile). Böylece antiinflamatuvar etkinliğe katkı sağlar. Ek olarak proteolitik enzimlerin (kollajenaz, elastaz, matrix metalloproteinaz) aktivitelerini de inhibe ederek inflamatuvar mekanizmaları neredeyse tüm basamaklarında inhibe eder. Anti- karsinojenik etkinliği primer olarak kanser hücrelerini in vivo ve in vitro ortamlarda apoptoza yönlendirmek suretiyle gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.

Kanser hücrelerinde gösterdiği bu apoptotik özelliğin tam tersi olarak ökaryotik bir çok hücrede anti-apoptotik özellikler (kaspazları ve janus kinazları inhibe ederek) göstermektedir. Yara iyileşmesi sürecini, deri hücrelerinde ve granülasyon dokusundaki yapılan çalışmalarda, superoksit anyon üretimini ve lizozomal enzim salınımını azaltarak, TGF- β 1 ve ekstrasellüler matrix sentezini artırarak hızlandırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda anti- mikrobial, anti- oksidan (Superoksit dismutaz, katalaz, Glutasyon reduktaz aktivitelerinde artış, nitrik oksit sentaz aktivitesini baskılayarak) etkinlikleride yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur¹⁵. Tümoral dokularda anjiogenezi inhibe ettiğini gösteren çalışmalar olmasına karşın diabette ateroskleroza önlediği ve anjiogenik özellikleri yapılan bazı çalışmalarda tanımlanmıştır^{15,16,53,65}.

2.3.3 Curcuminin yağ dokusu üzerine etkileri

Curcumin'in yağ dokusu üzerine etkileri geniş çapta sağlıklı deneklerde ve hastalık modellerinde (sıklıkla diabetik ratlar) çalışılmıştır. Streptozosin ile diabetik hale getirilen sıçanlarda yapılan çalışmalarda, adipoz dokuda ki inflamasyonu, serbest oksijen radikallerini ve oksidatif stressi azaltarak yatıştırdığı gösterilmiştir¹⁹. Fare 3T3-L1 hücre gruplarına ve beyaz yağ dokusu hücre kültürlerine curcumin eklenerek yapılan çalışmalarda, curcuminin peroksizom proliferator- aktive edici reseptor gamma ko-aktivator 1-alpha, *uncoupling* gen- 1 ve peroksizom proliferator- aktive edici reseptor proteinlerini artırdığı saptanmıştır. Bahsi geçen bu proteinler esas olarak kahverengi yağ hücrelerinde eksprese edilen proteinler olup curcuminin; hormonal olarak inaktif beyaz inguinal yağ dokusu hücrelerini in- vitro ortamda kahverengi veya bej- hormonal aktif yağ hücrelerine çevirdiği saptanmış ve obeziteyle mücadele konusunda diyetle curcumin eklenmesinin faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır⁷². Yapılan başka bir çalışmada ise farelere 50 gün süreyle günlük 50 ve 100 mg/ kg/ gün oral curcumin verilmesinin farelerin inguinal yağ yastıkçıklarında bulunan beyaz yağ dokusunu noradrenalin bağımlı olarak bej yağ dokusuna çevirdiği saptanmış ve diyetle eklenecek curcuminin obeziteyi önlemekte katkı sağlayabileceği sonucuna varılmıştır⁷³. Diğer bir çalışmada 10 gün boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenen farelere beslenme sonrası curcumin 50 mg/ kg

dozunda 8 saatlik açlığı takiben intragastrik gavaj ile verilmiş, denekler 10. günün sonunda sakrifiye edildikten sonra epididim yağ dokuları alınmış ve palmitattan zengin bir ortamda farklı konsantrasyonlarda curcumin eklenerek yapılan değerlendirmeler curcuminin cAMP/ Protein kinaz A yolağı üzerinden endoplasmik retikulum stressini azaltarak lipolizi azalttığını saptamıştır⁷⁴.

Farklı biyokimyasal yolların farklı yöntemler ile incelenmesi, curcuminin hem lipolizi uyardığını hem inhibe ettiğini göstermekte olsa da tüm çalışmalar curcuminin adipoz doku üzerindeki stressi azaltmaya ve dokuyu korumaya yönelik etkileri olduğu ortak paydasında birleşmektedir^{16,23,74}.

Obezitenin önlenmesi için yapılan çalışmalarda curcuminin;pre- adipositlerin adipositlere farklılaşmalarını; hücre döngüsünü mitotik klonal ekspansiyon aşamasında inhibe ederek, p27'nin post- transkripsiyonel yıkımının engellenmesini sağlayarak ve adiposit spesifik PPAR- γ m- RNA'sının transkripsiyonunun inhibisyonu ile engellediğini ortaya koymuştur^{22,75,76}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Etik Kurulu'nun çalışmamızla ilgili 27.11.2014 tarihli ve 413-1 no'lu kararının alınmasını takiben başlandı. Toplam 84 adet *Wistar Albino* (dişi) sıçan çalışmada kullanıldı. Sıçanlar ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlandı ve standart bakım koşullarında sınırsız yem ve suya erişimleri sağlanarak 6 aylık büyüme sonrası 250-330 gr ağırlığa geldiklerinde deneyler için kullanıldılar. Çalışmanın deney hayvanları ile ilgili cerrahi uygulamaları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1 Deney Grupları ve Kullanılan Ajanlar

Sham grubu: 4 adet sıçanın bilateral inguinal yağ pakeleri çıkarılarak volum ve ağırlık ölçümleri yapıldı ve perilipin ve hemotoksilen eosin boyamaları için histoloji ve embriyoloji laboratuvarına gönderildi. Denekler sakrifiye edildi.

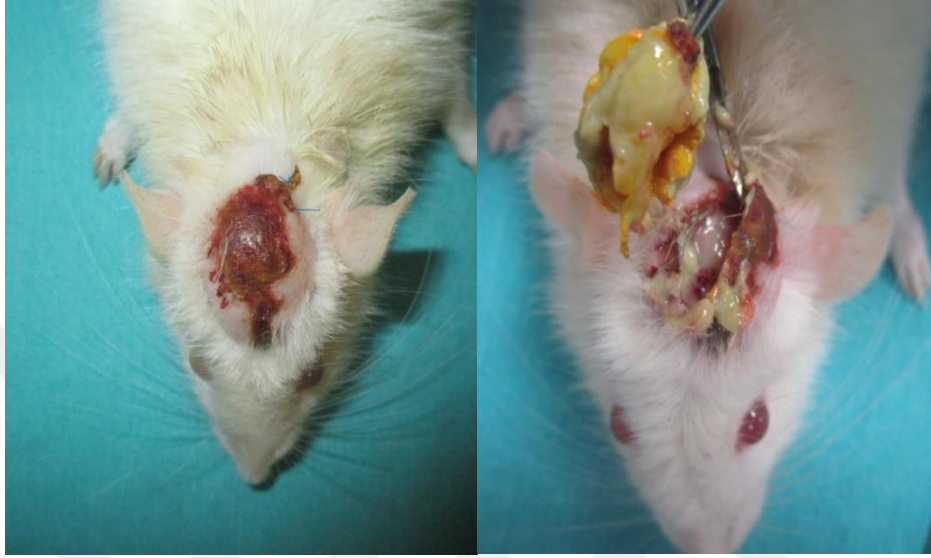
Kontrol (C), Oral Curcumin (OC), Topikal Curcumin (TC), Oral + Topikal Curcumin (OTC) gruplarında her birinde toplam 20 adet sıçan kullanıldı. Her grupta ikişer adet sıçan 1. , 4. , 7. , 14. günlerde sakrifiye edilerek erken dönem biyopsilerinin incelenmesi için, geriye kalanlar ise 98. günde geç dönem biyopsilerinin incelenmesi için kullanıldı. Gruplara yapılan cerrahi işlemler random ve mikst şekilde yapılarak standardizasyon sağlanmaya çalışıldı.

Kullanılan ajanlar

- 1- **Curcumin** [(Curcuma longa (Turmeric) (Sigma / katalog no: C1386), Almanya]
- 2- **Ksilazin** (XYLAZIN - Ksilazin Hidroklorit 20 mg, Kepro, Hollanda)
- 3- **Ketamin** (Ketalar, Phizer, İstanbul)

In- vivo uygulanacak dozu belirlemek amacıyla pilot çalışmalarımızda inguinal alandan çıkarılan yağ greftleri üzerine hacimlerine oranlanacak şekilde 5 mg/ cc, 3 mg/ cc ve **1 mg/ cc** dozlarında toz halinde curcumin uygulanmış olup 3mg/ cc ve

5mg/ cc uygulamalarından sonra yağ greftinin scalp altına yerleştirilmesini takip eden 10 gün içinde scalp cildinde nekrozlar, yabancı cisim reaksiyonuna bağlı yoğun inflamasyon ve abse formasyonları sık izlendi (Resim 1). **1 mg/ cc** dozunda böyle bir etki gözlemlenmedi. Topikal, **1cc yağ grefti üzerine 1 mg curcumin uygulanmasına** bu şekilde karar verildi.



Resim 3.1. 5mg/ ml curcumin uygulanmasını takiben p. o. 8. günde oturan scalp nekrozu ve greftte gelişen purulan enfeksiyon.

3.2 Deney akış planı ve uygulanan cerrahi işlemler

Erken ve Geç Dönem Sağ Kalım Çalışması İçin Gruplar

Kontrol (C), Oral Curcumin (OC), Topikal Curcumin (TC), Oral + Topikal Curcumin (OTC) olarak **4 grup** halinde **her grupta 20 adet sıçan** ile çalışma planlandı.

Kontrol Grubu: 20 adet sıçanın sol inguinal ve scalp bölgesi pre-op klorheksidin ve SF ile yıkanarak tüy temizliğini takiben inguinal yağ pakeleri çıkarıldı. Donor alan cildi 5/0 prolene ile kapatıldı. Greftlerin ağırlık ve volumleri ölçüldü ve scalpte oluşturulan subfasiyal cebe yerleştirildi. Cilt 5/0 prolene ile kapatıldı. 1. , 4. , 7. , 14. ve 98. günde sıçanların scalpe yerleştirilen greftleri çıkarıldı, volum ve ağırlık ölçümleri yapılarak perilipin ve hemotoksilen-eozin boyamalarının

yapılması için %10'luk notral tampon solusyon (%10 formol) içerisinde histoloji ve embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Oral Curcumin Grubu: 20 adet sıçana **7 gün boyunca, 4 gün pre-op 3 gün post- op süreçte oro-gastrik gavaj ile 200 mg/ kg oral curcumin çeşme suyu içerisinde hazırlanan 2 cc suspansiyon** halinde verildi. 4. gün gavaj yapıldıktan sonra sol inguinal ve scalp bölgesi pre-op klorheksidin ve SF ile yıkanarak tüy temizliğini takiben inguinal yağ pakeleri çıkarıldı. Ağırlık ve volumleri ölçüldü ve scalpte oluşturulan subfasiyal cebe yerleştirildi.Cilt 5/0 prolene ile kapatıldı.1. , 4. , 7. , 14. ve 98. gündesiçanların scalpe yerleştirilen greftleri çıkarıldı, volum ve ağırlık ölçümleri yapılarak perilipin ve hemotoksilen-eozin boyamalarının yapılması için %10'luk notral tampon solusyon (%10 formol) içerisinde histoloji ve embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Topikal Curcumin Grubu: 20adet sıçanın sol inguinal ve scalp bölgesi pre-op klorheksidin ve SF ile yıkanarak tüy temizliğini takiben inguinal yağ pakeleri çıkarıldı. Ağırlık ve volumleri ölçüldü.Greftlerin çeperine**1mg/ml curcumin topikal uygulandı** ve scalpte oluşturulan subfasiyal cebe yerleştirildi.Cilt 5/0 prolene ile kapatıldı.1. , 4. , 7. , 14. ve 98. gündesiçanların scalpe yerleştirilen greftleri çıkarıldı, volum ve ağırlık ölçümleri yapılarak perilipin ve hemotoksilen-eozin boyamalarının yapılması için %10'luk notral tampon solusyon (%10 formol) içerisinde histoloji ve embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Oral + Topikal Curcumin Grubu: 20 adet sıçana **7 gün boyunca, 4 gün pre-op 3 gün post- op süreçte oro- gastrik gavaj ile 200 mg/kg oral curcumin çeşme suyu içerisinde hazırlanan 2 cc suspansiyon** halinde verildi. 4. gün gavaj yapıldıktan sonra sol inguinal ve scalp bölgesi pre-op klorheksidinle ve SF ile yıkanarak tüy temizliğini takiben inguinal yağ pakeleri çıkarıldı. Ağırlık ve volumleri ölçüldü.Greftlerin çeperine**1mg/ml curcumin topikal uygulandı** ve scalpte oluşturulan subfasiyal cebe yerleştirildi.Cilt 5/0 prolene ile kapatıldı.1. , 4. , 7. , 14. ve 98. gündesiçanların scalpe yerleştirilen greftleri çıkarıldı, volum ve ağırlık ölçümleri yapılarak perilipin ve hemotoksilen-eozin boyamalarının yapılması için %10'luk notral tampon solusyon (%10 formol) içerisinde histoloji ve embriyoloji laboratuvarına gönderildi.

Cerrahi teknik sırasıyla resim 3.2- 3.6’da gösterilmiştir.

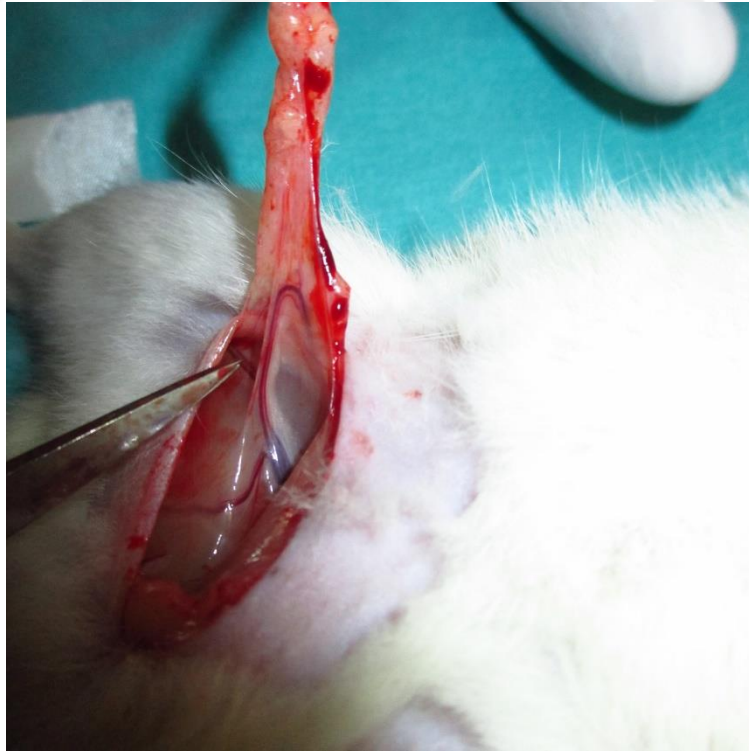
Tablo 3.1’de gruplardaki sıçan sayıları ve biyopsilerin alındığı günler gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Gruplar, hayvan sayıları (n) ve biyopsilerin alındığı günler

Günler Gruplar	1. gün	4. gün	7. gün	14. gün	98. gün
Kontrol (C) n: 17	n: 2	n: 2	n: 2	n: 2	n: 9
Oral Curcumin (OC) n: 18	n: 2	n: 2	n: 2	n: 2	n: 10
Topikal Curcumin (TC) n: 15	n: 2	n: 2	n: 2	n: 2	n: 7
Oral + Topikal Curcumin (OTC) n: 16	n: 2	n: 2	n: 2	n: 2	n: 8
Toplam n: 66	n: 8	n: 8	n: 8	n: 8	n: 34



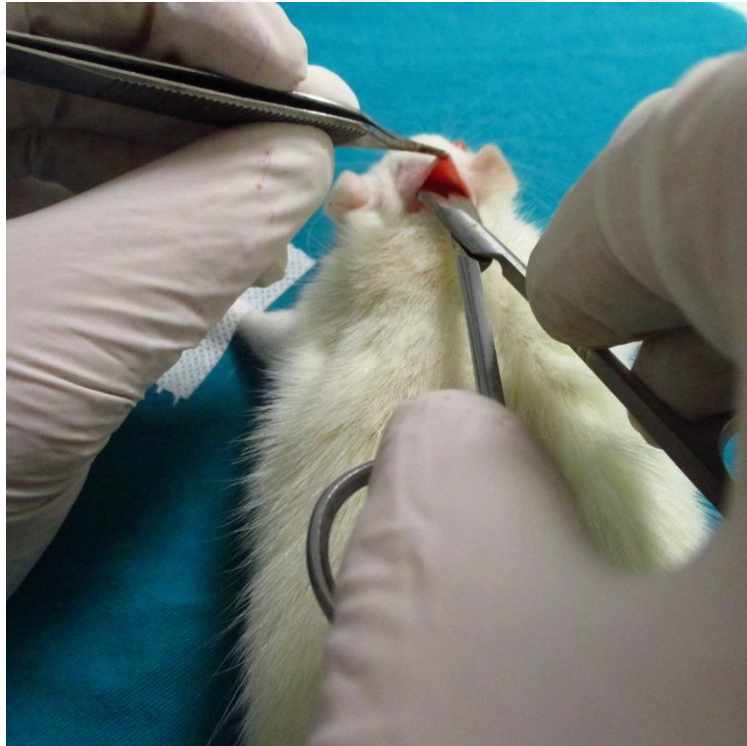
Resim 3.2. Inguinal alanın hazırlanmasını takiben inguinal ligamente paralel insizyon



Resim 3.3. Inguinal yağ yastığı diseksiyonu ve eksizyon



Resim 3.4. Scalp cildinin hazırlanması



Resim 3.5. Scalpte subfasiyal cebin hazırlanışı



Resim 3.6. Hazırlanan subfasial cebin görünümü



Resim 3.7. Yağ grefti cebe yerleştirildikten sonra insizyonun suturasyonu

Volum ölçümleri 5 cc'lik enjektörde (Beybi® 5cc' lik enjektör, İstanbul, Türkiye) su taşıma yöntemiyle, ağırlık ölçümü 1 mg / 220 gr ölçen aralıkta Radwag AS 220 analitik terazi (Akyol Fabrika Malzemeleri, İstanbul, Türkiye) ile yapıldı (Resim 3.8 – 3.9).



Resim 3.8 Su taşıma yöntemiyle greft volumlerinin ölçülmesi



Resim 3.9 Hassas teraziyle ağırlıklarının ölçülmesi

3.3 Histolojik ve İmmunohistokimyasal Boyamalar

Yağ pakelerine ait tüm doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak % 10' luk neutral buffer formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 24 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (% 70, % 80, % 90, % 100) geçirildiler. Sonrasında dokular şeffaflaştırılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından erimiş parafine gömüldüler.

Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4 mikron kalınlığındaki kesitlere tüm gruplar için Hematoksilen-Eozin boyama ve İmmunohistokimyasal boyama; Perilipin yöntemleri uygulandı.

Tüm sakrifiye edilen gruplar için Hematoksilen-Eozin boyama ve İmmunohistokimyasal Boyama-Perilipin uygulandı.

Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan değerlendirmeler sonucunda dejenerasyon kriterleri tablosu oluşturuldu.

Boya Solüsyonlarının Hazırlanışı :

1- Harris Hematoksilen Solüsyonu

Hematoksilen 1gr

Alkol 50 ml

Potasyum alum (alüminyum potasyum sülfat) 50 gr

Distile su 900 ml

Civa oksit 2.5 gr

2- Eozin Solüsyonu

Eozin 1 gr

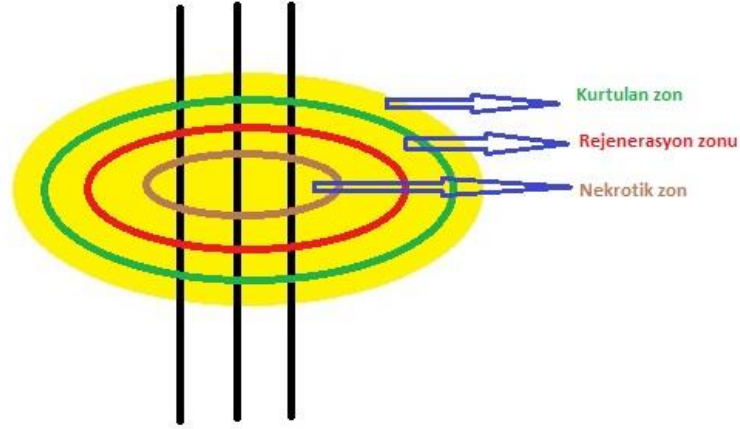
Distile su 100 ml

Alkol:200 ml

Boyama Yöntemi :

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) .1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen'de 2 dakika boyandı ve 2x2 dakika akar suda yıkandılar.%1 Amonyak-Su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı.Lamlar 3 dakika Eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

Dokuda tüm alan büyüklüğünün objektif değerlendirilmesinin yapılabilmesi adına, tüm alanda, her grup ve her hayvan için 3 ayrı bölge kesitsel olarak belirlendi (şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tek parça çıkarılan yağ greftlerinin santral meridyenlerinden alınan kesit alanları.

İmmunhistokimyasal Boyama (Perilipin) Yöntemi:

Tüm deney gruplarına ait yağ dokusu bloklarından lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 2x10 dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip dehidrate (%100, %96, %80, %70, %50) edildi. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Antigen maskesini kaldırmak için 1/10 Dilue Citrat Buffer (AP-9003-999 Thermo Scientific) mikrodalga ile uygulandı. Distile su ile yıkama aşamasından sonra 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika Protein bloke (TA-125-PBQ ThermoScientific) edildi. 60 dakika nemli ortamda Primary Antibody inkübe edildi; Perilipin (sc-67164 Santa Cruz Biotechnology)

Amplifier Quanto (TL-125-QPB ThermoScientific) 20 dakika bekletildi. HRP Polymer Quanto (TL-125-QPH ThermoScientific) 30 dakika bekletildi. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı. Perilipin pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB

ile boyama yapıldı.Zemin boyaması için 1 dakika süreyle Hematoksilen uygulandı.Boyanan camlar artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra 5 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletildiler.Ardından entellan ile kapatıldı.

Tüm biopsiler Olympus BX 51 marka ışık mikroskobuna entegre Olympus DP 70 kamera ile değerlendirildi ve fotoğraf çekimleri yapıldı.

3.4 İstatistiksel Yöntemler

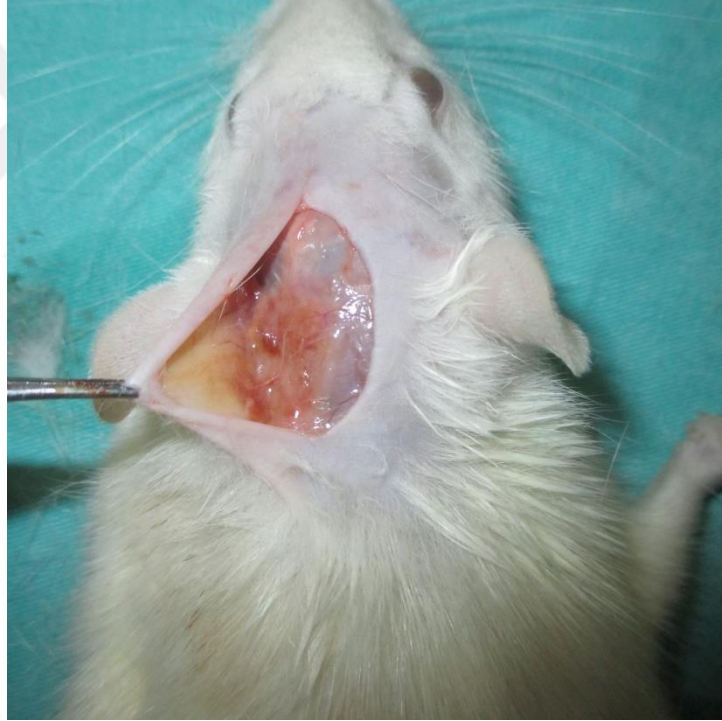
Sürekli veriler Ortalama \pm Standart Sapma olarak verilmiştir.Verilerin normal dağılıma uygunluğunun araştırılmasında Shapiro Wilk testinden yararlanılmıştır.Normal dağılım gösteren grupların karşılaştırılmasında, grup sayısı üç ve üzerinde olan durumlar için Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır.Analizlerin uygulanmasında IBM SPSS Statistics 21.0 programından yararlanılmıştır. İstatistiksel önemlilik için $p < 0.05$ değeri kriter kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopi

Geç dönem sağ kalım çalışması için ayrılan her grupta 12 sıçandan C grubunda 3, TC grubunda 5, OC grubunda 2, OTC grubunda 4 sıçan scalpte insizyon hatlarındaki sütürleri erken dönemde (post op 7 gün içinde) açarak greftin ekspozyonuna neden olmuş ve bu nedenle çalışmadan çıkarılmışlardır.

C ve OC grubundaki sıçanların yağ greftlerinin ekstraksiyonu sırasında (p. o. 98. gün) yağ greftlerinin damarlanmasının az olduğu, yassı bir biçimde ve soluk sarı oldukları görülmüştür (Resim 4.1 ve 4.2).



Resim 4.1. Damarlanması az, yassı ve soluk izlenen greft (C grubu p.o. 98. gün)

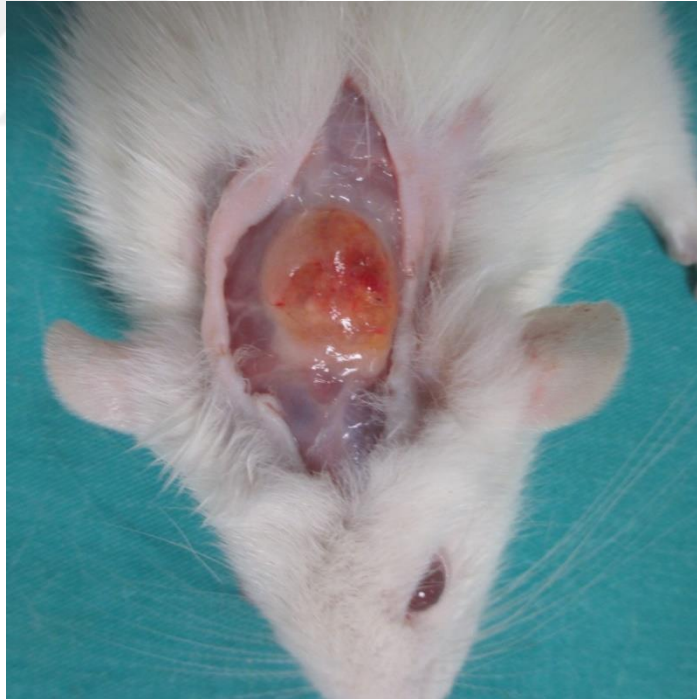


Resim 4.2. Damarlanması az, yassı ve soluk izlenen greft (OC grubu p.o. 98. gün)

TC ve OTC grubundaki sıçanların yağ greftlerinin ekstraksiyonu sırasında (p. o. 98. gün) yağ greftlerinin damarlanmasının fazla olduğu, elipsoid bir biçimde ve canlı sarı oldukları görülmüştür (Resim 4.3 ve 4.4)



Resim 4.3. Damarlanması fazla, elipsoid izlenen greft (TC grubu p. o. 98. gün)



Resim 4.4. Canlı sarı renkte, elipsoid izlenen greft (OTC grubu p. o. 98. gün)

4.2 Ağırlık ve Hacim Ölçümleri

Post- op 98. günde TC grubuna uygulanan yağ greftlerinin ağırlıklarında saptanan azalma C grubuna göre %11, OC grubuna göre %9 daha az gerçekleşmiştir. Yapılan “ağırlık yüzde değişim” hesaplamalarının istatistiksel analizine göre; TC grubundaki sıçanların C ve OC gruplarına göre “ağırlıklarında yüzde değişim”lerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.05$).

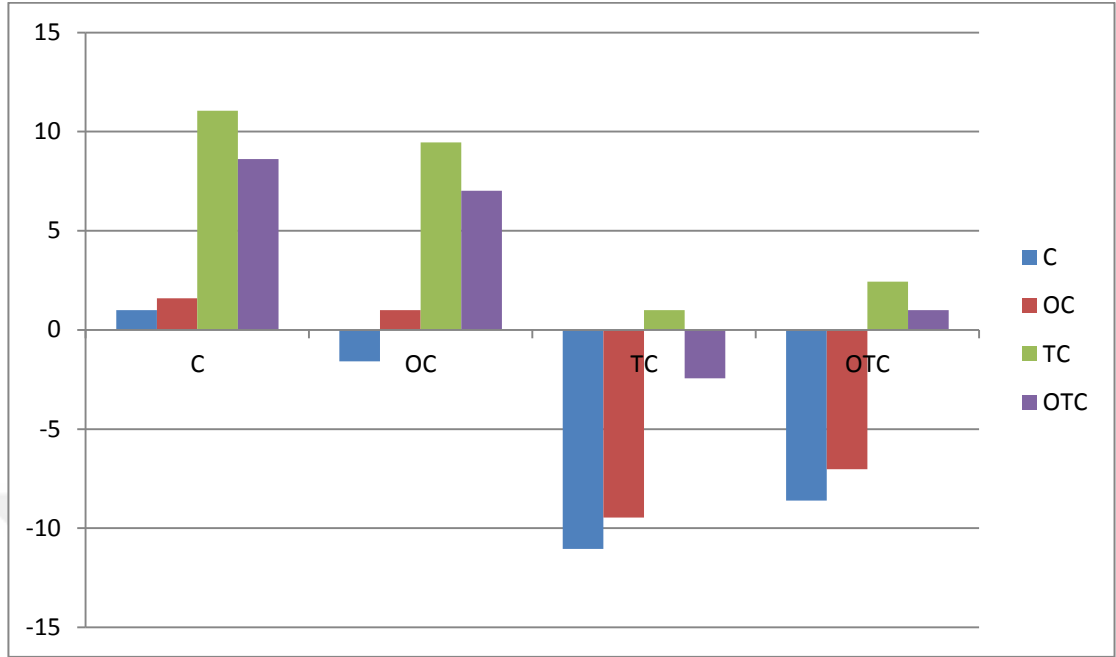
Post- op 98. günde TC grubuna uygulanan yağ greftlerinin hacimlerinde saptanan azalma C grubuna göre %17.5, OC grubuna göre %10 daha az gerçekleşmiştir. Yapılan “hacim yüzde değişim” hesaplamalarının istatistiksel analizine göre;TC grubundaki sıçanların C ve OC gruplarına göre “hacim yüzde değişim”lerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.05$)

Post- op 98. günde OTC grubuna uygulanan yağ greftlerinin ağırlıklarında saptanan azalma C grubuna göre % 8.6, OC grubuna göre %7 daha az gerçekleşmiştir. Yapılan “ağırlık yüzde değişim” hesaplamalarının istatistiksel analizine göre; OTC grubundaki sıçanların C grubuna göre “ağırlıklarında yüzde değişim” de istatistiksel olarak anlamlıya yakın fark ($p = 0.62$) saptanmış fakat OC grubuna göre “ağırlıklarında yüzde değişim”de istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

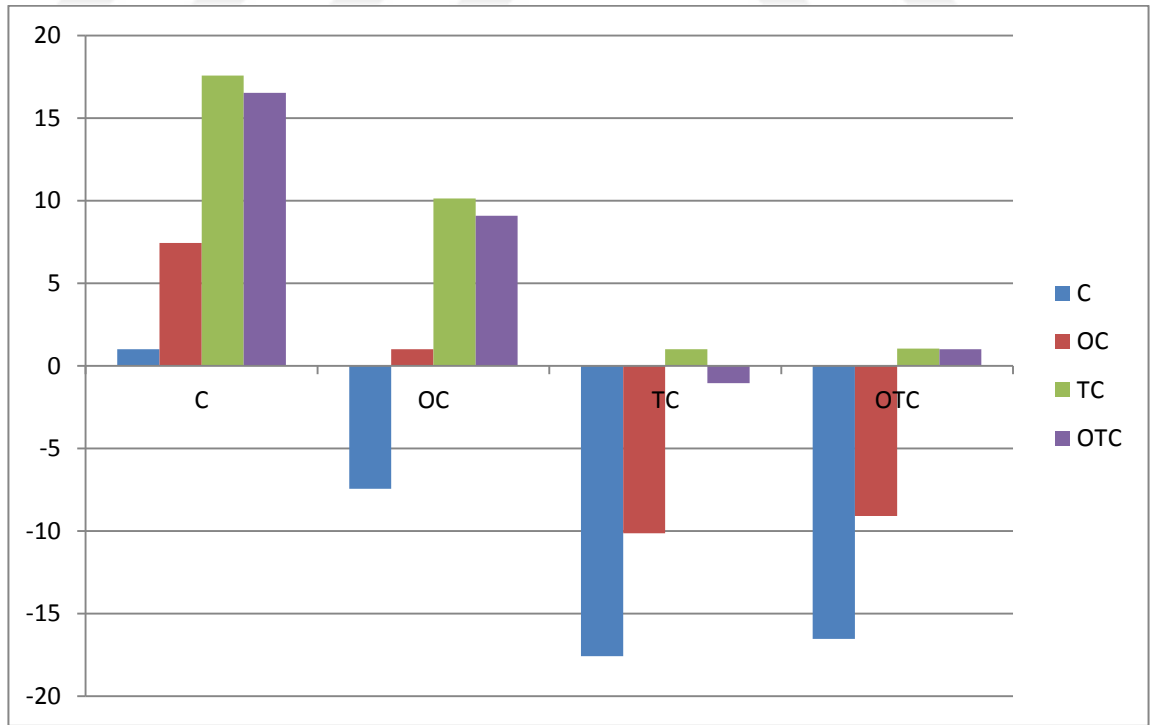
Post- op 98. günde OTC grubuna uygulanan yağ greftlerinin hacimlerinde saptanan azalma C grubuna göre %16.5, OC grubuna göre %9 daha az gerçekleşmiştir. Yapılan “hacim yüzde değişim” hesaplamalarının analizine göre; OTC grubundaki sıçanların C ve OC gruplarına göre “hacim yüzde değişim”lerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.05$)

Ağırlık ve hacim ölçümlerinin yüzde değişimlerine yönelik istatistik tablosu aşağıda tablo 4.1 ve tablo 4.2’ de verilmiştir

Tablo 4.1. Ağırlıkların yüzde değişiminin gruplar arasında karşılaştırılması



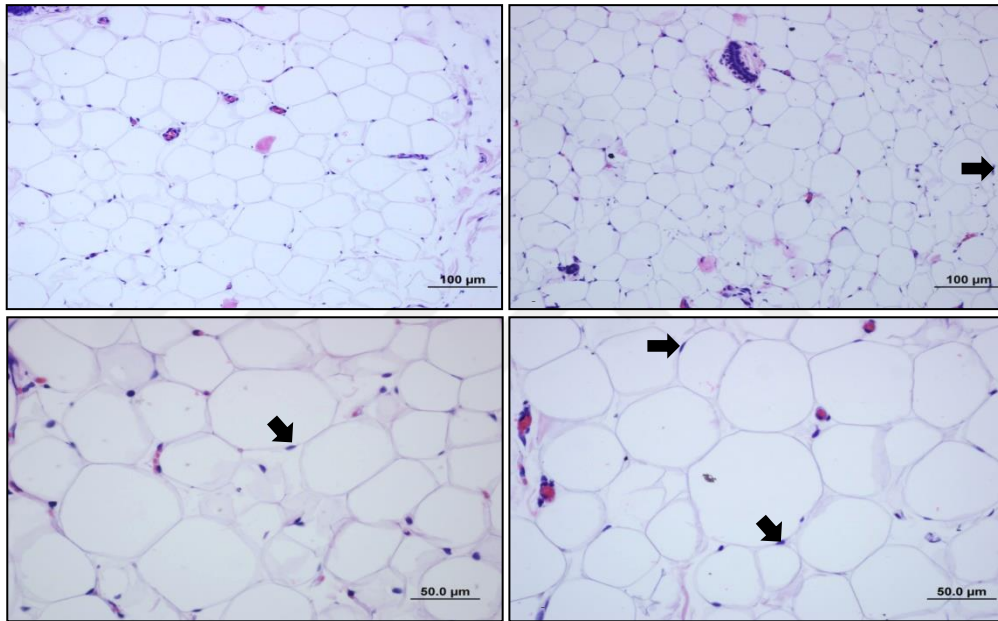
Tablo 4.2. Hacimlerin yüzde değişiminin gruplar arasında karşılaştırılması



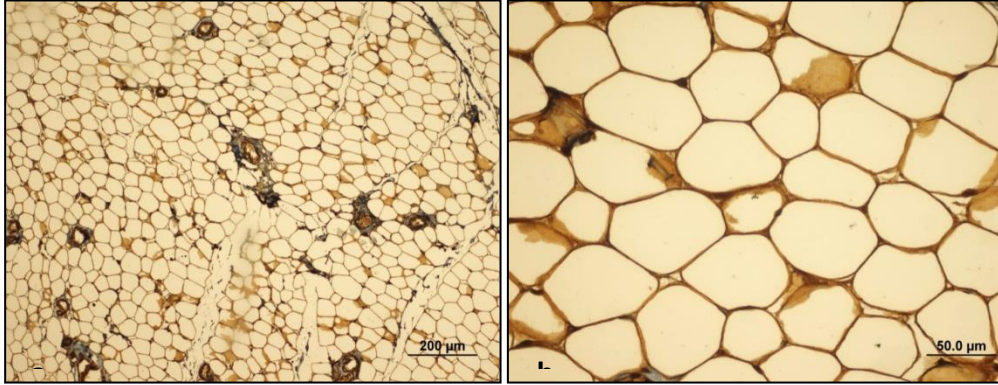
4.3 Histoloji ve İmmunohistokimya

Histolojik kesitlerde kullanılan resimler, materyal method kısmında çizilen şematik resimdeki “kurtulan zon” – “rejenerasyon zonu” bileşkesine denk gelen alanlardan, daha çok rejenerasyon zonunu içerecek şekilde seçilmiştir.

Sham grubu olarak planlanan; greft şeklinde uygulanmayıp, inguinal yağ yastıklarının çıkarıldıkları gibi formolde fikse edilmesini takiben yapılan Hematoksilen- Eozin ve Perilipin boyamalarına ait görüntüler Resim 4.4- 4.5’de gösterilmiştir.



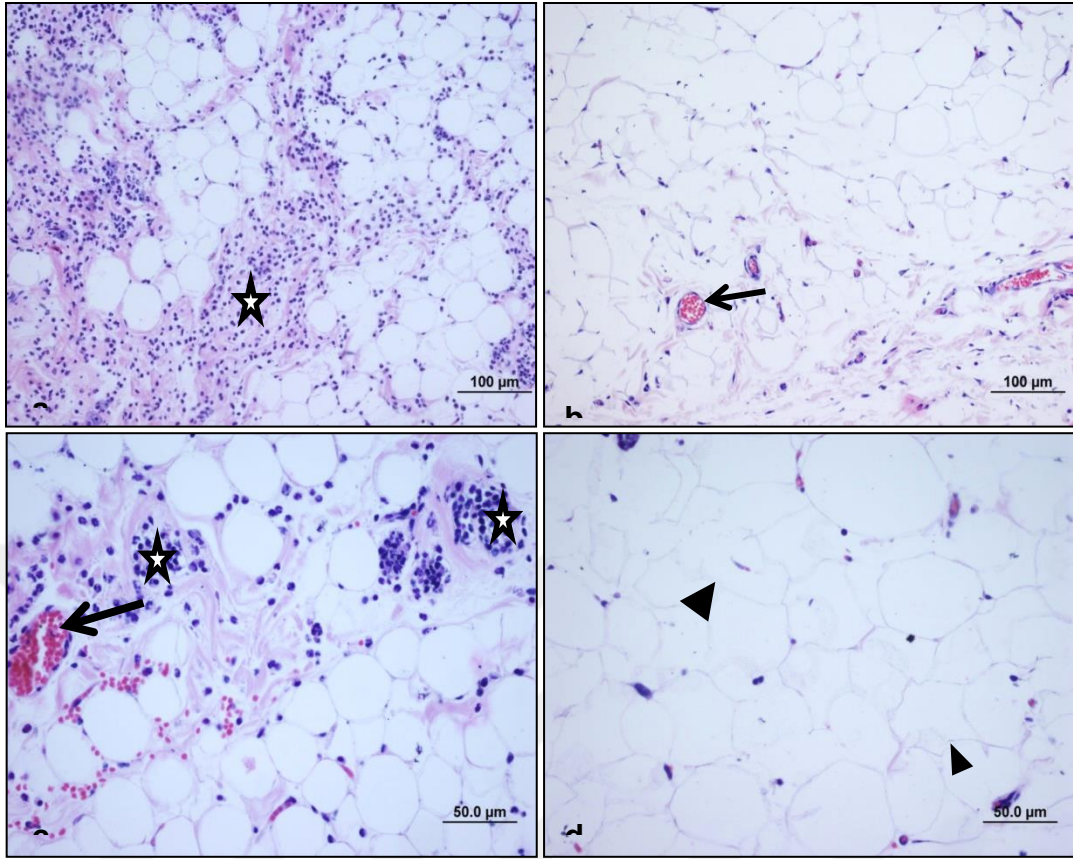
Resim 4.4. Sham grubu: Sham grubuna ait yağ dokularının farklı büyültmelerdeki mikrograftlarında normal yapıda bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren yağ hücreleri (→) görülmektedir. (a-d) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



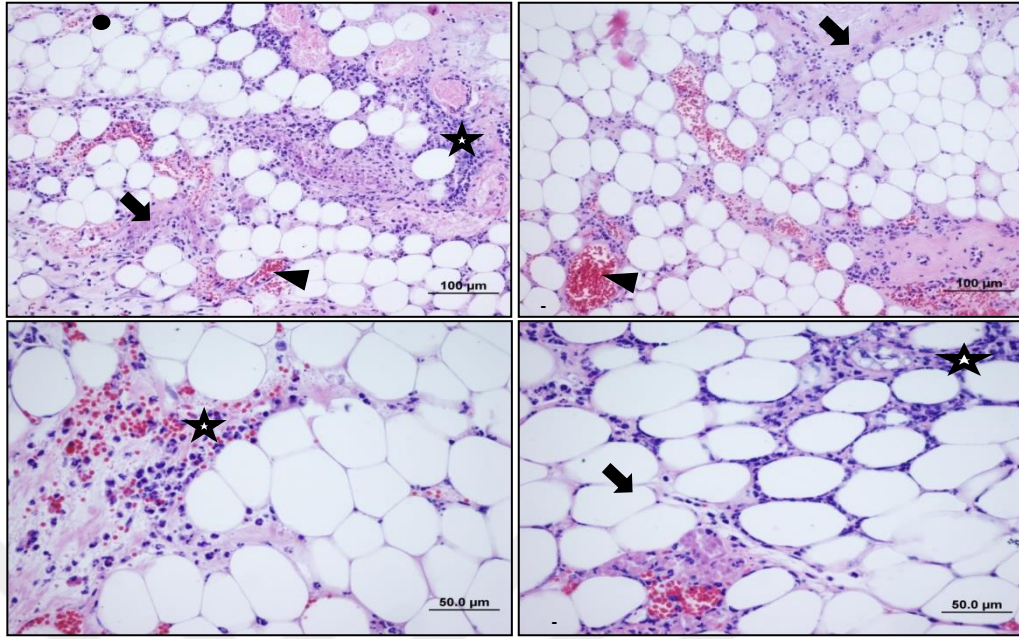
Resim 4.5. Sham grubu perilipin uygulanmış grup: Yağ hücrelerinin perilipinle pozitif boyanması görülmekte (scale bar:200 µm (X10), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin)

4.3.1 Erken dönem Histoloji ve İmmunohistokimya

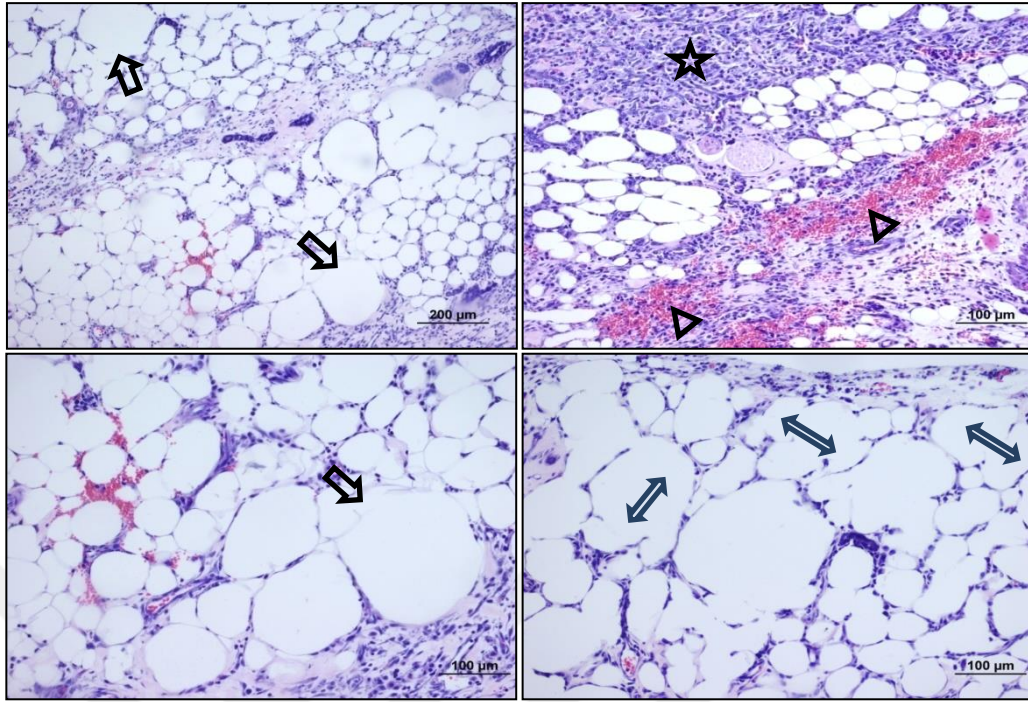
Kontrol grubuna ait 1. , 4. , 7., ve 14. günlerde alınan biopsilerin Hematoksilen- Eozin boyamaları incelendiğinde; **Birinci gün** alınan biopsilerde çoğunluğu yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri, vasküler kongesyon ve hücrel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.6). **Dördüncü gün** alınan biopsilerde membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleri, yoğun vasküler kongesyon, yoğun hücrel infiltrasyon ve intersistiyel alanda genişleme- ödem dikkat çekmektedir (Resim 4.7). **Yedincigün** alınan biopsilerde membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleriyle birlikte bazı yağ hücrelerinde füzyon, yoğun hemorajik alanlar ve hücrel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.8). **Ondördüncü gün** alınan biopsilerde kistik yapıda yağ hücreleri- kist vakuol formasyonu, yağ hücrelerinde füzyon ve hücrel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.9). Kontrol grubundaki bu erken dönem bulgular değerlendirildiğinde greftlerin uzun dönem sağ kalımlarının düşük olacağını göstermektedir.



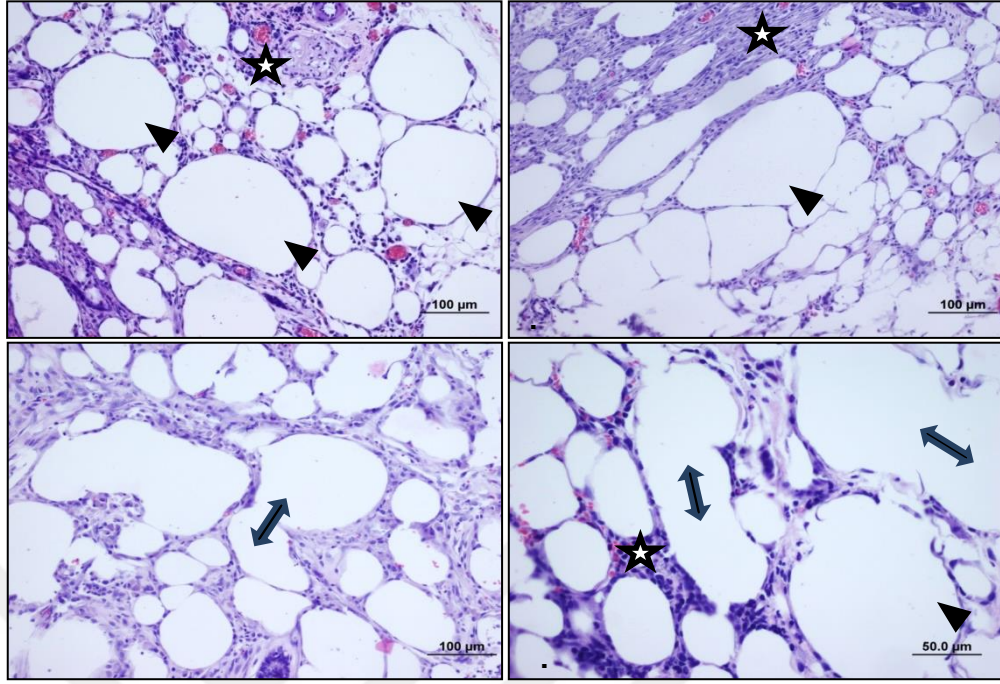
Resim 4.6. C grubu p. o. 1. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri (▶), vasküler kongesyon (→) ve hücreyel infiltrasyon (*) dikkat çekmektedir (a-d) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



Resim 4.7. C grubu p. o. 4. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleri (●), yoğun vasküler kongesyon (▶), hücresel infiltrasyon (*) ve ödemli bağ doku septalar (→) dikkat çekmektedir (a-d) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

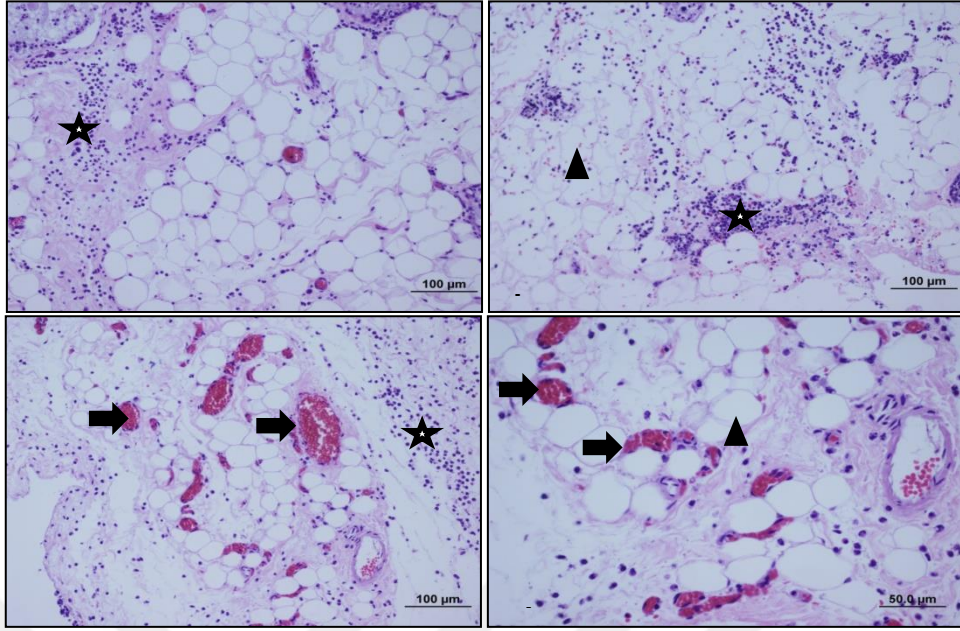


Resim 4.8. C grubu p. o. 7. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleri (→), bazı yağ hücrelerinde füzyon (↔), yoğun hemorajik alanlar (►) ve hücresel infiltrasyon (*) dikkat çekmektedir(a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), HE).

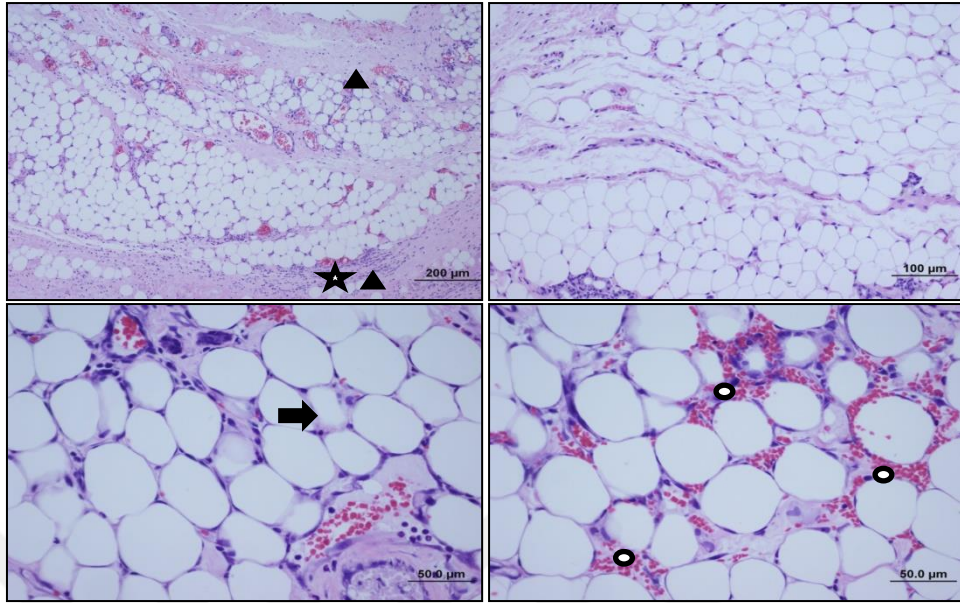


Resim 4.9. C grubu p. o. 14. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında kistik yapıda yağ hücreleri (▶), bazı yağ hücrelerinde füzyon (↔) ve hücreyel infiltrasyon (*) dikkat çekmektedir (a-d) (scale bar:100μm (X20), scale bar:50.0μm (X40), HE).

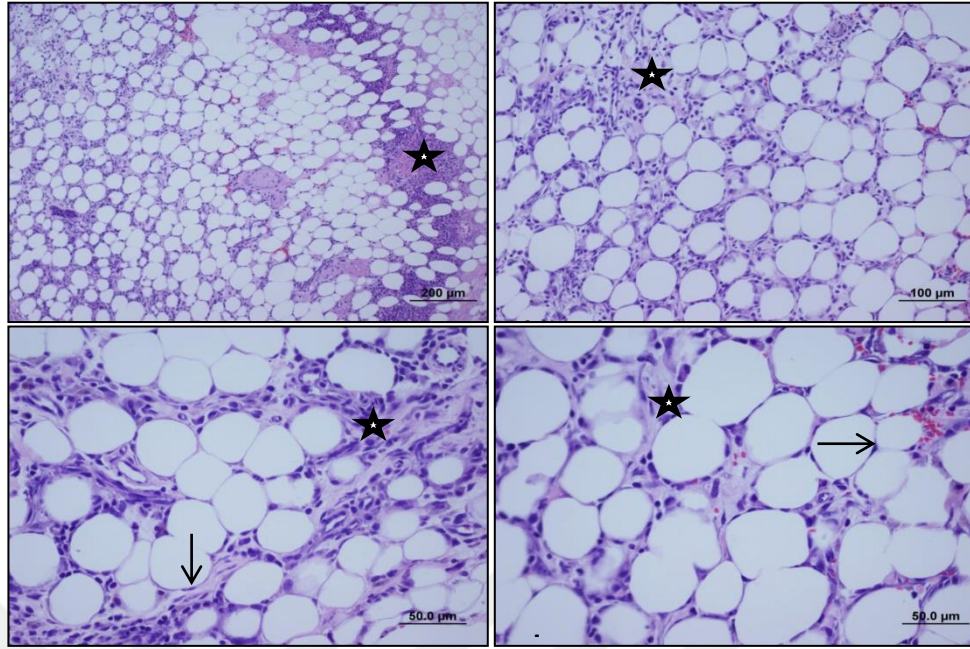
Oral curcumin grubuna ait 1. , 4. , 7., ve 14. günlerde alınan biopsilerin Hematoksilen- Eozin boyamaları incelendiğinde; **Birinci gün** alınan biopsilerde çoğunluğu yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen yağ hücreleri, vasküler kongesyon ve hücreyel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.10). **Dördüncü gün** alınan biopsilerde membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleri, vasküler kongesyon, hücreyel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.11). **Yedinci gün** alınan biopsilerde membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleriyle birlikte bazı yağ hücrelerinde füzyon, hemorajik alanlar ve hücreyel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.12). **Ondördüncü gün** alınan biopsilerde kistik yapıda yağ hücreleri- kist vakuol formasyonu, yağ hücrelerinde füzyon ve hücreyel infiltrasyon dikkat çekmektedir (Resim 4.13). Oral curcumin grubundaki bu erken dönem bulgular değerlendirildiğinde greftlerin uzun dönem sağ kalımlarının düşük olacağını göstermektedir.



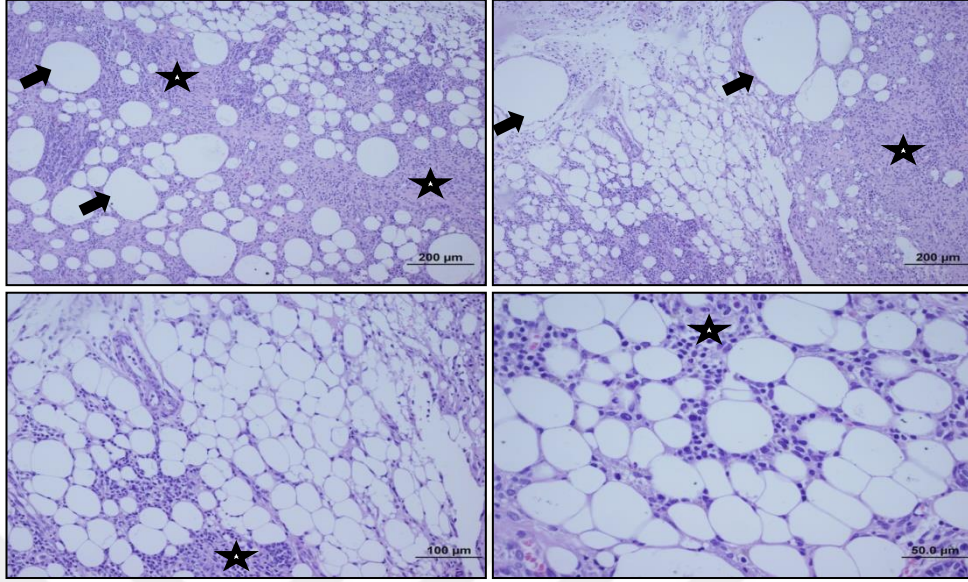
Resim 4.10. OC grubu p.o. 1. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyültmelerdeki mikrograftlarında membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş dejenere yağ hücreleri (▶), yoğun vasküler kongesyon ve çok sayıda vasküler yapı (→) ile birlikte hücresel infiltrasyon (*) dikkat çekmektedir (a-d) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



Resim 4.11. OC grubu p. o. 4. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında membran bütünlüğünü yitirmiş, çekirdeğini kaybetmiş az sayıda yağ hücresi (→), hemorajik alanlar (o), hücresel infiltrasyon (*) ve yağ dokunun fibrozis ile enkapsule oluşu izlenmektedir (▲).(a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE)

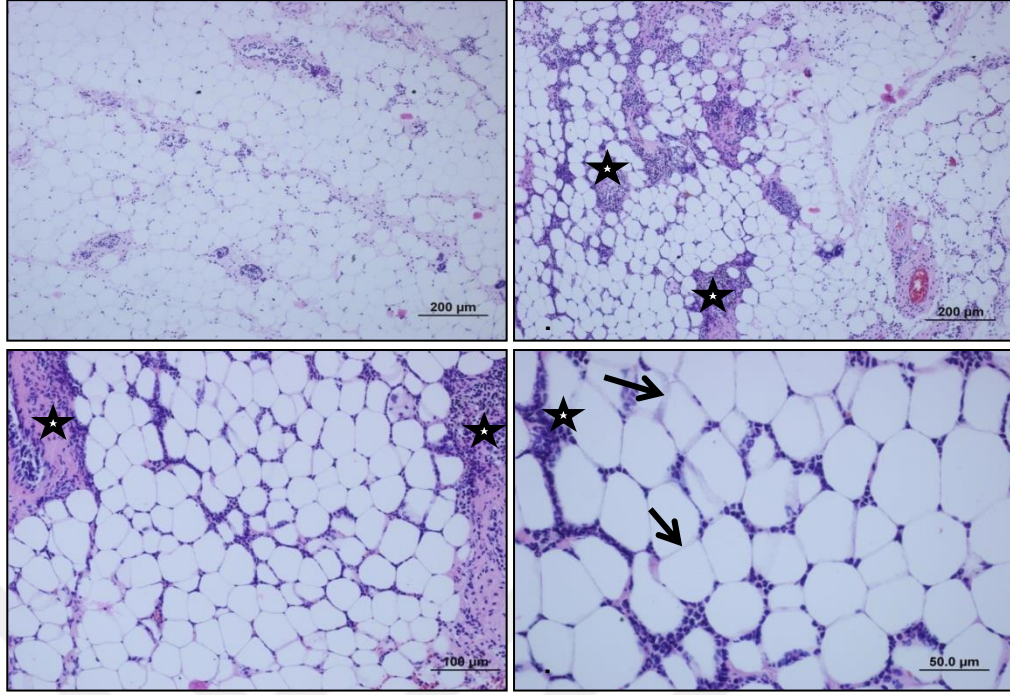


Resim 4.12. OC grubu p. o. 7 .gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında çekirdekleri ile yaşayabilirliğini koruyan normale yakın az sayıda yağ hücreleri (→) ile devam eden hücresel infiltrasyon (*) görülmektedir. (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

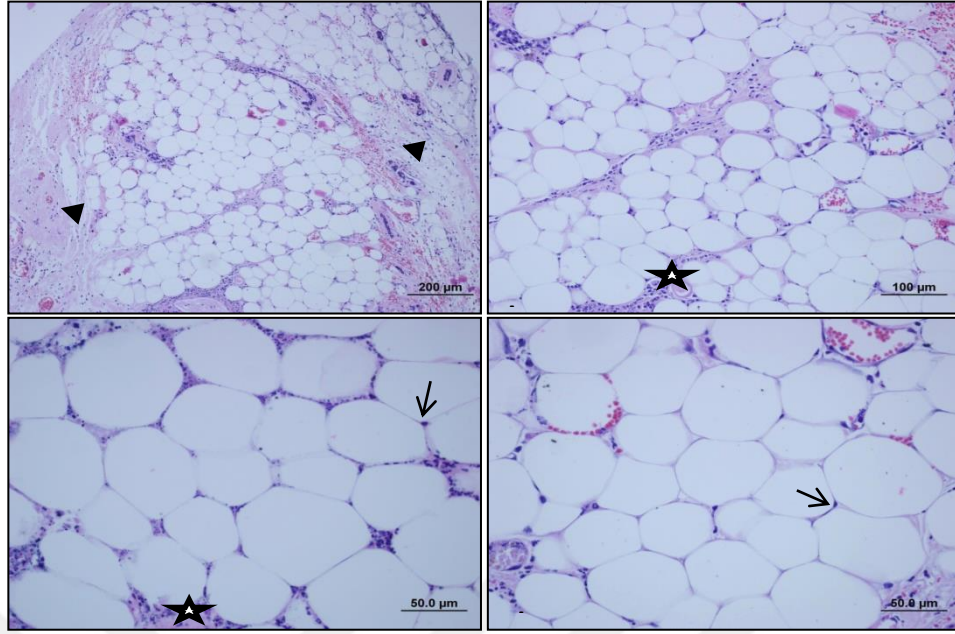


Resim 4.13. OC grubu p. o. 14. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında çok sayıda kistik hücre yapısı (→) ve yoğun hücreyel infiltrasyon (*) görülmektedir. (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE)

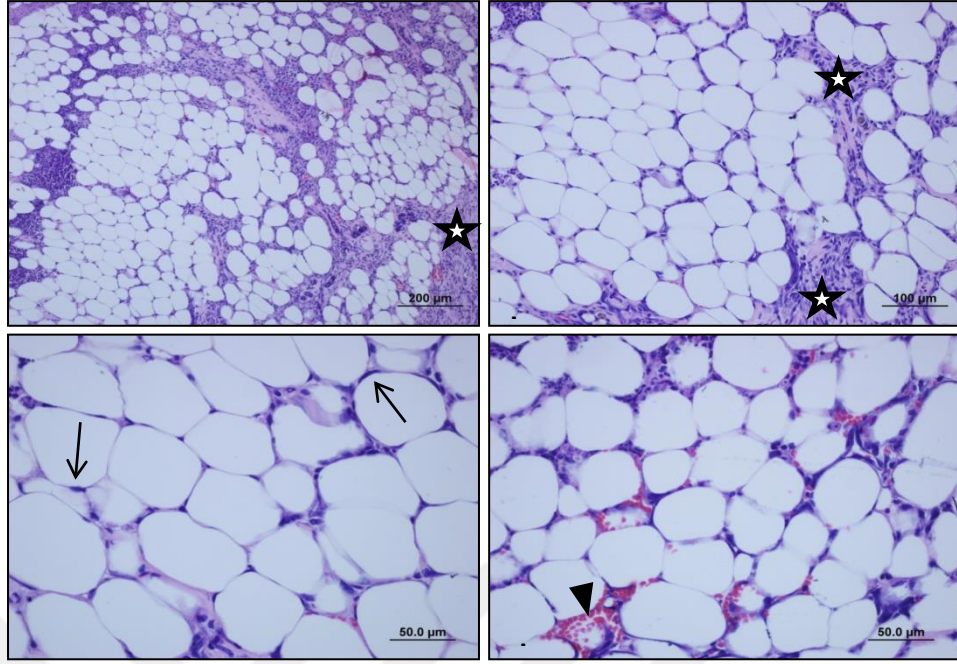
Topikal curcumin grubuna ait 1. , 4. , 7., ve 14. günlerde alınan biopsilerin Hematoksilen- Eozin boyamaları incelendiğinde; **birinci gün** alınan biopsilerde normale yakın bütünlüğünü korumuş ve çekirdek içeren hücreler gözlense de bir miktar çekirdeği olmayan hücreler de görülmüş ve bazı bölgelerde hücreyel infiltrasyongözlenmiştir (Resim 4.14). **Dördüncü gün** alınan biopsilerde normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler görülmüştür. Ayrıca yağ doku içerisindeki bağ dokusu septalarda ve intersistiyumda az miktarda hücreyel infiltrasyon dikkat çekmiştir (Resim 4.15). **Yedinci gün** alınan biopsilerde genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler ve az miktarda hücreyel infiltrasyon görülmüştür. Ayrıca damar yapılarının da C ve OC gruplarına oranla daha fazla olduğu dikkat çekmektedir (Resim 4.16). **Ondördüncü gün** alınan biopsilerde oldukça düzgün bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren yağ hücreleri ve az miktarda fibrozis görülmektedir (Resim 4.17). Topikal curcumin grubundaki bu erken dönem bulgular değerlendirildiğinde greftlerin uzun dönem sağ kalımlarının yüksek olacağını göstermektedir.



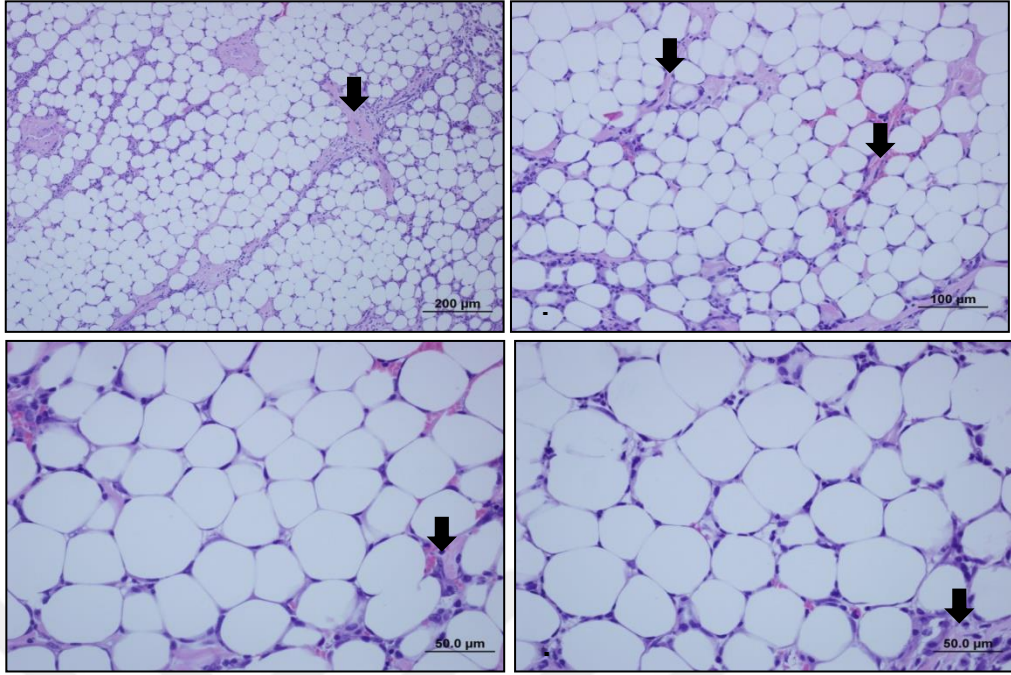
Resim 4.14 .TC grubu p. o. 1. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler gözlense de az sayıda çekirdeği olmayan hücreler de görülmekte (→) ve bazı bölgelerde hücreyel infiltrasyon (*) gözlenmektedir. (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



Resim 4.15. TC grubu p. o. 4. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler (→) ve kısmi hücresel infiltrasyon (*) görülmektedir. Ayrıca yağ dokunun fibrozis ile enkapsule oluşu izlenmektedir (►) (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



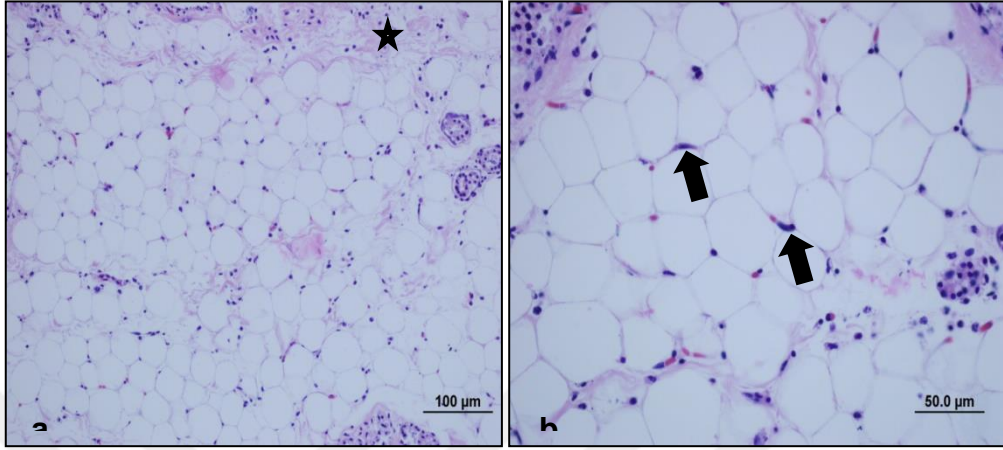
Resim 4.16. TC grubu p. o. 7. gün: grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler (→) ve hücrel infiltrasyon (*) görülmektedir. Ayrıca damarlanma yapıları da dikkat çekmektedir (►) (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



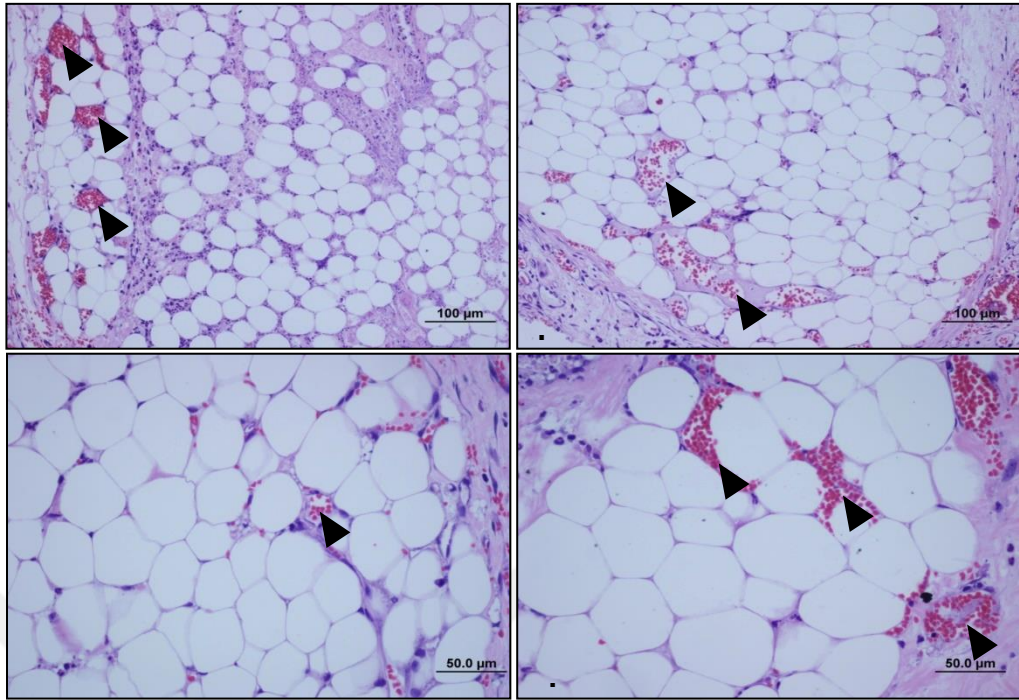
Resim 4.17. TC grubu p. o. 14.gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyülmelerdeki mikrograftlarında oldukça düzgün bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren yağ hücreleri ve az miktarda fibrozis (→) görülmektedir (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

Oral + Topikal curcumin grubuna ait 1. , 4. , 7., ve 14. günlerde alınan biopsilerin Hematoksilen- Eozin boyamaları incelendiğinde; **birinci gün** alınan biopsilerde normale yakın bütünlüğünü korumuş ve çekirdek içeren hücreler gözlenirse de bir miktar çekirdeği olmayan hücreler de görülmüş ve bazı bölgelerde hücrel infiltrasyon gözlenmiştir (Resim 4.18). **Dördüncü gün** alınan biopsilerde normale yakın bütünlüğünü koruyan, çekirdek içeren hücreler ve az miktarda çekirdeklerini kaybetmiş hücrelerle birlikte Intersistiyumda hücrel infiltrasyon görülmüştür. Ayrıca yoğun vasküler yapılar- artmış anjiogenez dikkat çekmiştir.(Resim 4.19). **Yedinci gün** alınan biopsilerde genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler ve yoğun hücrel infiltrasyon görülmüştür.(Resim 4.20). **Öndördüncü gün** alınan biopsilerde oldukça düzgün bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren yağ hücreleri ve az miktarda hücrel infiltrasyon dikkat çekmiştir(Resim 4.21). Oral + Topikal curcumin grubundaki bu

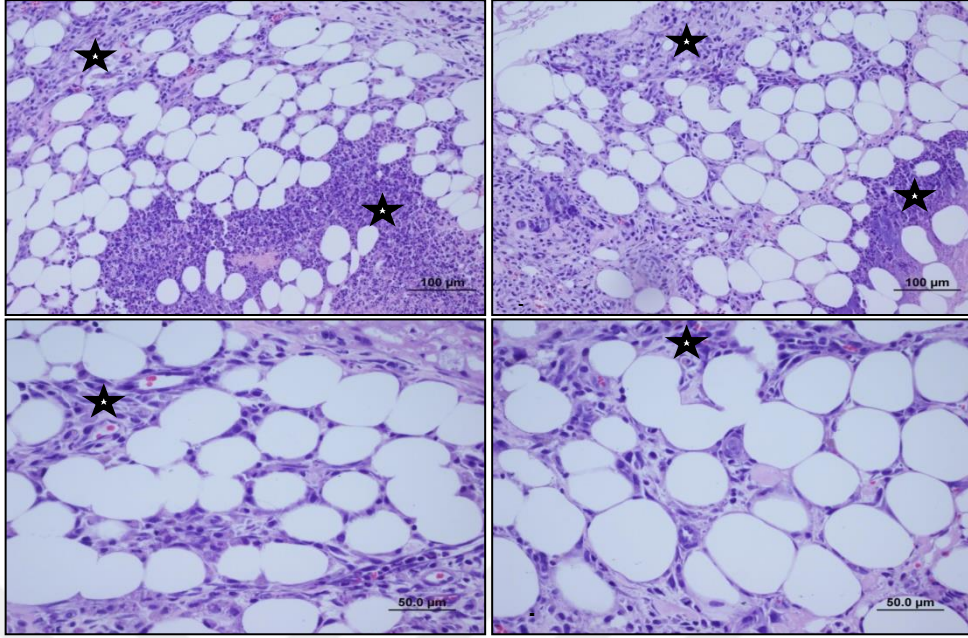
erken dönem bulgular değerlendirildiğinde greftlerin uzun dönem sağ kalımlarının yüksek olacağını göstermektedir.



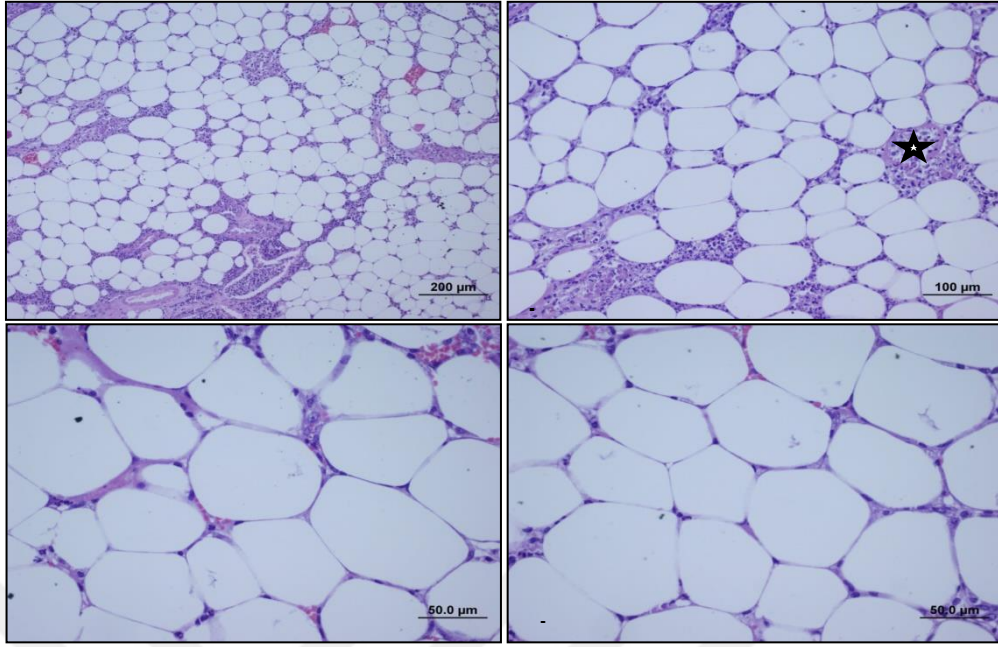
Resim 4.18. OTC grubu p. o. 1.gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler (→) gözlene de az sayıda çekirdeği olmayan hücreler de görülmekte (▶) ve hücreyel infiltrasyon (*) gözlenmektedir (a,b) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



Resim 4.19. OTC p. o. 4.gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler ile özellikle yoğun vasküler yapılar dikkat çekmekte (►). (a-d) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



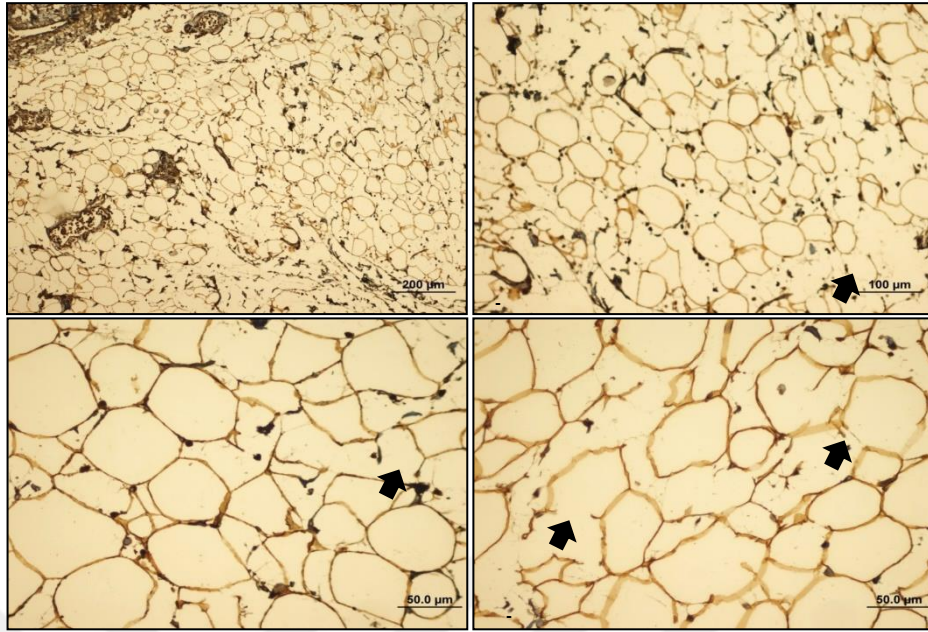
Resim 4.20. OTC grubu p. o. 7. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler gözlenmekle birlikte özellikle yoğun hücresel infiltrasyon dikkat çekmekte (*) (a-d) (scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).



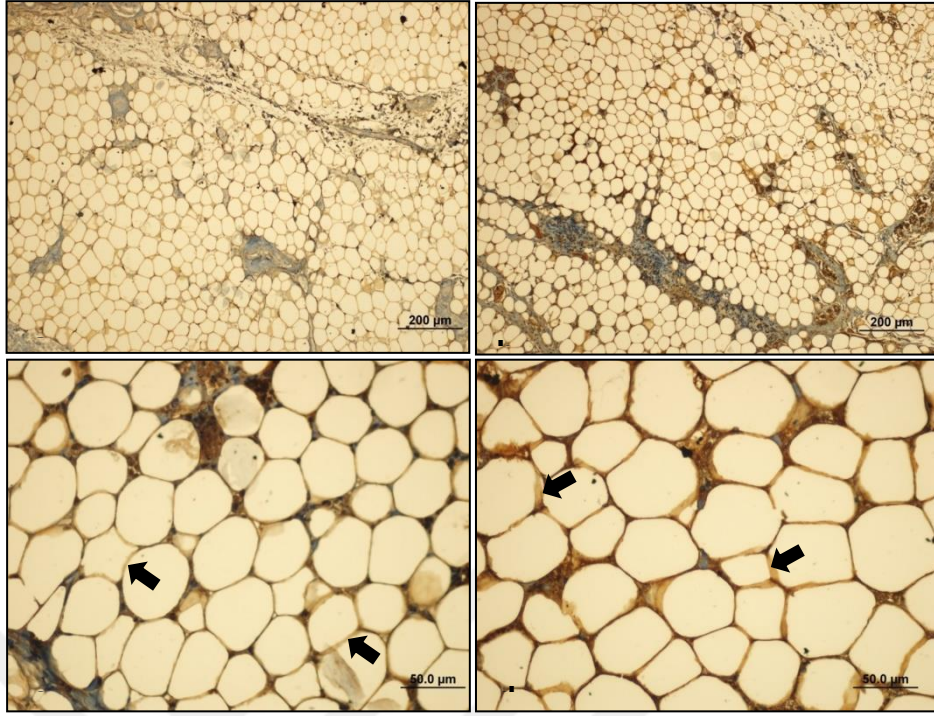
Resim 4.21. OTC grubu p. o. 14.gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normal yapıda bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler gözlenmekle birlikte az miktarda hücreyel infiltrasyon dikkat çekmekte (*) (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

Erken dönem sağ kalım çalışması için incelenen grupların perilipin boyamalarına ait resimler aşağıda gösterilmiştir (Resim 4.22- 4.37).Perilipin canlı adipositlerin hücre membralarında bulunan bir protein olup adiposit canlılığını yitirdiğinde perilipin proteinleri bir kaç gün içinde denatüre olmakta ve hücre membranları perilipin immunohistokimyasal boyası ile boyanmamakta veya zayıf boyanmaktadır.

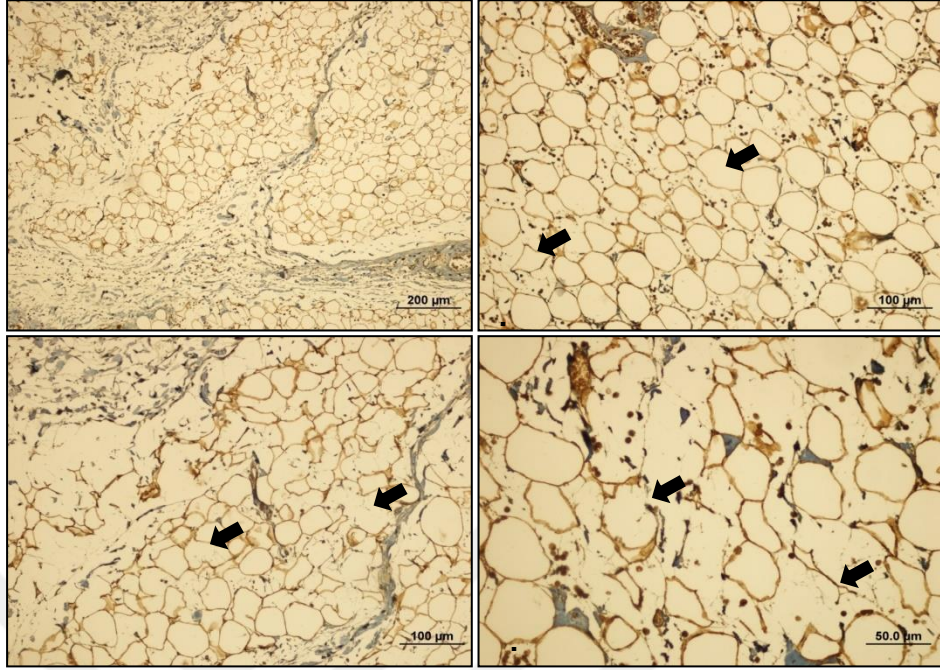
Sırasıyla, resim alt yazılarından da takip edilebileceği üzere, C, OC, TC ve OTC gruplarının 1. , 4. , 7. ve 14. gün biopsilerinin perilipin boyamaları değerlendirildiğinde; topikal curcuminin uygulandığı TC ve OTC gruplarında hem adiposit bütünlüğü daha iyi korunmuş alanlar daha fazla izlenmiştir hem de perilipin ile daha kuvvetli boyanmaları dikkat çekmiştir.



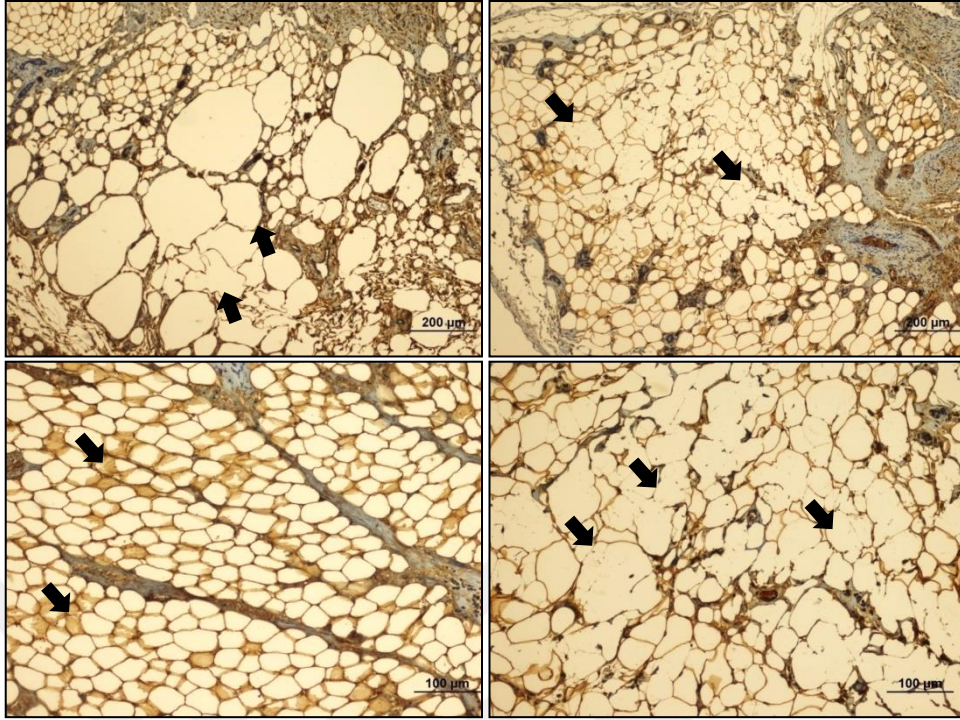
Resim 4.22. C grubu p. o. 1. gün perilipin uygulaması: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilipinle soluk boyanması- perilipin negatif boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar: 50.0µm (X40), perilipin).



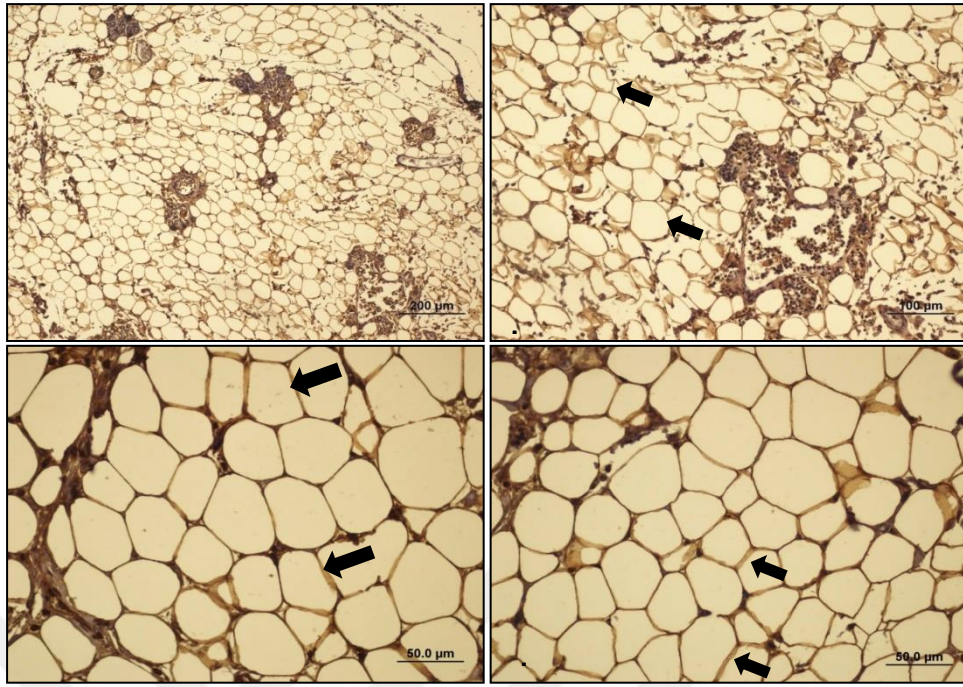
Resim 4.23. C grubu p. o. 4. gün perilypin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilypinle soluk boyanması dikkat çekmekte (→)(a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar: 50.0µm (X40), perilypin).



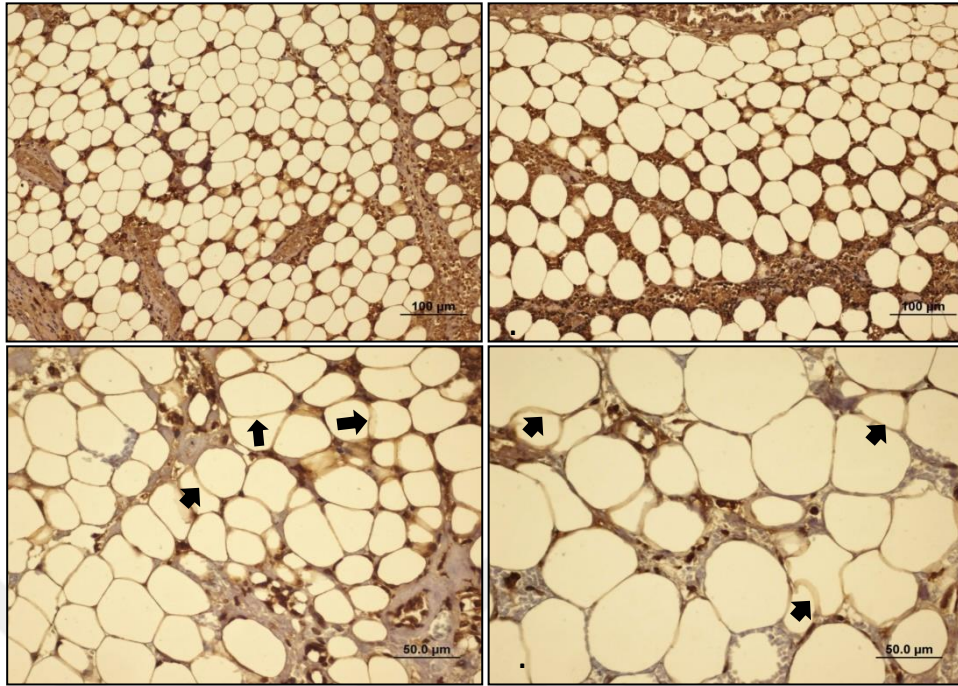
Resim 4.24. C grubu p. o. 7. gün perilypin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilypinle soluk boyanması dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar: 50.0µm (X40), perilypin).



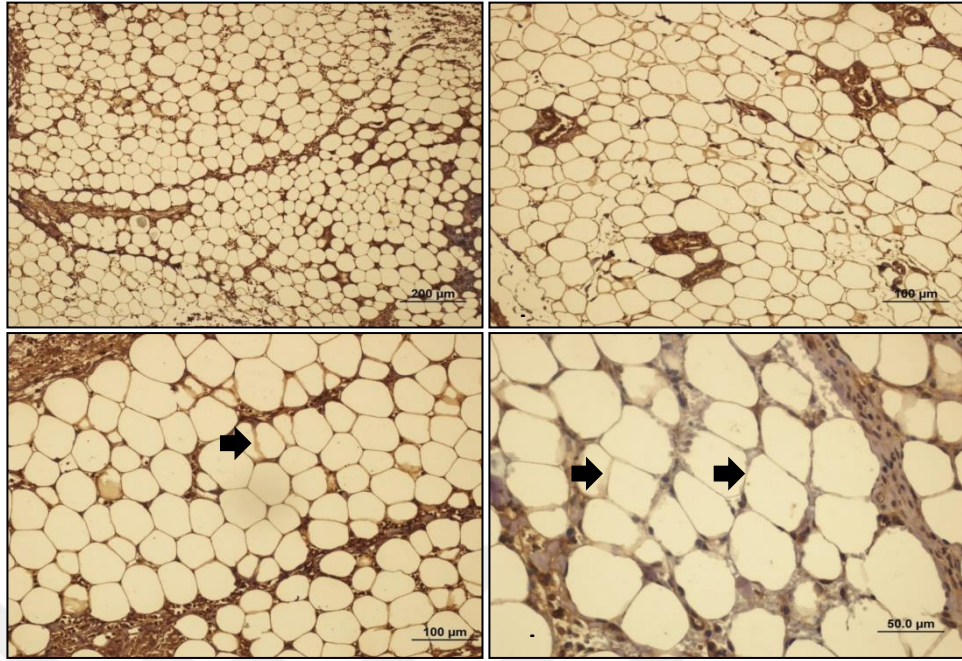
Resim 4.25. C grubu p. o. 14. gün perilipin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilipinle boyanmaması veya soluk boyanması- perilipin negatif boyanma dikkat çekmekte (→)(a-d) (scale bar:200 μm (X10), (scale bar:200 μm (X10),scale bar:100 μm (X20), perilipin).



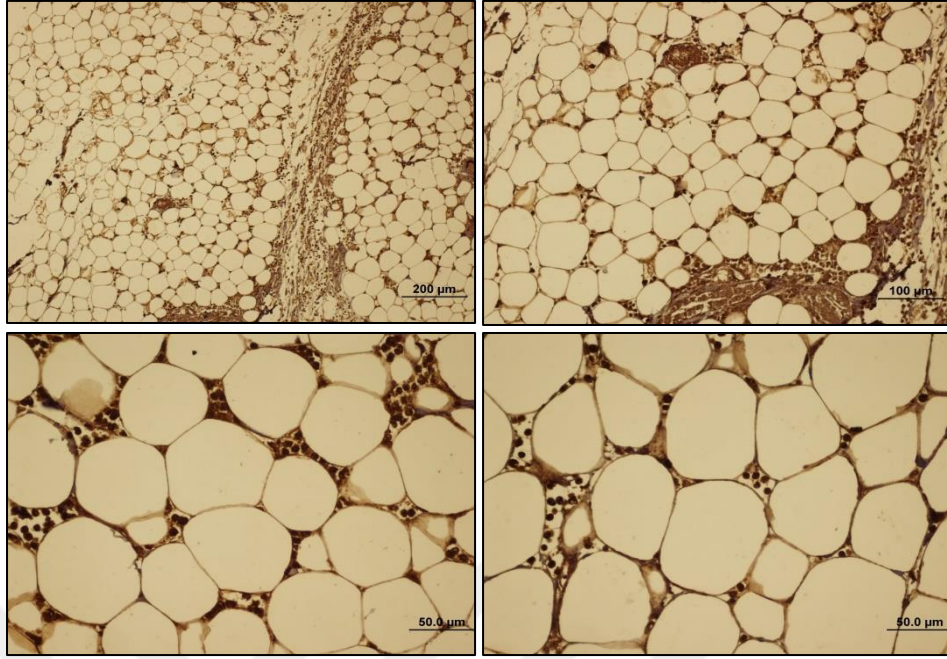
Resim 4.26. OC grubu p. o. 1. gün perilipin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilipinle soluk boyanması dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



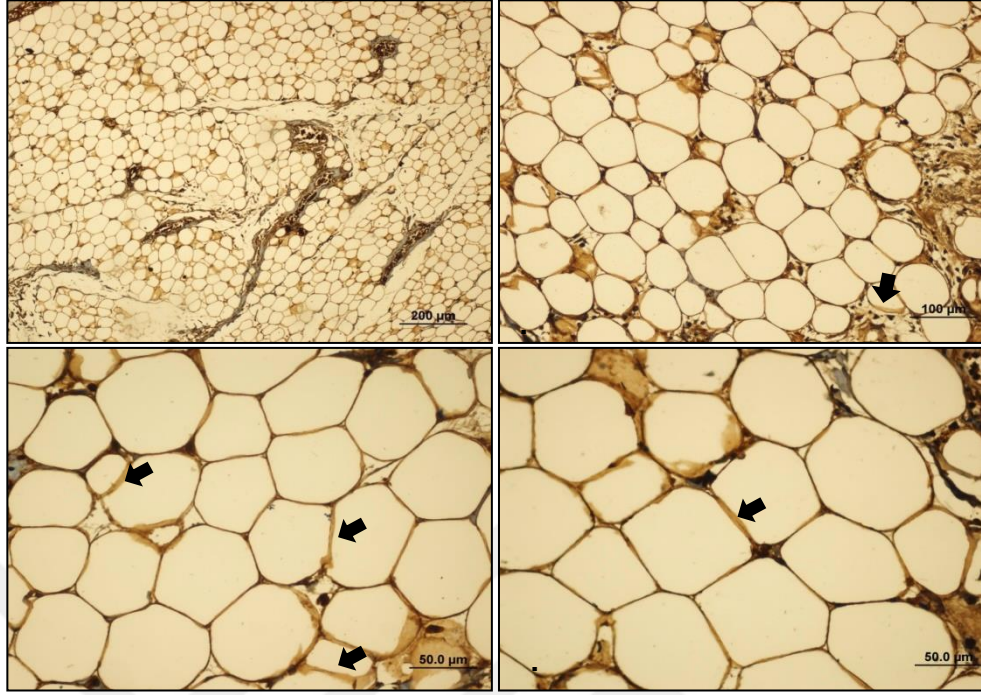
Resim 4.27. OC grubu p. o. 4. gün perilipin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilipinle soluk boyanması dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



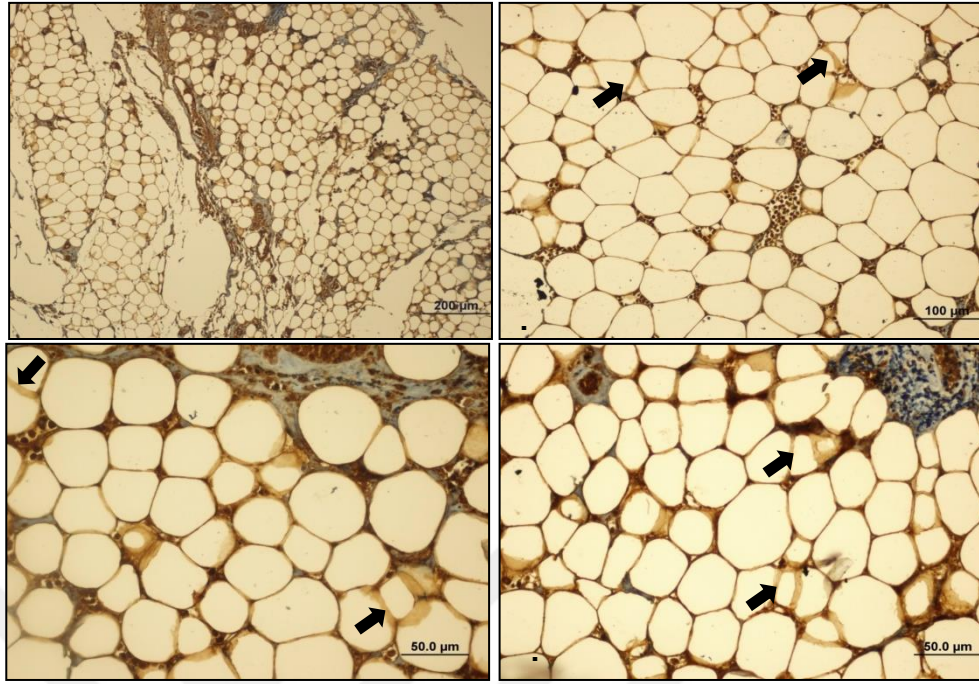
Resim 4.28. OC grubu p. o. 7. gün perilipin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilipinle boyanmaması dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin)



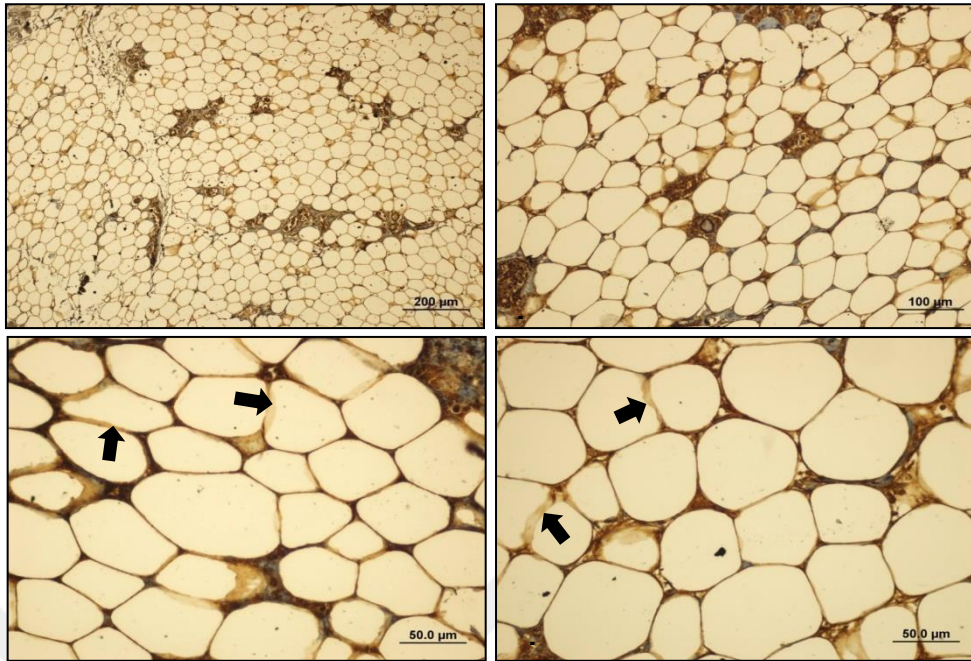
Resim 4.29. OC grubu p. o. 14. gün perilipin: Yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş ve kistik yapılı yağ hücrelerinin perilipinle soluk boyanması dikkat çekmekte (a,b) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), perilipin).



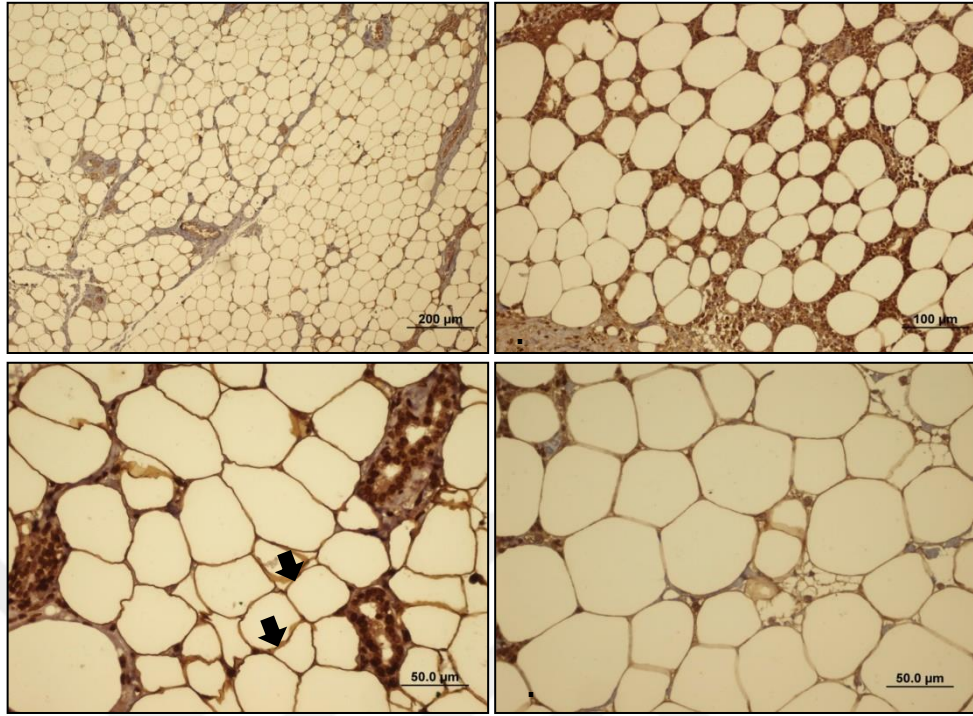
Resim 4.30. TC grubu p. o. 1. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra bazı hücrelerde ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→)(a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm, (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



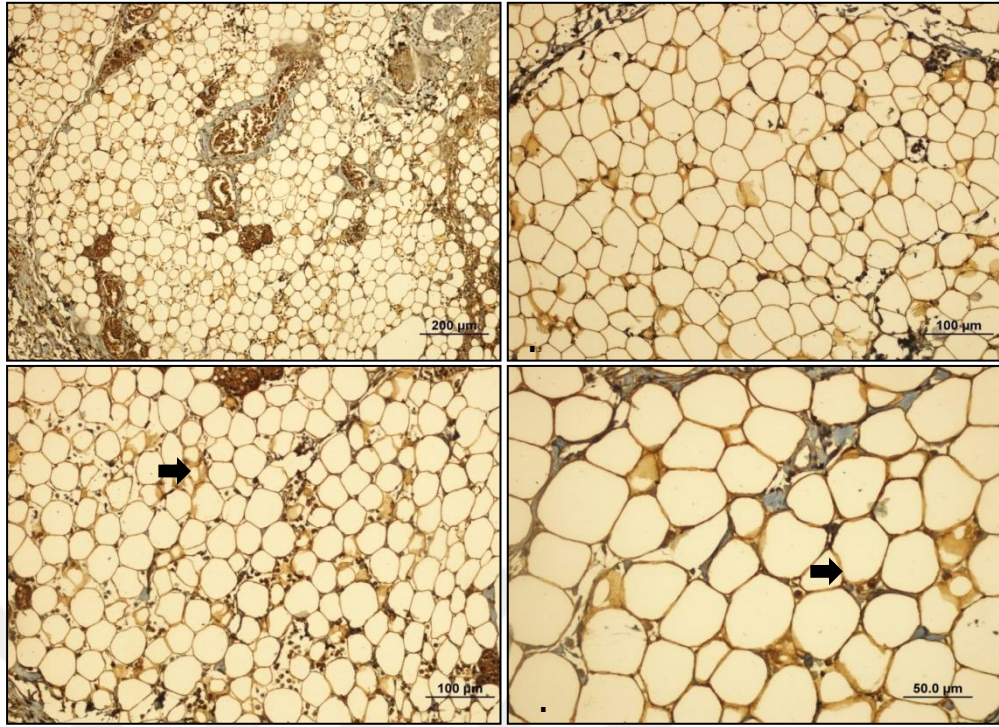
Resim 4.31. TC grubu p. o. 4. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra bazı hücrelerde ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



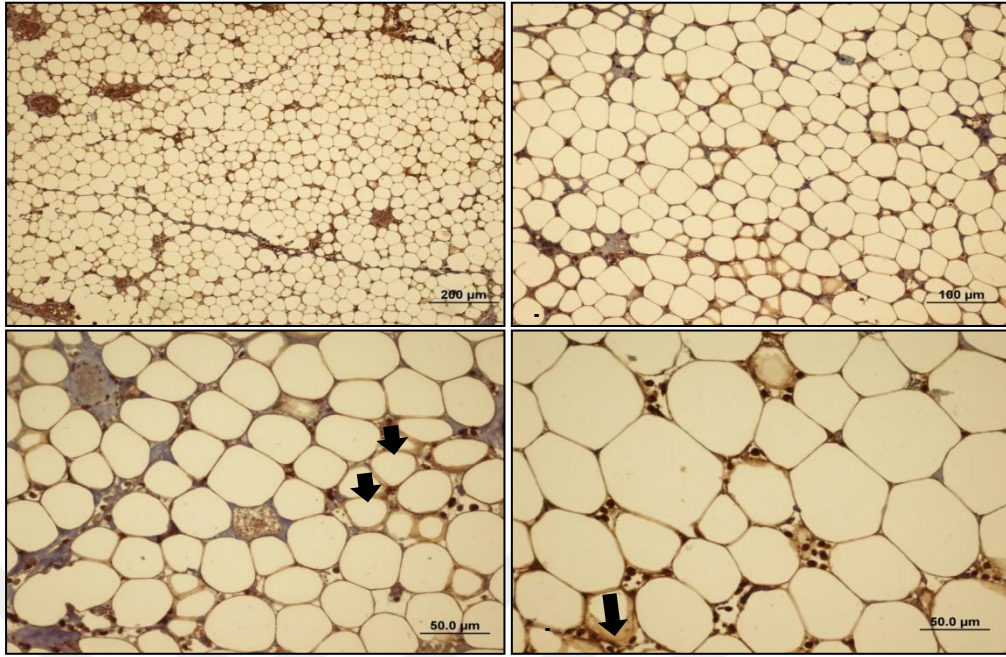
Resim 4.32. TC grubu p. o. 7. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra bazı hücrelerde ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



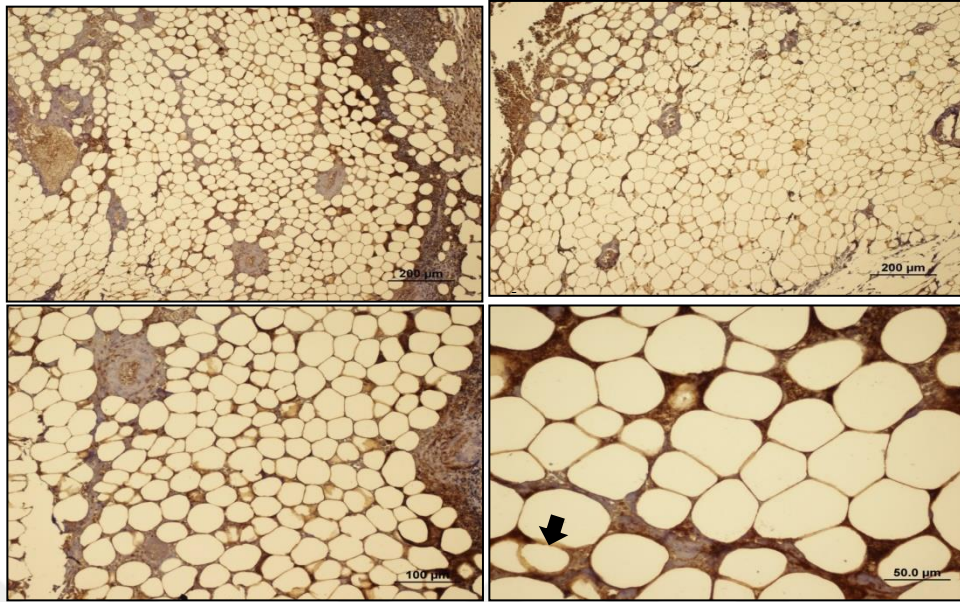
Resim 4.33. TC grubu p. o. 14. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle genellikle normal boyanmasının yanı sıra birkaç hücrede ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10),, scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



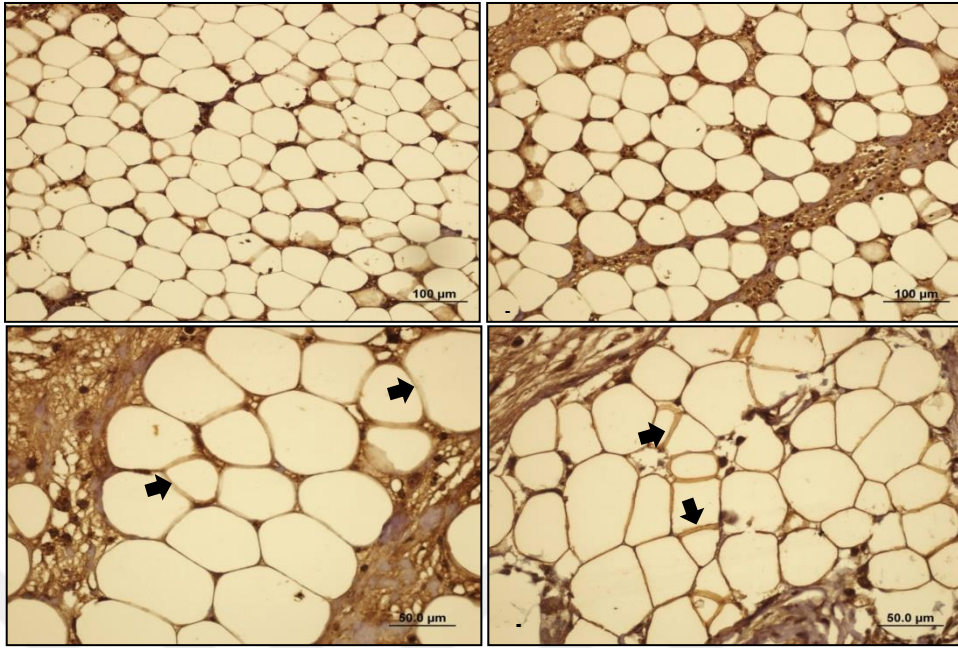
Resim 4.34. OTC grubu p. o. 1. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra birkaç hücrede ise orta derecede boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin)



Resim 4.35. OTC grubu p. o. 4. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra bazı hücrelerde ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



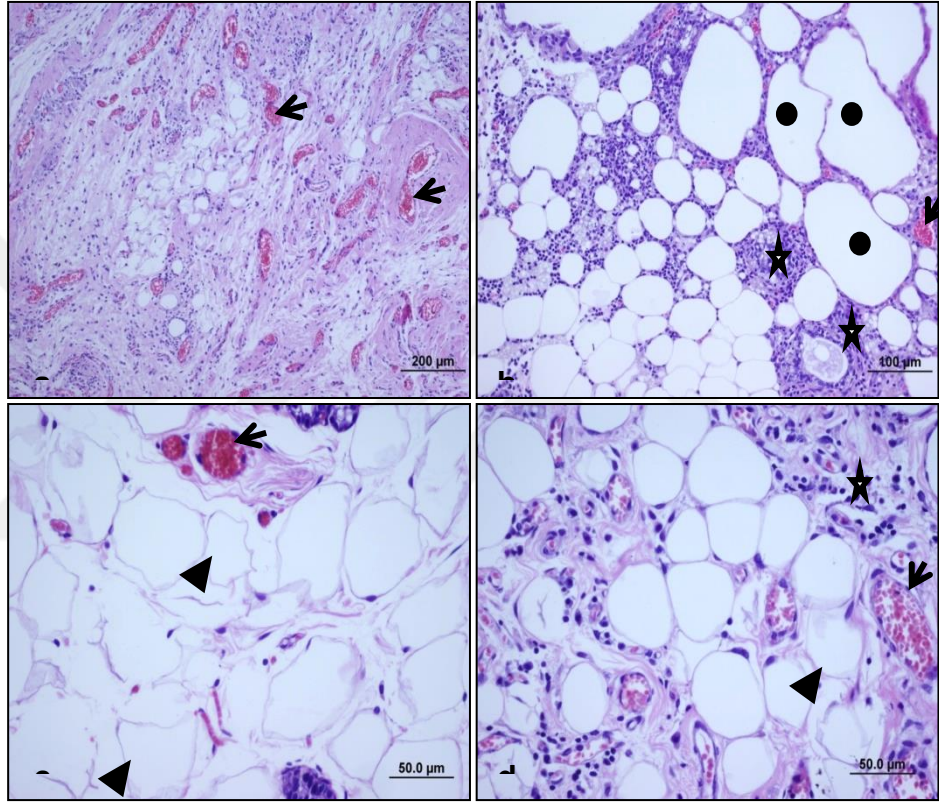
Resim 4.36. OTC grubu p. o. 7. gün perilipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra birkaçı hücrede ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



Resim 4.37. OTC grubu p. o. 14.gün perlipin: Yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra bazı hücrelerde ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perlipin).

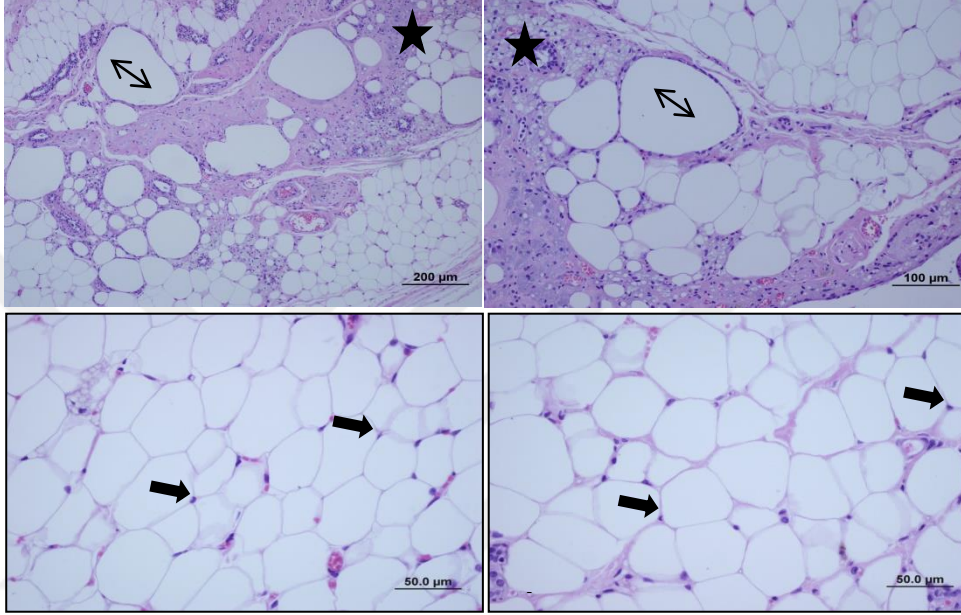
4.3.2 Geç dönem histoloji ve immunohistokimya

Kontrol grubuna ait 98. gün alınan biopsilerin Hematoksilen eozin boyama ile incelenmesi sonucunda; çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş ve kistik yapıda yağ hücrelerinin sayıca fazla olduğu, hücresel infiltrasyonun geç dönemde dahi devam ettiği, vasküler kongesyon ve yoğun fibrozis dikkat çekmektedir (Resim 4.38)



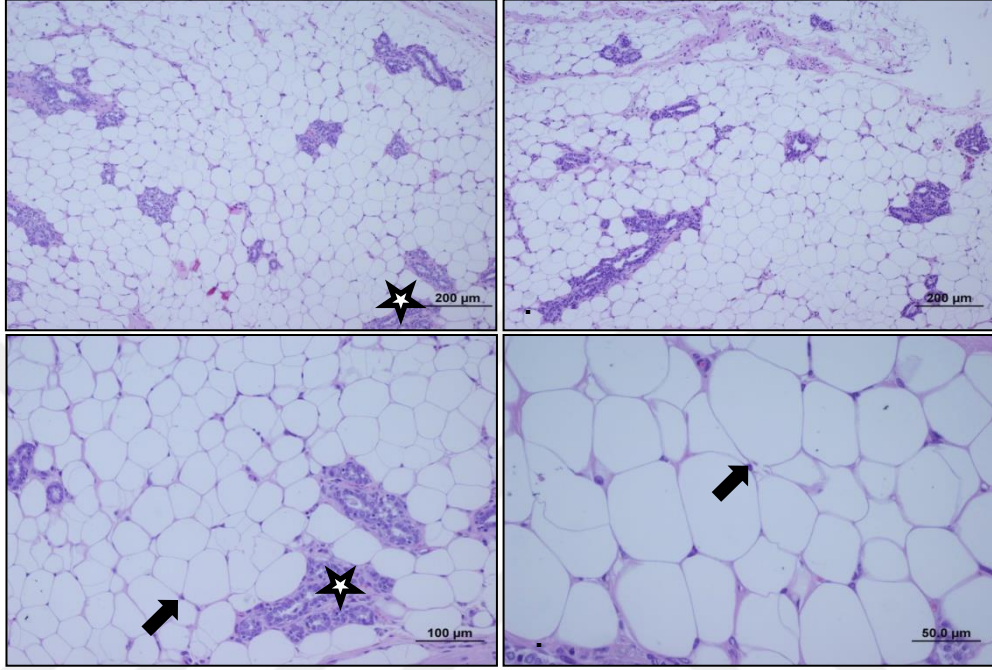
Resim 4.38. C grubu p. o. 98. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücreleri (▶), kistik yapıda yağ hücreleri (●), hücresel infiltrasyon (*) ve vasküler kongesyon (→) dikkat çekmektedir (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE)

Oral Curcumin grubuna ait 98. gün alınan biopsilerin Hematoksilen Eozin boyama ile incelenmesi sonucunda; kist ve vakuol formasyonu gösteren yağ hücrelerinin bulunduğu, hücresel infiltrasyonun az miktarda devam ettiği, kontrol grubuna göre daha fazla sayıda şekil ve bütünlüğü korunmuş adipositlerinde bulunduğu dikkat çekmektedir (Resim 4.39)



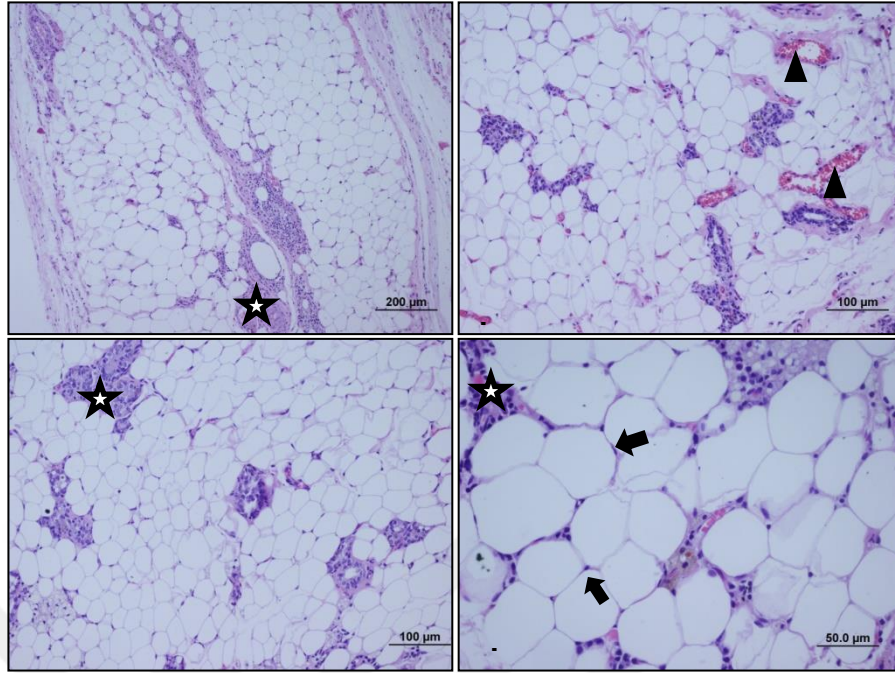
Resim 4.39. OC grubu p. o. 98. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyültmelerdeki mikrograftlarında kistik hücre yapıları ve yağ vakuolleri(↔), hücresel infiltrasyon (*) ve normale yakın bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler (→) görülmektedir. (a-d) (scale bar:200μm (X10), scale bar:100μm (X20), scale bar:50.0μm (X40), HE).

Topikal Curcumin grubuna ait 98. Gün alınan biopsilerin Hematoksilen eozin boyama ile incelenmesi sonucunda; oldukça düzgün bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren yağ hücreleri ve az miktarda hücreyel infiltrasyon ve fibrozis görülmektedir(Resim 4.40)



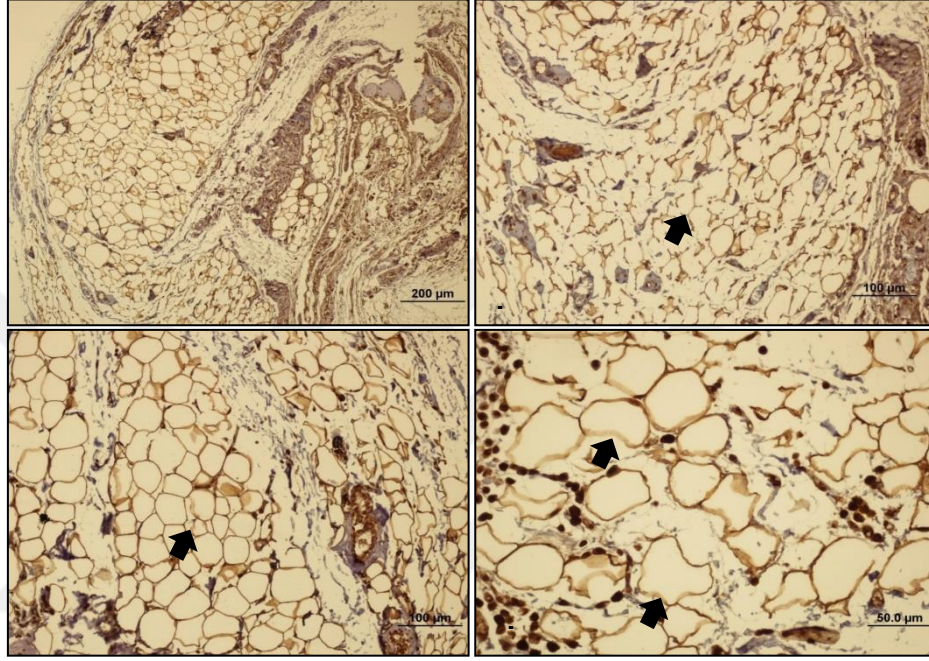
Resim 4.40. TC grubu p. o. 98. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdekimikrograftlarında oldukça düzgün bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren yağ hücreleri (→) ve kısmi infiltrasyon (*) görülmektedir (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

Oral + Topikal Curcumin grubuna ait 98. Gün alınan biopsilerin Hematoksilen eozin boyama ile incelenmesi sonucunda; genellikle düzgün, bütünlüğünü koruyan ve çoğunlukla çekirdek içeren yağ hücreleri ve az miktarda hücreyel infiltrasyon ve fibrozis görülmektedir (Resim 4.41)

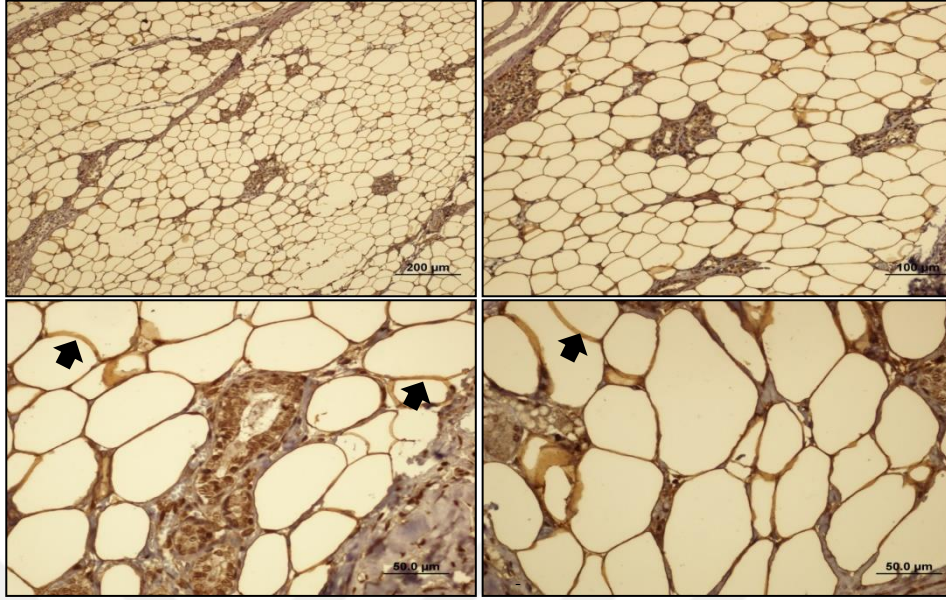


Resim 4.41. OTC grubu p. o. 98. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle normal yapıda bütünlüğünü koruyan ve çekirdek içeren hücreler (→) ve vasküler yapılar (►) gözlenmekle birlikte kısmi infiltrasyon dikkat çekmekte (*) (a-d) (scale bar:200µm (X10), scale bar:100µm (X20), scale bar:50.0µm (X40), HE).

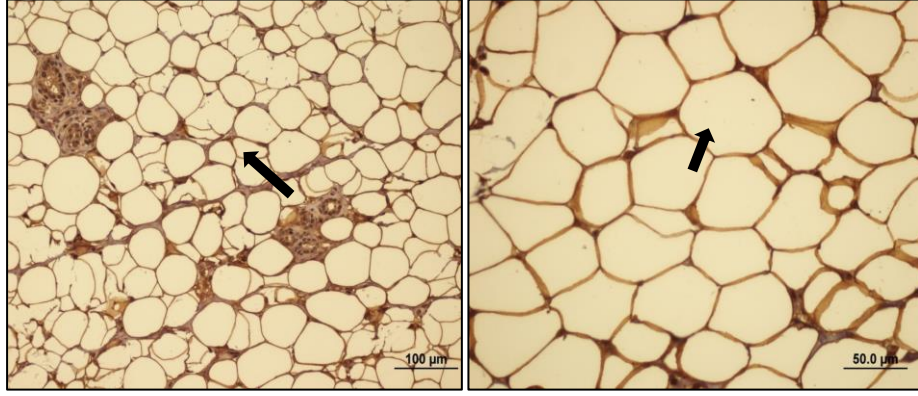
Geç dönem grupların perilipin ile boyamaları aşağıda (Resim 4.42- 4.45) resimlerde gösterilmiştir. Resim alt yazılarından da takip edilebileceği gibi C ve OC gruplarında perilipin ile boyanma canlı adiposit sayıları az olmasından kaynaklı TC ve OTC gruplarına göre daha soluk izlenmiş ve aynı zamanda hücresel infiltrasyonun devam ettiği ve adipoz doku mimarisinin bozulduğu izlenmiştir.



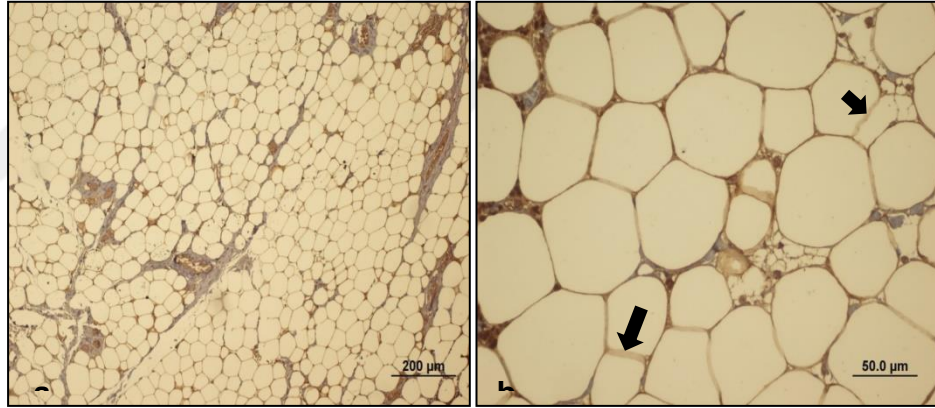
Resim 4.42. C grubu p. o. 98.güngrubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında yaşayabilirliğini yitirmiş, çekirdek içermeyen, yoğun hasarlı ve membran bütünlüğü bozulmuş yağ hücrelerinin perilipinle soluk boyanması dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



Resim 4.43. OC grubu p. o. 98.gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında genellikle perilipin pozitifboyanma gözlenmekle birlikte az miktarda membran bütünlüğü bozulmuş bazı yağ hücrelerinin perilipinle soluk boyanması dikkat çekmekte (→) (a-d) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



Resim 4.44. TC grubu p. o. 98. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında yağ hücrelerinin perilipin pozitif boyanması dikkat çekmekte (→) (a,b) (scale bar:100 µm (X20), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).



Resim 4.45. OTC grubu p. o. 98. gün grubuna ait yağ dokularının farklı büyütmelerdeki mikrograftlarında yağ hücrelerinin perilipinle normal boyanmasının yanı sıra bazı hücrelerde ise soluk boyanma dikkat çekmekte (→) (scale bar:200 µm (X10), scale bar:50.0 µm (X40), perilipin).

Tüm biopsi preparatlarının değerlendirilmeleri esnasında Histoloji ve Embriyoloji bölümünce yapılan gözlemsel kriter skorlaması Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3.Gruplarda günlere göre gelişen hücresel hasar, hücresel füzyon, fibrozis, damarlanma (yeni damar oluşumu), hücresel nekroz, konjesyon ve hemoraji skorlamaları. (Skorlama; 0: yok, 1: az, 2: orta, 3: çok)

Gruplar	p.o.	Hücresel dejenerasyon Membran bozulması Kistik hücreler	Hücresel füzyon	Fibrozis	Hücresel İnfiltrasyon	Damarlanma	Hücresel Nekroz	Konjesyon	Hemoraji
Kontrol n: 17	1.gün n: 2	3	3	0	3	0	3	0	2
	4.gün n: 2	3	3	0	3	0	3	3	1
	7.gün n: 2	3	3	1	3	0	3	3	3
	14.gün n: 2	3	3	2	2	0	3	3	1
	98.gün n: 9	2	2	2	2	1	3	2	1
OC n: 18	1.gün n: 2	3	3	0	3	0	2	0	3
	4.gün n: 2	3	2	0	3	1	3	3	1
	7.gün n: 2	2	2	1	3	1	3	2	2
	14.gün n: 2	2	2	1	2	1	3	2	1
	98.gün n: 10	2	2	2	2	1	3	1	0
TC n: 15	1.gün n: 2	2	1	0	2	0	1	0	2
	4.gün n: 2	1	1	1	1	1	2	1	1
	7.gün n: 2	1	0	1	1	2	1	1	0
	14.gün n: 2	1	1	1	1	2	1	1	0
	98.gün n: 7	1	0	1	0	2	1	0	0
OTC n: 16	1.gün n: 2	1	1	0	2	0	1	0	3
	4.gün n: 2	1	1	1	2	1	2	2	2
	7.gün n: 2	1	0	1	1	2	1	2	1
	14.gün n: 2	1	1	1	1	3	1	1	0
	98.gün n: 8	1	0	1	1	2	1	0	0

5. TARTIŞMA

Yağ grefti uygulamaları Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi pratiğinde oldukça sık kullanılmaktadır. Yağ grefti bir çok yazar tarafından ideal dolgu maddesi olarak tanımlanmaktadır^{33,39,49}. Yöntemin en önemli dezavantajı ise uygulandıktan sonra kalıcılığının belirlenememesi ve rezorbsiyon oranlarının yüksek olmasıdır. Son yıllarda yağ grefti elde edilirken uygulanan verimliliği yüksek yöntemlerin tanımlanması, multiplanar ve retrograd verilme tekniklerinin tanımlanması, greft alınmasında ve verilmesinde kullanılan kanül çaplarının ve kanul ucundaki delik çaplarının greft yaşayabilirliği üzerine etkilerinin ortaya konması ile sağ kalım oranları oldukça artırılmıştır^{34,37-39,77}. Çalışmamızda adjuvan olarak curcuminin kullanılması planlanmış olup, anti- inflamatuvar, anti- mikrobiyal, anjiojenik ve adipoz doku üzerinde stress azaltıcı etkilerinin yağ greftinin sağ kalımını artıracığı düşünüldü.

Bitkisel ve doğal ürünlerin kullanımı son yıllarda popülerite kazanmış olup alternatif tıbbi tedavi metodu olarak dünyada kabul görmektedir. Amerika'da 1997 yılında yapılmış bir çalışmada erişkin nüfusun %12'den fazlasının bu ürünlerden faydalandığı saptanmıştır. Bu rakam Avrupa ülkelerinde de benzerdir. Geleneksel Çin Tıbbının ana tedavi edici maddesi olan Ginseng için sadece Amerika'da ilaç, yiyecek ve içecek sektörlerinde yılda yaklaşık 250 milyon dolar harcanılmaktadır⁷⁸

Curcumin, yemeklerde sarı renk veren baharat olarak kullanılan Zerdeçal (hind safranı)'ın içerisinde bulunmaktadır. Tropikal bir bitki olan *Curcuma longa* (Zingiberaceae)'nın sarı tozundan üretilir. Curcumin, uzak doğu toplumlarında özellikle Hint ve Çin geleneksel tıbbında lokal / topikal ve sistemik olarak yaygın şekilde cilt, mide- barsak hastalıkları ve yara iyileşmesinde tedavi amaçlı kullanılmıştır. Bununla birlikte yapılmış olan epidemiyolojik, klinik ve hayvan çalışmaları ile Curcumin'in birçok biyolojik etkisi, moleküler mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır. Curcumin dozaşımında toksik özellik göstermeyen doğal bir maddedir^{57,79}.

Curcumin dozunun ve uygulama yöntemlerinin belirlenmesi için literatür taraması yapılmıştır. Curcuminin oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Literatürde

biyoyaralanım çalışmaları mevcut olup (bknz. Curcumin- Genel bilgiler) adjuvan bir ajan kullanılmadan curcuminin oral verildiği çalışmalarda serum konsantrasyonları saptanabilecek alt limitlerde ve kısa süreli yükseklikler oluşturacak şekilde bulunmuştur⁸⁰. Curcumin polifenolik bir bileşik olup yapılan in- vivo ve in- vitro çalışmalarda sitoplazmik ve nükleer membranlardan pasif diffüzyon ile geçtiği gösterilmiştir²². Çalışmamız bir biyoyaralanım çalışması olmaması ve bahsedilen çalışmalarda kullanılan deney hayvanları ile kullandığımız sıçanların çok benzer genetik ve metabolik özellikleri olması nedeniyle çalışmamızda OC grubunun gavaj sonrasında kanındaki curcuminin ölçümü yapılmamıştır. Curcuminin oral gavaj sonrasında düşük konsantrasyonlarda ve kısa süreli yüksekliklerde serumda bulunması beklenerek bir hafta boyunca, pre- op üç, post- op dört gün **200mg/ kg** dozunda oral curcumin gavajı ile, serumda nano- molar düzeylerde bulunan curcuminin hücrelere diffüzyonu ve bu hücrelerde birikmesini sağlamak planlandı.

Greftlerin alındığı günlerin belirlenmesinde *Eto ve ark.* ve *Kato ve ark.* yaptıkları çalışmalardan faydalanılmıştır^{13,45}. Yağ greftlerinin greftleme işleminden sonra geçirdikleri akut, subakut ve kronik süreçler bu çalışmalar ile ortaya konulmaya çalışılmıştır. Yakın zamanlarda yayınlanan bu iki makalede yağ greftlerinin içerdikleri farklı hücre komponentlerinin iskemiye dayanma sürelerinin farklı olduğu ortaya konmuştur^{13,45}. Bu çalışmalara göre yağ greftleri içerisindeki olgun adipositler ilk 24 saat içerisinde vasküler bir yatakla temas halinde olmadıkları, diffüzyon ile beslenemedikleri takdirde nekroza gitmişler veya apoptoza yönelmişlerdir. Adipoz doku kaynaklı stromal fraksiyon hücrelerinin 72 saate kadar iskemiye dayanabildikleri aynı çalışmalarda ortaya konulmuştur. Üçüncü gün bittiğinde greftin çevresinde (kurtulan zon) yaşayan olgun adipositler haricinde tüm olgun adipositlerde nekroz izlenmiş, greftin santralinde tüm hücrelerde nekroz izlenmiş ve bunu santral zona yoğun inflamatuvar hücre göçü takip etmiştir. Arada kalan “rejenerasyon zon”unda da olgun adipositlerin tamamında nekroz görülmüş, “kurtulan zon” ve “rejenerasyon zon”unda dördüncü günden itibaren izlenen, yedinci ve on dördüncü günler aralığında maksimum seviyeye ulaşan; iskemiye dirençli olan pre- adipositlerin ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin adipositlere farklılaşmalarıyla gelişen rejenerasyon sürecinin başladığı ortaya konmuştur^{13,45}. Bu nedenlerle çalışmamızda yağ grefti uygulamalarını takiben 1. , 4. , 7. , 14. ve 98.

günlerde biopsiler alınarak tanımlanan süreçlerde curcuminin bir adiposit ve pre-adipositlerin hücre bütünlüğü ve greft dokusunun genelinde faydalı bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Özellikle kurtulan zon – rejenerasyon zonu bileşkesinde (greft periferi) yoğunlaşan TC ve OTC uygulanan gruplarda erken dönem histoloji ve immunohistokimyasal açıdan yapılan incelemelerde; hücresel dejenerasyonun (kist ve vakuol formasyonları), hücre nekrozunun, hücresel (PMNL) infiltrasyonun, fibrozisin, konjesyonun ve hemorajinin C ve OC gruplarına göre daha az, **perilipin +** hücre yoğunluğunun ve damarlanmanın ise daha fazla olduğu saptanmıştır.

OC verilen grupların istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da C grubuna göre yağ greftlerinin sağ kalımında az bir artış saptanmıştır. Curcuminin oral verildiğinde kanda çok düşük plazma konsantrasyonlarında saptanması- yani curcuminin adjuvan bir molekül ile kullanılmadığında dokulara yeterince ulaşacak serum konsantrasyonlarına çıkamaması ve uzun sürelerde bu serum konsantrasyonlarında kalamayacak bir yapıda olması oral kullanımında etkinliğinin düşük olmasının nedenleri olarak sayılabilir. Sıçanlarda curcumin için yapılan oral biyoyararlanım çalışmalarına ait *Munjal ve ark* yaptıkları bir çalışmada oral olarak 50 mg/ kg dozunda verilen curcuminin maksimum plazma konsantrasyonu 48.dakikada ölçülmüş, 28.9 ng/ ml düzeylerinde bulunmuş takip eden 2. saatte saptanamayan düzeylere düşmüştür⁵⁸. Çalışmamızda 200mg/ kg oral curcumin uygulanmıştır. Tahminen nanomol düzeylerinde kanda bulunan curcumin yağ greftlerinin sağ kalımına anlamlı ölçüde bir etki gösterememiştir.

Zing ve ark. curcuminin hipolipidemik etkileri üzerine yaptıkları çalışmada; curcuminin adipositlerde, palmitattan zengin ortamlarla yaratılan endoplazmik retikulum stressini hücre içinde anti- oksidan mekanizmaların yenilenmesine sağladığı katkılar nedeniyle azalttığı ve dolayısıyla adipositlerin yaşayabilirliğini ve stress ile baş etme mekanizmalarının etkinliğini arttırdığını ortaya koymuşlardır. . Pro- inflamatuvar sitokinlerin (TNF- alfa, IL- 1, IL- 12, IFN- gamma) salınımını nükleer faktor K β (NF- KB) gen inhibisyonu ile azaltarak ve lökosit adezyon molekülleri ve antijen prezente eden hücrelerin membran proteinlerinin sentezini (ICAM- 1, VCAM- 1, E- seletin) NF- KB ile B- lenfosit Kappa hafif zincir polipeptid gen indukleyicisinin nükleer faktör inhibitörü (IKK) ile bağlanmasını

engelleme yoluyla azaltarak gerçekleştirir. Aynı zamanda araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz- 2 (COX-2), lipoksijenaz (LOX) ve fosfolipaz A2, C ve D enzimlerini inhibe ederek inflamatuvar mediatorler olan TXA₂, PGE₂, LTB₄, LTC₄ ve araşidonik asit prekürsörlerinin oluşumunu azaltır (Δ 5 desaturaz enzim inhibisyonu ile). Böylece antiinflamatuvar etkinliğe katkı sağlar. Ek olarak proteolitik enzimlerin (kollejenaz, elastaz, matrix metalloproteinaz) aktivitelerinde inhibe ederek inflamatuvar mekanizmaları neredeyse tüm basamaklarında inhibe eder.¹⁵ Bu özelliklerinin yanında *Kant ve ark* diabetik sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada sıçanların sırtında oluşturdukları bir yara modelinde, yara üzerine curcuminli bir jel uygulamasını takiben üçüncü, yedinci ve on dördüncü günlerde insizyonlardan alınan biopsilerde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde kontrol grubuna göre damarlanmayı, granülasyon dokusunu ve yara kontraksiyon hızını, histolojik kesit alanlarındaki fibroblast proliferasyonunu artırdığını ve sonuç olarak yara iyileşmesine anlamlı ölçüde katkı sağladığını ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada curcuminin özellikle tümoral dokularda anjiogenezi inhibe ettiğine dair bulguların olduğu ve curcuminin tümör dışı dokularda anjiogenez üzerine artırıcı yönde etkilerinin olduğu belirtilmiştir¹⁶. *Ferguson B. ve ark* curcuminin sitoplazmik membrandan pasif difüzyon ile geçebilmesinin yanında nükleer membrandan da pasif difüzyon ile geçebildiğini ve membranlarda ve hücre içinde curcumin birikimini çalışmalarında göstermişlerdir. Nükleer membrandan difüze olan curcumin genlerin post-transkripsiyonel modifikasyonlarında ve m-RNA'ların post-translasyonel modifikasyonlarında hücre çekirdeği içindeki enzim ve protein yapılar ile etkileştiği gösterilmiştir⁷⁵.

Kontrol (C) ve OC grubuna göre uzun dönemde yağ greftlerinin hacimlerindeki azalma TC uygulanan gruplara göre anlamlı ölçüde fazla gerçekleşmiştir. Topikal 1 mg/ 1 cc curcumin uygulanmasını takip eden on dördüncü günden önce alınan erken dönem biopsilerinin tamamında makroskopik olarak curcuminin sarı- turuncu pigmentli tozu greft çevresini saran kapsül içinde gözlenmiştir. Çalışmamızda TC ve OTC gruplarında erken dönem alınan biopsilerde hücre bütünlüğü daha iyi korunmuş adipositlerin dokularda hakim olduğu, kurtulan ve rejenerasyon zonlarında **perilipin** + boyanan hücrelerin daha belirgin bulunduğu, C ve OC gruplarına göre yeni damar oluşumunun daha fazla olduğu, inflamatuvar

hücre göçünün TC ve OTC gruplarında C ve OC gruplarına oranla belirgin miktarda az olduğu görülmüştür. Geç dönem sonuçlarda ise TC ve OTC gruplarından alınan biopsilerin mikroskopik incelemelerinde kist vakuol formasyonlarının, fibrotik dokuların C ve OC gruplarına göre daha az, bütünlüğü korunmuş adipositlerin ve yeni damar oluşumunun ise daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar altında curcuminin iskemik süreçten geçeny yağ greftinin sağ kalımına katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu yapılan çalışmalar ile birlikte curcuminin özellikleri ele alındığında, yağ grefti uygulamamızda sonuca olan anlamlı katkısının önemli ölçüde neovaskularizan- anjiogenik, anti- inflamatuvar, anti- oksidan ve adipositler üzerinde stressi azaltıcı etkilerinden kaynaklandığını düşündük.

Curcumin yağ yapısında bir molekül olduğundan ancak DMSO (Di- metil sulfoksit) veya alkol kullanımı ile homojen bir solusyon elde edilebilmektedir. Hem DMSO hem alkol in- situ ortamda hücreler üzerine toksik etkileri iyi bilinen çözücüler olduğundan çalışmamızda bu ajanları kullanmamayı tercih ettik. Curcumin direk toz halinde in- vivo uygulamak gibi bir yöntem literatür taramamızda bulunamamıştır. Urdzikova ve ark. curcuminin omurilik hasarında tedavi edici özelliklerini ortaya koydukları çalışmalarında curcumin zeytinyağı içinde çözerek omurilik hasarı oluşturdukları alana 60mg/ kg/ ml uygulamışlar ve takibinde intraperitoneal idame ettirmişlerdir.⁸¹ Çalışmamızda histolojik kriterlerde “yağ kist ve vakuollerinin oluşumu” da bulunduğu zeytinyağını taşıyıcı olarak kullanmanın bu kriter üzerinde olumsuz etkisi olabileceği düşünüülerek herhangi bir taşıyıcı kullanılmamış, curcumin direk toz halinde uygulanmıştır. Hassas tartı ile 1mg/ 1cc curcumin toz olarak greft çevresine uygulandığında flep altında- greft çevresinde oluşacak eksuda- transuda içinde çözünerek hücre membranlarından pasif diffüzyon ile geçebileceği düşünüldü. Yağda iyi çözünen bir madde olduğundan greft çevresine uygulandığında greft yaşayabilirliğini olumsuz yönde etkileyecek bir bariyer oluşturma ihmal edilebilir düzeyde olacağını düşündük. Erken dönem için yapılan histolojik ve immunohistokimyasal boyama yöntemlerinin ve geç dönemde yapılan ağırlık- volüm değişim ölçümlerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde topikal uygulanan 1 mg/ ml curcuminin C ve OC grubuna göre anlamlı ölçüde sağ kalıma katkı sağladığını ortaya koydu.

Kim ve ark curcuminin pre- adiposit- adiposit farklılaşması üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada curcuminin doz bağımlı olarak adiposit farklılaşmasını azalttığını ortaya koymuşlardır. In vitro 3T3- L1 fare ve insan pre- adiposit hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada $>15 \mu\text{M}$ curcumin konsantrasyonunun ortamda bulunmasının doz bağımlı ve doğru orantılı olarak anlamlı ölçüde adipositlerin farklılaşmalarını azalttığını ve aynı zamanda curcuminin ortamda bulunduğu günlere göre (farklılaşmanın gerçekleştiği hücre bölünme aşamaları G1- S- G2- M safhaları) adiposit farklılaşmasının farklı oranlarda curcumin tarafından inhibe edildiğini ortaya koymuşlardır²². Yapılan çalışma in- vitro bir çalışmadır. Curcumin in- vitro izole pre- adiposit kültürlerinde doz ve zaman bağımlı farklılaşmayı azaltıcı etki göstermiş olsa da yağ grefti uygulaması sonrası greftin geçirdiği süreçler izole adiposit kültürlerinden çok farklıdır. İnflamasyonun dengelenmesi, anti- apopitotik ve anti- oksidan mekanizmaların etkili ve fazla çalışması yönünde curcuminin neden olduğu olumlu etkiler yağ greftinin aktarıldığı dokuda daha fazla miktarlarda sağ kalımında etkili olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Curcuminin, 1mg/ 1ml yağ grefti üzerine topikal uygulanması, yağ greftlerinin sağ kalımında istatistiksel olarak anlamlı artış sağladığı saptanmıştır.

TC ve OTC uygulanan gruplarda erken dönem histoloji ve immunohistokimyasal incelemelerde; hücresel dejenerasyonun (kist ve vakuol formasyonları), hücre nekrozunun, hücresel (PMNL) infiltrasyonun, fibrozisin, konjesyonun ve hemorajinin C ve OC gruplarına göre daha az, damarlanmanın ise daha fazla olduğu saptanmıştır. Makroskopik olarak yapılan ölçümlerde TC ve OTC gruplarında ağırlık ve volum azalmasının C ve OC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha az olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda geç dönem (98. gün) makroskopik görünümde topikal curcumin uygulanan grupların yağ greftlerinin daha yuvarlak, canlı sarı renkte olduğu ve daha fazla damarlandığı gözlenmiştir.

Curcuminin hücre içinde anti- apopitotik ve anti- oksidan özellikleri, hücre dışında anti inflamatuvar ve anjiogenik özellikleri nedeniyle sağ kalıma katkı sağladığını düşündük. Daha detaylı in- situ biyokimyasal ölçümlerin yapıldığı benzer bir yöntem ile yapılacak çalışmalarda greft sağ kalımı esnasında curcuminin hücre içinde ve çekirdeğinde rol aldığı moleküler- biyokimyasal olayların ortaya konulması greft sağ kalımında etkili yeni yolların gösterilmesi açısından faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Hamed S, Egozi D, Kruchevsky D, Teot L, Gilhar A, Ullmann Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e13986.
2. Khater R, Atanassova P, Anastassov Y, Pellerin P, Martinot-Duquennoy V. Clinical and experimental study of autologous fat grafting after processing by centrifugation and serum lavage. *Aesthetic plastic surgery*. Jan 2009;33(1):37-43.
3. Kuramochi D, Unoki H, Bujo H, et al. Matrix metalloproteinase 2 improves the transplanted adipocyte survival in mice. *Eur J Clin Invest*. Oct 2008;38(10):752-759.
4. Medina MA, 3rd, Nguyen JT, Kirkham JC, et al. Polymer therapy: a novel treatment to improve fat graft viability. *Plastic and reconstructive surgery*. Jun 2011;127(6):2270-2282.
5. Minn KW, Min KH, Chang H, Kim S, Heo EJ. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts. *Aesthetic plastic surgery*. Oct 2010;34(5):626-631.
6. Park B, Kong JS, Kang S, Kim YW. The effect of epidermal growth factor on autogenous fat graft. *Aesthetic plastic surgery*. Oct 2011;35(5):738-744.
7. Por YC, Yeow VK, Louri N, Lim TK, Kee I, Song IC. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. Aug 2009;62(8):1030-1034.

8. Pu LL, Coleman SR, Cui X, Ferguson RE, Jr., Vasconez HC. Cryopreservation of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique. *Ann Plast Surg.* Mar 2010;64(3):333-337.
9. Sezgin B, Ozmen S, Bulam H, et al. Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS.* May 2014;67(5):712-720.
10. Son D, Oh J, Choi T, et al. Viability of fat cells over time after syringe suction lipectomy: the effects of cryopreservation. *Ann Plast Surg.* Sep 2010;65(3):354-360.
11. Thanik VD, Chang CC, Lerman OZ, et al. A murine model for studying diffusely injected human fat. *Plastic and reconstructive surgery.* Jul 2009;124(1):74-81.
12. Peer LA. Cell survival theory versus replacement theory. *Plastic and reconstructive surgery (1946).* Sep 1955;16(3):161-168.
13. Eto H, Kato H, Suga H, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. *Plastic and reconstructive surgery.* May 2012;129(5):1081-1092.
14. Bartynski J, Marion MS, Wang TD. Histopathologic evaluation of adipose autografts in a rabbit ear model. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* Apr 1990;102(4):314-321.
15. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(2):97-111.

16. Kant V, Gopal A, Kumar D, et al. Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. *J Surg Res.* Feb 2015;193(2):978-988.
17. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* Oct 22 2014;116(1):1-7.
18. Zingg JM, Hasan ST, Meydani M. Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors.* Jan-Feb 2013;39(1):101-121.
19. Zhang DW, Fu M, Gao SH, Liu JL. Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:636053.
20. Thangapazham RL, Sharad S, Maheshwari RK. Skin regenerative potentials of curcumin. *Biofactors.* Jan-Feb 2013;39(1):141-149.
21. Aggarwal BB, Yuan W, Li S, Gupta SC. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Mol Nutr Food Res.* Sep 2013;57(9):1529-1542.
22. Kim CY, Le TT, Chen C, Cheng JX, Kim KH. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J Nutr Biochem.* Oct 2011;22(10):910-920.
23. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic.* Jun 2009;14(2):141-153.
24. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Hormone molecular biology and clinical investigation.* Feb 24 2016.

25. Yuan Y, Gao J, Ogawa R. Mechanobiology and Mechanotherapy of Adipose Tissue-Effect of Mechanical Force on Fat Tissue Engineering. *Plastic and reconstructive surgery. Global open*. Dec 2015;3(12):e578.
26. Young B HJ. *Weather's functional histology a text and color atlas. 4th edition*2000.
27. Alexaki VI, Chavakis T. The role of innate immunity in the regulation of brown and beige adipogenesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. Feb 24 2016.
28. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. Dec 2002;13(12):4279-4295.
29. Tanzi MC, Fare S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert review of medical devices*. Sep 2009;6(5):533-551.
30. Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, et al. Stem cells, mature adipocytes, and extracellular scaffold: what does each contribute to fat graft survival? *Aesthetic plastic surgery*. Dec 2011;35(6):1061-1072.
31. P. B. Contribution a l'étude def greffes adipeuses. *Bull Acad R Med Belgique*. 1919(28):440.
32. Chajchir A, Benzaquen I. Liposuction fat grafts in face wrinkles and hemifacial atrophy. *Aesthetic plastic surgery*. 1986;10(2):115-117.
33. Chajchir A, Benzaquen I. Fat-grafting injection for soft-tissue augmentation. *Plastic and reconstructive surgery*. Dec 1989;84(6):921-934; discussion 935.

34. Fournier PF. Why the syringe and not the suction machine? *The Journal of dermatologic surgery and oncology*. Oct 1988;14(10):1062-1071.
35. Klein JA. The tumescent technique. Anesthesia and modified liposuction technique. *Dermatologic clinics*. Jul 1990;8(3):425-437.
36. Klein JA. Tumescent technique for local anesthesia improves safety in large-volume liposuction. *Plastic and reconstructive surgery*. Nov 1993;92(6):1085-1098; discussion 1099-1100.
37. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic plastic surgery*. Sep-Oct 1995;19(5):421-425.
38. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clinics in plastic surgery*. Apr 1997;24(2):347-367.
39. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plastic and reconstructive surgery*. Sep 2006;118(3 Suppl):108s-120s.
40. Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem cells international*. 2016;2016:3206807.
41. Bae YC, Song JS, Bae SH, Kim JH. Effects of human adipose-derived stem cells and stromal vascular fraction on cryopreserved fat transfer. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*. May 2015;41(5):605-614.
42. Mailey B, Hosseini A, Baker J, et al. Adipose-derived stem cells: methods for isolation and applications for clinical use. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2014;1210:161-181.

43. Kim WS, Park BS, Sung JH. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert opinion on biological therapy*. Jul 2009;9(7):879-887.
44. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1990;85(3):378-386; discussion 387-379.
45. Kato H, Mineda K, Eto H, et al. Degeneration, regeneration, and cicatrization after fat grafting: dynamic total tissue remodeling during the first 3 months. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 2014;133(3):303e-313e.
46. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *The Laryngoscope*. Aug 2000;110(8):1333-1338.
47. Locke MB, de Chalain TM. Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Ann Plast Surg*. Jan 2008;60(1):98-102.
48. Cervelli V, Palla L, Pascali M, De Angelis B, Curcio BC, Gentile P. Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. *Aesthetic plastic surgery*. Sep 2009;33(5):716-721.
49. Coleman SR, Saboeiro AP. Primary Breast Augmentation with Fat Grafting. *Clinics in plastic surgery*. Jul 2015;42(3):301-306, vii.
50. Groen JW, Negenborn VL, Twisk DJ, et al. Autologous fat grafting in oncologic breast reconstruction: A systematic review on oncological and radiological safety, complications, volume retention and patient/surgeon

satisfaction. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. Mar 29 2016.

51. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. Nov-Dec 2007;4(6):807-818.
52. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian journal of experimental biology*. Jan 1980;18(1):73-75.
53. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer research*. Jul-Aug 2001;21(4b):2895-2900.
54. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica*. May 1998;64(4):353-356.
55. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International journal of pharmaceutics*. Feb 7 2007;330(1-2):155-163.
56. Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP, Gescher AJ. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. Jul 2007;60(2):171-177.
57. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS.

Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. Jun 15 2007;853(1-2):183-189.

58. Munjal B, Pawar YB, Patel SB, Bansal AK. Comparative oral bioavailability advantage from curcumin formulations. *Drug Deliv Transl Res.* Aug 2011;1(4):322-331.
59. Li L, Braithel FS, Kurzrock R. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer.* Sep 15 2005;104(6):1322-1331.
60. Liu A, Lou H, Zhao L, Fan P. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* Feb 24 2006;40(3):720-727.
61. Srimal RC, Dhawan BN. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* Jun 1973;25(6):447-452.
62. Sharma OP. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical pharmacology.* Aug 1 1976;25(15):1811-1812.
63. Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer letters.* Nov 1985;29(2):197-202.
64. Jordan WC, Drew CR. Curcumin--a natural herb with anti-HIV activity. *Journal of the National Medical Association.* Jun 1996;88(6):333.
65. Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer research.* Nov-Dec 2002;22(6c):4179-4181.

66. Kim MK, Choi GJ, Lee HS. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *Journal of agricultural and food chemistry*. Mar 12 2003;51(6):1578-1581.
67. Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N, Oshima Y, Hikino H. Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes. *Planta medica*. Nov 1983;49(3):185-187.
68. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *British journal of pharmacology*. Jan 2000;129(2):231-234.
69. Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British journal of pharmacology*. Jun 1998;124(3):425-427.
70. Wongcharoen W, Phrommintikul A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *International journal of cardiology*. Apr 3 2009;133(2):145-151.
71. Srinivasan M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. *Indian journal of medical sciences*. Apr 1972;26(4):269-270.
72. Lone J, Choi JH, Kim SW, Yun JW. Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes. *J Nutr Biochem*. Jan 2016;27:193-202.
73. Wang S, Wang X, Ye Z, et al. Curcumin promotes browning of white adipose tissue in a norepinephrine-dependent way. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 16 2015;466(2):247-253.
74. Lulu Wang, Bangling Zhang, Fang Huang, Baolin Liu, Yuan Xie Curcumin inhibits lipolysis via suppression of endoplasmic reticulum stress in adipose tissue and prevents hepatic insulin resistance.

75. Ferguson BS, Nam H, Morrison RF. Curcumin Inhibits 3T3-L1 Preadipocyte Proliferation by Mechanisms Involving Post-transcriptional p27 Regulation. *Biochemistry and biophysics reports*. Mar 1 2016;5:16-21.
76. Gu Q, Cai Y, Huang C, Shi Q, Yang H. Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. *Pharmacognosy magazine*. Jul 2012;8(31):202-208.
77. Fournier PF, Otteni FM. Lipodissection in body sculpturing: the dry procedure. *Plastic and reconstructive surgery*. Nov 1983;72(5):598-609.
78. Foster BC, Arnason JT, Briggs CJ. Natural health products and drug disposition. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005;45:203-226.
79. Helson L. Curcumin (diferuloylmethane) delivery methods: a review. *Biofactors*. Jan-Feb 2013;39(1):21-26.
80. Metzler M, Pfeiffer E, Schulz SI, Dempe JS. Curcumin uptake and metabolism. *Biofactors*. Jan-Feb 2013;39(1):14-20.
81. Machova Urdzikova L, Karova K, Ruzicka J, et al. The Anti-Inflammatory Compound Curcumin Enhances Locomotor and Sensory Recovery after Spinal Cord Injury in Rats by Immunomodulation. *International journal of molecular sciences*. Dec 31 2015;17(1).

