

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA ABOBOTULİNUMTOXİN-A ENJEKSİYONLARININ
DERİ ÜZERİNDEKİ UZUN SÜRELİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. ALİ SADIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. OSMAN LATİFOĞLU

ANKARA
HAZİRAN 2020

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA ABOBOTULİNUMTOXİN-A ENJEKSİYONLARININ
DERİ ÜZERİNDEKİ UZUN SÜRELİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ALİ SADIOĞLU

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. OSMAN LATİFOĞLU**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2020-01 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
HAZİRAN 2020**

ONAY



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Ali SADIOĞLU
Baba Adı	Şuca
Doğum Yeri / Tarihi	Diyarbakır 30/10/1988
Diploma Tarihi / Diploma No	16/07/2013 / 2013-09-0119 165525
Mezun Olduğu Fakülte	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 5 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Ratlarda Abobotulinumtoxin A Enjeksiyonlarının Deri Üzerindeki Uzun Süreli Etkilerinin Araştırılması

JÜRİ KARARI: JÜRİ TEZİ ONAYLAMISHTIR. TEZ BAŞARILI BULUNMUŞTUR. UZMANLIK SINAVINA GİRMEYE HAK KAZANMIŞTIR.

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN
Prof. Dr. Şeyhan ÇENETOĞLU
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı Başkanı

ÜYE

Prof. Dr. Osman LATİFOĞLU
Plastik, Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

ÜYE

Doç. Dr. Burak KAYA
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Botulinum Toksini	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Botulinum Toksinin Farmakolojik Özellikleri.....	6
2.1.3. Botulinum Toksinin Etki Mekanizması	9
2.1.4. Botulinum Toksinin Deri Üzerindeki Etkisi	12
2.1.5. İmmünojenite	14
2.1.6. Botulinum Toksinin Endikasyonları, Dikkat Edilmesi Gereken Durumlar Ve Yan Etkileri	15
2.2. Deri Yapısı	17
2.2.1. Epidermis	19
2.2.2. Deri Ekleri.....	23
2.2.3. Dermis	24
2.2.4. İnsan ve Ratlar Arasında Deri Yapısındaki Farklar	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gruplar ve Açıklamaları.....	31
3.2. Botulinum Toksininin Hazırlanması.....	32
3.3. Enjeksiyon Yöntemi.....	34
3.4. Histolojik Değerlendirme.....	37
3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	38
3.6. İstatistiksel Analiz.....	39

4. BULGULAR.....	40
4.1. Makroskopik Bulgular ve Klinik Gözlem.....	40
4.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	41
4.2.1. Epidermis Kalınlığı	42
4.2.2. Dermis Kalınlığı.....	44
4.2.3. Hipodermis Kalınlığı.....	45
4.2.4. P. carnosus Kalınlığı	45
4.2.5. Hipodermis Kollajen Yüzdesi	47
4.2.6. Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 Oranı	48
4.2.7. Kıl Uzunluğu	51
4.2.8. Kıl Folikülü Sayısı	52
4.2.9. Sebace Bez Alanı.....	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	62
7. ÖZET	63
8. SUMMARY	65
9. KAYNAKLAR	67
10.ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	Nörotoksin zincirinin proteolitik aktivasyonu	8
Şekil 2.2:	Farklı BT serotiplerinin hedef aldığı SNARE proteinleri.....	10
Şekil 2.3:	Derinin kesitsel yapısı.....	18
Şekil 2.4:	Epidermisin tabakaları	20
Şekil 2.5:	Derinin damarsal yapısı.	28
Şekil 2.6:	Rat derisinin histolojik görüntüsü.....	30
Şekil 3.1:	Abobotulinumtoxin A preparatı Dysport® (Ipsen Limited, Wrexham, UK).....	33
Şekil 3.2:	Rat sırtında enjeksiyon yapılacak bölgenin işaretlenmesi.	35
Şekil 3.3:	0,5ml Fine Micro Syringe™, Feel Tech Bio Co. Ltd, Korea	35
Şekil 3.4:	Kıl kökünün mikroskop altında görüntüsü.	36
Şekil 3.5:	Enjeksiyon bölgesinden histolojik inceleme için alınan doku örnekleri.	36
Şekil 4.1:	Grup 2 (Kontrol Grubu-1) den bir deneğin deney sonlanımında tıraş sonrası görünümü.	40
Şekil 4.2:	Grup 3 (Deney Grubu-2)'den bir deneğin 6.ayda tıraş öncesi görünümü.	40
Şekil 4.3:	K-1(A), D-1(B), K-2 (C), D-2(D) gruplarından örneklerle ait mikrograflar (Hematoksilen eozin).....	43
Şekil 4.4:	Epidermis kalınlığını(mm) gösteren grafik.....	43
Şekil 4.5:	Dermis kalınlığını(mm) gösteren grafik.	44
Şekil 4.6:	P. carnosus kalınlığını(mm) gösteren grafik.....	46
Şekil 4.7:	K-1(A), D-1(B), K-2 (C), D-2(D) gruplarından örneklerle ait mikrograflar (Masson'un üçlü boyası).....	47
Şekil 4.8:	Hipodermis kollajen yüzdesi(%) gösteren grafik.....	48
Şekil 4.9:	K-1(A), D-1(B), K-2 (C), D-2(D) gruplarından örneklerle ait mikrograflar (Kollajen tip 1 immünohistokimyasal boyama).....	50
Şekil 4.10:	Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 oranlarını gösteren grafik.....	50

Şekil 4.11: Kontrol1(A), deney 1(B), kontrol2 (C), deney 2(D) gruplarından örneklerle ait mikrograflar (Kollajen tip 3 immünohistokimyasal boyama)	51
Şekil 4.12: Kıl uzunluklarını (mm) gösteren grafik	52
Şekil 4.13: mm2 de kıl folikülü sayısını gösteren grafik	53
Şekil 4.14: Sebase bez alanı/dermis alanı oranlarını gösteren grafik.....	55



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1:	Farklı BT preparatlarının özellikleri.....	7
Tablo 3.1:	Deney Grupları ve yapılan işlemler	32
Tablo 4.1:	Tüm Gruplar için tanımlayıcı istatistikler.....	41
Tablo 4.2:	Epidermis kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	44
Tablo 4.3:	Dermis kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	45
Tablo 4.4:	Hipodermis kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	45
Tablo 4.5:	P. carnosus kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	46
Tablo 4.6:	Hipodermis kollajen yüzdesine göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	48
Tablo 4.7:	Hipodermis Kollajen-1/3 oranına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	49
Tablo 4.8:	Kıl uzunluğuna göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	52
Tablo 4.9:	Birim alanda (mm ²) kıl folikülü sayısına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	53
Tablo 4.10:	Sebase bez alanı/dermis alanı oranlarına göre gruplar arası karşılaştırmalar.....	54

1. GİRİŞ

Güzellik algısı her ne kadar kişiler arasında farklılık gösterse de, zamana, cinsiyete, kültüre ve yaşa bağlı değişkenlik gösteren toplumsal bir güzellik algısından da söz edilebilir. Güzellik tarih boyunca sağlıklı olma ve gençlik kavramlarıyla paralel değerlendirilmiş, sağlık ve gençlik işaretleri gösteren kişiler daha güzel kabul edilmiştir. İnsanlarda gençlik ve güzelliklerini koruma, daha uzun süre devam ettirme isteği yine tarih boyunca görülen bir olgudur.

Gençlik ve güzelliğin en belirgin işaretleri yüz bölgesinde bulunur. Yüz bölgesindeki anatomik yapıların şekilleri, boyutları ve orantılı olmasının yanı sıra deri yapısı da bu işaretlerin en önemlilerinden biridir. Parlak, gergin, kırışıklıkların az olduğu bir deri yapısı güzellik ve gençliğe işaret eder. Yaşlanmayla beraber gerek deri dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikler ve dış etmenlerin etkisiyle bu özelliklerini kaybeder ve kırışıklıkların arttığı bir hal alır. Kırışıklıkların çeşitli tedavi yöntemleriyle azaltılması, güzelliğin yeniden kazanılması ve idame ettirilmesi için talep edilmektedir. Ayrıca bu tedavi yöntemleri kırışıkların önlenmesi için de kullanılmaktadır.

Bu amaca yönelik tedaviler temel olarak cerrahi ve cerrahi olmayan estetik işlemler olarak sınıflandırılabilir. Cerrahi olmayan yöntemler uygulama kolaylığı, hastane yatışı gerektirmemesi, işlem sonrasında günlük hayata ve işe dönüş için süre gerektirmemesi avantajlarıyla her geçen gün daha çok talep görmektedir.

Botulinum nörotoksini (BT), *Clostridium botulinum* adlı bir bakteri tarafından üretilen, kas-sinir kavşağında asetilkolin salınımını bloke eden güçlü bir

toksindir. Yedi farklı serotipi bulunan botulinum nörotoksini, 1970’li yıllardan itibaren çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Nörojenik mesane, şaşılık, bruksizm ve kas distonileri gibi başlıca hastalıkların tedavisinde kullanımının yanı sıra, plastik cerrahi pratiğinde yüzdeki kırışıklıkların giderilmesi, fasiyal distoniler, migren tedavisi, palmar ve aksiller hiperhidrozis tedavilerinde kullanılmaktadır (1). Farklı ticari formlarda Tip A nörotoksin ürünleri mevcut olmakla beraber Onabotulinumtoxin A (BOTOX, Allergan Inc., Irvine, CA) ve Abobotulinumtoxin A (Dysport, Ipsen Limited., Wrexham, UK) ülkemizde de sıklıkla kullanılan, istenmeyen etkileri düşük ve güvenliği yüksek formlarıdır.

Amerika’da tüm estetik işlemler arasında BT enjeksiyonları 1999 yılından beri birinci sırayı almaktadır. 2019 yılında Amerika’da BT uygulanan hasta sayısı, 2015 yılına göre %17,8 artış göstererek 1,7 milyonun üzerine çıkmıştır. Bu işlemlerin %15,3 ü ise 35 yaşından genç hastalara uygulanmıştır (2).

BT uygulamalarının etki süresinin 3 ila 5 ay arasında olması, elde edilen etkinin devamı için tekrar edilen uygulamaları zorunlu kılmaktadır (3). Ciltte yaşlanma belirtilerinin oluşmadan önlenmesi isteği BT uygulamalarının daha genç yaşlarda tercih edilmesine neden olmaktadır. Bu iki etmen nedeniyle BT uygulamaları uzun yıllar boyunca devam etmektedir.

Uzun süreli tedavilerin deri üzerindeki etkileri literatürde etkinlik, güvenilirlik ve tekrar edilebilirlik açısından araştırılmış olmasına rağmen, yapısal değişiklikler konusunda eksiklikler bulunmaktadır.

Hipotez: Botulinum n rotoksininin uzun süreli kullanımı deri tabakaları ve deri ekleri üzerinde çeşitli yapısal değişikliklere sebep olmaktadır.

Amaç: İnsanlığı ilk çağlarından beri süregelen genç kalma isteğinin günümüzdeki karşılığı olarak karşımıza çıkan yüz kırışıklıklarının giderilmesi ve oluşmadan engellenmesi isteği, tekrar eden botulinum nörotoksin tedavisi ile kısmen gerçekleştirilebilmektedir. Çalışmamızın amacı uzun süreli botulinum nörotoksin uygulamasının deri yapısında etkilerinin deneysel olarak ortaya koyulması ve bu bilgiler ışığında klinik pratiğin değerlendirilmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botulinum Toksini

Botulinum toksini (BT) gram (+) bir bakteri olan *Clostridium botulinum* tarafından sentezlenen protein yapıda bir ekzotoksindir. Sinir uçlarından asetilkolin salınımını inhibe ederek etki gösteren BT, biyoilaç olarak geliştirilmiş ve birçok alanda tedavi amacıyla kullanılmaya başlamıştır. Biyoilaç olması nedeniyle farklı BT preparatların üretim şekilleri sadece ürünün saflık derecesini değil aynı zamanda stabilitesi, etkinliği, güvenliği, immünojenitesi ve dozajını da etkiler. Formülasyonda bulunan içeriklerin farkı ozmotik gradiyent farkına neden olarak difüzyon özelliklerini de etkileyebilir. Yedi farklı serotipi bulunan BT'nin ticari olarak kullanımda A ve B serotipleri bulunmaktadır. Doz birimleri ünite(U) olarak; 20 g Swiss-Webster farelerin %50'sinde intraperitoneal uygulama sonrası 3 gün içerisinde ölüme neden olan doz (LD₅₀: Lethal Doz) değerlerine göre hesaplanır. Farklı ticari ürünlerin U etkinliği de birbirinden farklıdır (1).

2.1.1. Tarihçe

Botulinum toksinin neden olduğu, kontamine gıdalardan kaynaklanan ve yüksek ölüm oranıyla seyreden, hastalık ilk olarak 18. yy da Almanya'da Muller ve J. Kerner tarafından tanımlandı. Kerner hastalığı olarak da anılan hastalığın yeterince pişirilmemiş sosislerden kaynaklandığı biliniyordu. Etiyolojisi hakkında çeşitli fikirler ortaya atılsa da nedeni tam olarak ortaya konulamamıştı. Belçikalı

mikrobiyolog van Ermengem tarafından 1897 yılında *Bacillus Botulinus* adını verdiği bir anaerob bakteri izole edilerek toksinin hayvanlar üzerinde ölümcül olduğu gösterildi. Aynı yıl Kempner tarafından toksinin zayıf bir formunu keçilere verilerek, nötralizan bir antitoksin üretilbileceği ilk kez gösterildi (4). 1900'li yılların başında ABD de konserve gıda endüstrisini büyümesiyle botulizm salgınları sıklıkla görüldü. 1943 yılında 2. Dünya Savaşı sırasında ise şarbon etkeni *Bacillus anthracis* ile birlikte botulinum toksini potansiyel biyolojik silah adayı olarak gündeme geldi (5).

1920 yılında Herman Sommer tarafından Tip-A BT ilk defa izole edilmiştir. Schantz ise 1940'lı yıllarda toksinin saflaştırılması ve yüksek miktarda üretilmesi konusunda başarılı olmuştur. 1960'ların sonlarında artık BT-A'nın kas- sinir kavşağında asetilkolin salınımını inhibe ederek etki ettiği hayvan deneyleriyle ortaya kondu. 1970'li yıllarda oftalmolog Alan B. Scott tarafından deneysel hayvan modelinde şaşılık tedavisinde etkili olduğu gösterilerek ilk kez tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceği söz konusu olmuştur (4). Scott BT-A'nın insanlarda şaşılık ve blefarospazm tedavisinde başarısını ortaya koymasının ardından, Oculinum adlı BT-A preparatı 1989 yılında FDA(Food and Drug Administration) tarafından insanlarda kullanımı onaylanmıştır. Daha sonra bu molekül Allergan Inc. Şirketi tarafından satın alınarak BOTOX® (Onabotulinumtoxin-A) ismiyle üretilmeye başlandı. 1990 yılında Londra da BT-A'nın başka bir formu Dysport® (Abobotulinumtoxin-A) blefarospazm ve hemifasiyal spazm tedavileri için kullanım onayı aldı(6). 1994 yılında Drobic ve Laskawi, BT-A'yı Frey sendromu olan hastalarda yemek yeme sırasında meydana gelen aşırı terlemenin tedavisinde

kullandı. Buradan hareketle koltukaltı ve el ayası gibi aşırı terleme problemi görülen bölgelerde ve ALS hastaları gibi parotis bezinin salgılarının azaltılması gibi uygulama alanları ortaya çıkmıştır (5).

BT'nin kozmetik amaçlı kullanımı, Jean ve Alistair Carruthers'in blefarospazm tedavisi uyguladıkları hastalarda glabella ve kaz ayakları bölgelerinde cilt kırışıklarında azalma olduğunu gözlemlemesiyle başladı. 2002 yılında FDA, glabellar bölgedeki kırışıkların geçici olarak iyileştirilmesinde BOTOX® kullanımını onaylamıştır. Abobotulinumtoxin-A'nın kozmetik endikasyonla kullanımı BOTOX®'a paralel ilerlemiştir. 2006'da Almanya ve 2009'da Avrupa genelinde yine glabella bölgesindeki kırışıklıkların giderilmesi için onay almıştır. FDA tarafından da 2009 yılında servikal distoni ve glabellar çizgilerin giderilmesi için onay alan Abobotulinumtoxin-A günümüzde dünya genelinde birçok ülkede kozmetik endikasyonlar için kullanılmaktadır (7).

2.1.2. Botulinum Toksinin Farmakolojik Özellikleri

Botulinum toksini, bakteri tarafından kompleks proteinler olarak sentezlenir. Bu kompleks nörotoksin ve beraberinde hemaglütinin(HA) ve nonhemaglütinin(NHA) proteinlerden oluşur. Nörotoksin beraberindeki proteinler yaklaşık 150kDa'luk nörotoksinin stabilizasyonu, gastrointesital sistem içerisinde bozulması önlenmesi ve enzimatik aktivitesinin artırılması gibi roller oynarlar (8). İncobotulinumtoxin A ürünü olan Xeomin® nörotoksin dışı kompleks oluşturan proteinlerden içermez (9).

Tablo 2.1: Farklı BT preparatlarının özellikleri.

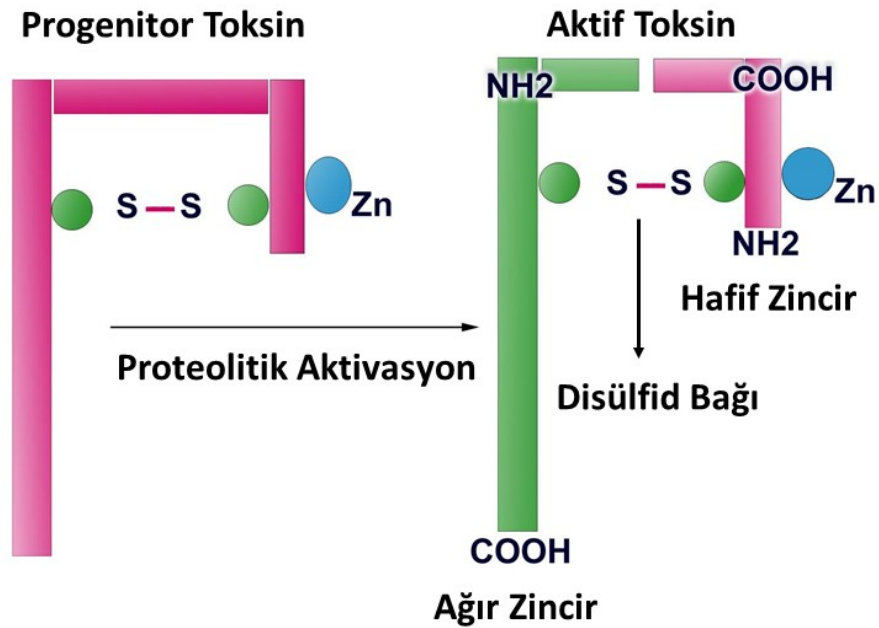
BT ürünü	Flakonda bulunan biyolojik ünite	Formulasyon	Stabilizasyon Yöntemi	Doz Ekvivalanı (Ünite)
BOTOX® (Allergan) Onabotulinumtoxin A	100 U / 50 U	BT-A 900 kDa protein 0,5mg serum albümin 0,9 mg sodyum klorür	Vakumlu Kurutma	1
Dysport® (Ipsen)/ Azzalure® Abobotulinumtoxin A	500 U / 300 U	BT-A 150 kDa protein 125 µg serum albümin 2,5 mg laktoz	Liyofilizasyon (Dondurarak Kurutma)	2-4
Xeomin® (Merz) İncobotulinumtoxin A	100 U	BT-A 150 kDa protein 1 mg serum albümin 4,7 mg süktroz	Liyofilizasyon (Dondurarak Kurutma)	1
Myobloc®/Neurobloc® (Elan/Solstice) Rimabotulinumtoxin B	2500 U / 5000 U / 10000 U	BT-B 500-700 kDa protein %0,05 serum albümin 0,1 M sodyum klorür 0,01 M sodyum süksinat	Sıvı formulasyon, pH 5,6	30-50
Jeuveau® (Evolus) Prabotulinumtoxin A	100 U	BT-A 900 kDa Protein 0,5 mg serum albümin 0,9 mg sodyum klorür	Vakumlu Kurutma	1

((1), (10) ve (11) referanslardan uyarlanarak hazırlanmıştır.)

BT'nin literatürde A, B, C1, D, E, F ve G olmak üzere yedi farklı serotipi ve üç farklı boyutta protein kompleksi raporlanmıştır. Protein komplekslerinin boyutları serotiplere göre değişiklik gösterir. ~300 kDa kompleks tüm serotiplerde bulunurken, ~500 kDa – ~700 kDa aralığında kompleks A, B, C1 ve D(HA) serotiplerinde ve ~900 kDa boyutundaki kompleks sadece A serotipinde bulunur.

BT-A'nın ticari formları arasında saflaştırma ve üretim süreçlerindeki farklılık nedeniyle son üründe bulunan proteinler de farklıdır. Onabotulinumtoxin-A yalnızca ~900 kDa kompleksler içerirken (12), Abobotulinumtoxin-A için farklı boyutlardaki kompleksler bir arada bulunur (13), İncobotulinumtoxin-A da ise tüm nörotoksin ilişkili proteinler saflaştırma sürecinde uzaklaştırılır.

Nörotoksin, tüm serotiplerde ~150 kDa boyutunda 1296 Aminoasitten oluşan tek zincir olarak sentezlenir ve aktif hale gelmesi için proteazlar tarafından dimer yapısına dönüştürülmesi gerekir (Şekil-2.1). Dimer yapısı disülfid bağıyla birbirine bağlı ağır(~100k Da) ve hafif(~50 kDa) zincirlerden oluşur. Protein yapısı 3 fonksiyonel alt birimden oluşur; endopeptidaz (hafif zincir), translokasyon bölgesi(ağır zincir N-terminal) ve bağlanma bölgesi(ağır zincir C-terminal) (14).



Şekil 2.1: Nörotoksin zincirinin proteolitik aktivasyonu

((15) numaralı referanstan uyarlanılarak hazırlanmıştır.)

2.1.3. Botulinum Toksinin Etki Mekanizması

BT etkisini sinir ucuna bağlanma-hücre içine alınma, translokasyon ve kalsiyum (Ca) bağımlı nörotransmitter salınımının inhibisyonu şeklinde 3 aşamada gösterir. Sinir ucuna bağlanmayı ağır zincirde bulunan bağlanma bölgesi ve sinir hücre membranındaki glikoprotein yapıdaki çift reseptörlerin etkileşimi sağlar. Ganglioizid yapısındaki GT1b bağlanmayı başlatıcı etki gösterir ve ardından SV2 veya Sinaptotagmin (BT-B ve BT-G için) gibi protein yapıdaki reseptörlere bağlanmayı sağlar. BT – reseptör ilişkisi farmakodinamik olarak sıfırıncı derece kinetiğe uygunluk gösterir.

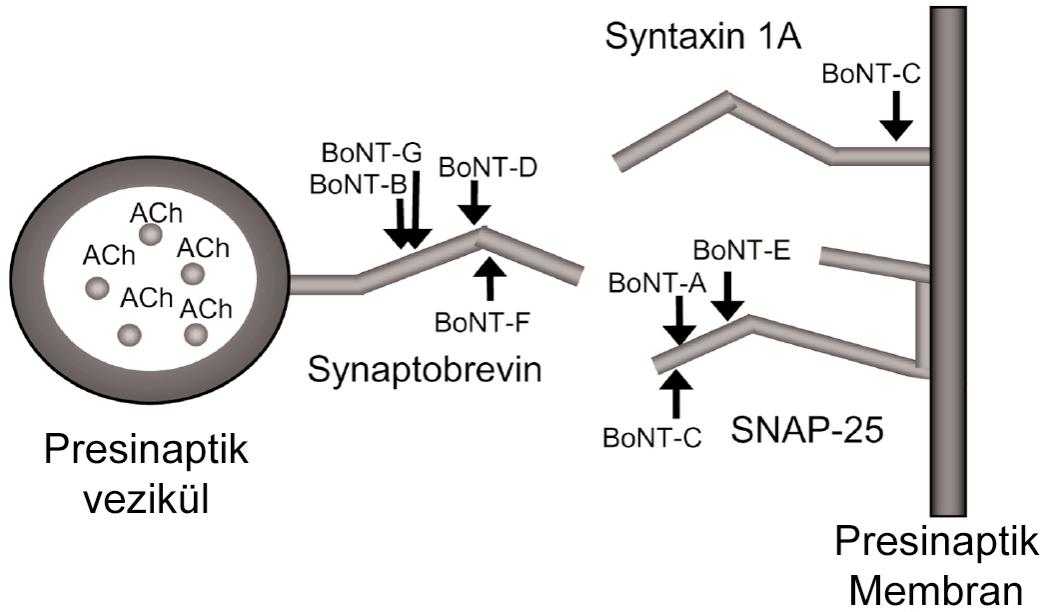
Bağlanma sonrası, BT reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır (16). Bu süreç de hızlı ve yavaş olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Vezikül döngüsü hızlı süreçte rol oynarken, spesifik olmayan endositoz da saatler sürebilen yavaş mekanizmayı sağlar. Enerji gerektiren endositoz işlemi sonrasında, vezikül içerisindeki asidifikasyon, hafif zincirin vezikülden sitozole translokasyonuna neden olur.

Hafif zincir sitozole geçtikten sonra, nörotransmitter içeren veziküllerin salınması için gerekli olan SNARE (soluble N-etyhylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteinlerden bir ya da bir kaçını çinko bağımlı endopeptidaz aktivitesi ile parçalar. BT'nin farklı serotipleri farklı SNARE proteinlerini hedef alır (16).

Fizyolojik olarak nörotransmitterler bulundukları veziküllerden ekzositoz ile sinaptik aralığa salınırlar. Veziküllerin presinaptik membrana doğru hareketini

Sinaptobrevin (VAMP: Vesicle associated membrane protein) sağlar, SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein 25 kD) ve presinaptik membrana bağlı olarak bulunan Sintaksin kompleks oluşturur. Bu kompleks aracılığıyla presinaptik membrana bağlanan vezikül, Ca ile tetiklenen bir sinyal ile presinaptik mebranla birleşir ve içerisindeki nörotransmitterler sinaptik aralığa salınır.

BT-A ve BT-E SNAP 25'i; BT-B, BT-D, BT-F ve BT-G sinaptobrevini BT-C ise SNAP-25 ve Sintaksini hedef alır (17) (Şekil-2.2).



Şekil 2.2: Farklı BT serotiplerinin hedef aldığı SNARE proteinleri

(BoNT: Botulinum Nörotoksin, ACh: Asetilkolin) ((17) numaralı referanstan uyarlanarak hazırlanmıştır.)

Asetilkolin salınımının inhibisyonu sinir iletimini bloke ederek paraliziye neden olur. Sinir hücresi bu duruma, postsinaptik bölgeden salınan büyüme faktörlerinin neden olduğu aksonal tomurcuklanmayla yanıt verir (18). Bu yanıtın memeli kas dokusunda 2 gün içerisinde başladığı görülmüştür. Bu yanıtın yeni sinapslar oluşturabileceği görülmüşse de, esas fonksiyonu ana sinir terminalinin

iyileşmesi sağlamaktadır (19). Ana sinir terminalinde ekzositozun yeniden sağlanmasıyla aksonal tomurcuklanmalar geriler. BT'nin nörotoksik olmadığı ve iyileşme sonrası sinaps yapısının toksinin öncesindeki durumdan daha farklı olmadığı gösterilse de, tekrar eden enjeksiyonlar sonrası sıçanlarda asetil kolin salınımının daha yavaş iyileştiği gözlenmiştir (19). Ancak bu gözlemin klinikle uyumu net değildir. Tekrar eden BT enjeksiyonlarının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ele alınan 44 çalışmadan yalnızca 1 tanesi tekrar eden uygulamaların etki süresinin uzattığını desteklemektedir (20).

BT nöromusküler bileşkedeki etkisi kas kasılmasını inhibe eder. afferent yolları da inhibe etmesiyle kas içiğindeki intrafusalliflerin duysal innervasyonu azalmış olur. Bu da etkilenen kasın gevşemesine yol açar (21).

Asetilkolinin nörotransmitter olarak görev aldığı otonomik motor yollar da BT'nin etki ettiği yapılardır. Bu etkiden yararlanılarak hiperhidrosis ve gustatuar terleme gibi otonom hiperaktivite durumlarının tedavisinde kullanılır. Etki mekanizması motor son plaktaki ile benzer olmasına rağmen, BT'nin otonom sinirler üzerindeki etkisi daha uzun sürer (22).

BT asetilkolin dışında dopamin, noradrenalin, glisin, peptid y, enkefalin methiyonin ve substance P gibi farklı nörotransmitterlerin salınımını da inhibe etmektedir (23).

Klinikte BT-A en sık, fazla aktif kaslara enjeksiyon yapılarak kullanılır. Kas içi enjeksiyon sonrası etkinin başlama süresi 3 ila 7 gündür ve bu etki 3 ila 5 ay kadar sürer. BT-B'nin glabella ve kaş bölgesinde etki süresi 1000 U için 6-8 hafta,

2000 U için 10-12 hafta olarak raporlanmıştır (24). BT-A ile tedavi edilen hastalarda uzun yıllar doz artırmaya ihtiyaç duymadan ve güvenlik, tedavi cevabı ve yaşam kalitesinde azalma olmadan tedavi başarısı sağlandığı birçok çalışmada gösterilmiştir (25).

Bölgesel hiperhidrosis tedavisinde BT-A enjeksiyonları intradermal olarak yapılır. Etkinin başlangıcı bu tedavi için 1 haftadır ve bu etki ortalama 7 ay kadar sürer. Tekrar eden enjeksiyonlarda etkinin 16 aya kadar uzadığını belirten çalışmalar vardır (26).

2.1.4. Botulinum Toksinin Deri Üzerindeki Etkisi

Vücutta yaygın olarak bulunan ekren ter bezleri postganglionik sempatik innervasyona sahiptir. Sempatik sistemin genelinden farklı olarak bu sistem kolinerjik nöronlar içerir (27). Kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ve vazoaaktif intestinal peptid (VIP) gibi ko-transmitterler de bu uyarımda rol oynar (28). Apokrin ter bezleri ise aksilla, perine ve genital bölgede bulunan, sempatik innervasyonu bulunan, epinerfrin ve norepinefrine duyarlı ter bezleridir. Ayrıca kıllı bölgelerde bulunan epinefrin ve norepinefrin yanında asetilkoline de duyarlı apokrin ter bezleri de tanımlanmıştır (27).

Deri yapısındaki sebase bezler doğrudan otonom liflerle innerve olmasa da asetilkoline duyarlıdır (29). Sebase bezler nikotinik kolinerjik reseptörler üzerinden asetilkolin tarafından uyarılmasının sebum üretimini artırdığı in-vitro olarak gösterilmiştir (30). Migren ve fasiyal tik tedavisi için BT tedavisi uygulayan

hekimler sebase kist ve akne şikâyeti olan hastaların fayda gördüklerini gözlemlemişlerdir (31). Takiben tasarlanan çalışmalar da bu gözlemleri desteklemiştir (32).

Onabotulinumtoxin A ve Abobotulinumtoxin A'in akne rozacea ve psöriazis hastalarında fayda sağladığına yönelik vaka sunumları ve küçük çalışmalar literatürde yer almaktadır (33). Bunu yanında Abobotulinumtoxin A psöriazis hayvan modelinde de etkili bulunmuştur (34).

BT'nin kaslarda gevşemeye neden olması, ciltteki gerimi azaltarak iyileşmeyi destekler ve yara izlerinin daha kısıtlı olmasını sağlar. Çalışmalarda, yüz bölgesinde ve yarık dudak onarımı sonrasında daha iyi iyileşen skarlar görülmüştür (35). Bunun yanında intralezyoner BT uygulanması, kontrolsüz yara iyileşmesi sonucu oluşan keloid dokusunun miktarında ve keloide eşlik eden ağrı semptomlarında azalma sağlamıştır (36).

BT'nin insan hipertrofik yara dokusundan elde edilen fibroblastlar üzerinde, skar oluşumuna neden olan transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) üretimini azalttığı ve fibroblastların olgunlaşması ve myofibroblastlara dönüşmelerini inhibe ettiği görülmüştür (37). Birçok prelinik çalışmada BT'nin vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF), TGF- β 1, and matrix metalloprotease-1 (MMP-1) gibi skar oluşmasıyla ilişkili proteinlerin seviyelerinde değişikliğe neden olduğu, yara dokusunda kollajen birikimini ve dermal fibroblastlarda kollajen-1 sentezini azalttığı bulunmuştur. Yine fibroblastlar üzerinde yapılan prelinik bir çalışmada ultraviyole radyasyonun neden olabileceği erken hücrel yaşlanmayı belirgin şekilde antagonize ettiği ve “photoaging” olarak

adlandırılan güneş ışığının yaşlandırma etkisine karşı BT'nin potansiyel taşıdığı belirtilmiştir (38). Klinikte perioral bölgeye BT uygulanmasının neden olduğu renk değişikliği literatürde raporlanmış ve in-vitro çalışmalar da BT'nin anti-melanositik etkisini desteklemiştir (39, 40).

2.1.5. İmmunojenite

Birçok yabancı protein gibi BT de belirli doz ve sıklıkla karşılaşıldığında immün yanıtı neden olabilir. BT'nin oluşturduğu protein kompleksinde bulunan non-toksin proteinlere karşı gelişen antikorlar BT'ye klinik yanıtı etkilemezken, doğrudan BT'nin ~150 kDa nörotoksinine karşı gelişen antikorlar toksinin etkisizleşmesine neden olabilir (41). Nötralizan antikorların hedef aldığı aminoasit bölgelerinin bireyler arasında farklı olduğunun görülmesi, bu antikorların gelişmesinde bireysel genetik faktörlerin önemli olduğunu göstermektedir (42).

Farklı ticari preparatların üretim yöntemi ve formülasyonlarındaki farklılıklar, immünojeniteleri arasında da farklılığa neden olur. Bu farklılıklar kısa dönem ve uzun dönem (yaklaşık 2 yıl) çalışmaların her preparat için farklı sonuçlanmasına yol açar. Onabotulinumtoxin A için kısa dönem spasite ve uzun dönem servikal distoni çalışmalarında, nötralizan antikor oranı %1, glabellar kırışıklıkların azaltılması endikasyonu ile kullanımında ise %0 olarak bulunmuştur (43, 44). Abobotulinumtoxin A için glabella bölgesinde %0, servikal distoni hastalarında %3'ten daha az nötralizan antikor görülürken (45, 46), Incobotulinumtoxin A için yapılan çalışmalarda %1,1 olarak bulunmuştur (47). Servikal distoni için

Rimabotulinumtoxin B tedavisi alan hastalarda nötralizan antikor oranları 1 yıl tedavi sonrasında %10, 18 ay tedavi sonrasında %18 olarak bulunmuştur (48).

Nötralizan antikor varlığına rağmen bazı hastalarda tedavi yanıtının devam ettiği görülmekle beraber, nötralizan antikor olmadan da primer veya sekonder yanıtsızlık da söz konusu olabilir (49, 50).

2.1.6. Botulinum Toksinin Endikasyonları, Dikkat Edilmesi Gereken Durumlar Ve Yan Etkileri

BT birçok alanda tedavide yer almakla beraber plastik cerrahi pratiğinde önde gelen kullanım endikasyonları;

- Kırışıklık tedavisi; glabella, kaz ayakları, perioral kırışıklar
- Gülme sırasında diş etinin fazla görünür olması(gummy smile) ve platismal bantların giderilmesi
- Ağız ve kaş kenarlarının kaldırılması
- Fasyal distoniler
- Fasyal sinir felci ve aberran uyarım durumları
- Migren
- Elde tremor
- El veya koltukaltında aşırı terleme
- Nöropatik ağrı
- Üst ekstremitte spastikleri
- Masseter hipertrofisi

- Tükürük fistüllerinin tedavisi olarak sıralanabilir.

Plastik cerrahi dışında başlıca kullanım alanları ise

- Şaşılık, blefarospazm
- Servikal distoni
- Alt ekstremitte spastikleri, juvenil sererbral palsy
- Aşırı aktif mesane, nörojenik detrussör aşırı aktivitesi
- Düz kas hiperaktivitesiyle seyreden durumlar; akalazy, anal fissür tedavisidir (3).

BT uygulaması sonrasında toksinin bölgesel yayılmasına bağlı istenmeyen etkiler görülebilir. Bunlar etki mekanizmasıyla uyumlu olarak asteni, yaygın kas güçsüzlüğü, çift görme, görme keskinliğinin azalması, pitoz, göz kuruluğu, disfaji, disfoni, dizatri, üriner inkontinans ve solunum güçlüğü olabilir. Bu etkiler çoğunlukla spastik tedavi gören hastalarda görülmekle beraber, tedavi sonrası saatler veya haftalar sonra ortaya çıkabilirler. Bunun dışında enjeksiyon bölgesinde hematoma ve rahatsızlık hissi de görülebilir.

Kas sinir kavşağında iletimin kesilmesine neden olduğu için BT'nin, sinir iletimini etkileyebilecek aminoglikozitler, siklosporin, kinin ve kalsiyum kanal blokerleri gibi ilaçları kullanan kişiler ve Eaton-Lambert veya Myastenia Gravis hastalığı olanlarda kullanılması önerilmemektedir. Emziren anneler ve gebelerde kullanımı kontrendikedir. Bunların yanında daha önce BT'ye hiperreaktivite reaksiyonu gösteren kişilerde kullanılmamalıdır. Ayrıca Dysport® içerisinde iz

miktarda inek sütü proteini bulunduğu için buna karşı hipersensitivitesi olan kişilerde kullanılmamalıdır (51).

2.2. Deri Yapısı

Deri tüm vücudu kaplayan ve çevreye arasında bir bariyer oluşturan, ağırlık olarak en büyük organdır. Ortalama ağırlığı 3,8 kg, yüzey alanı ise yaklaşık 1,7 m² dir. Doku olarak değerlendirildiğinde kas, yağ ve kemik dokudan sonra ağırlık olarak 4. sırada gelir (52).

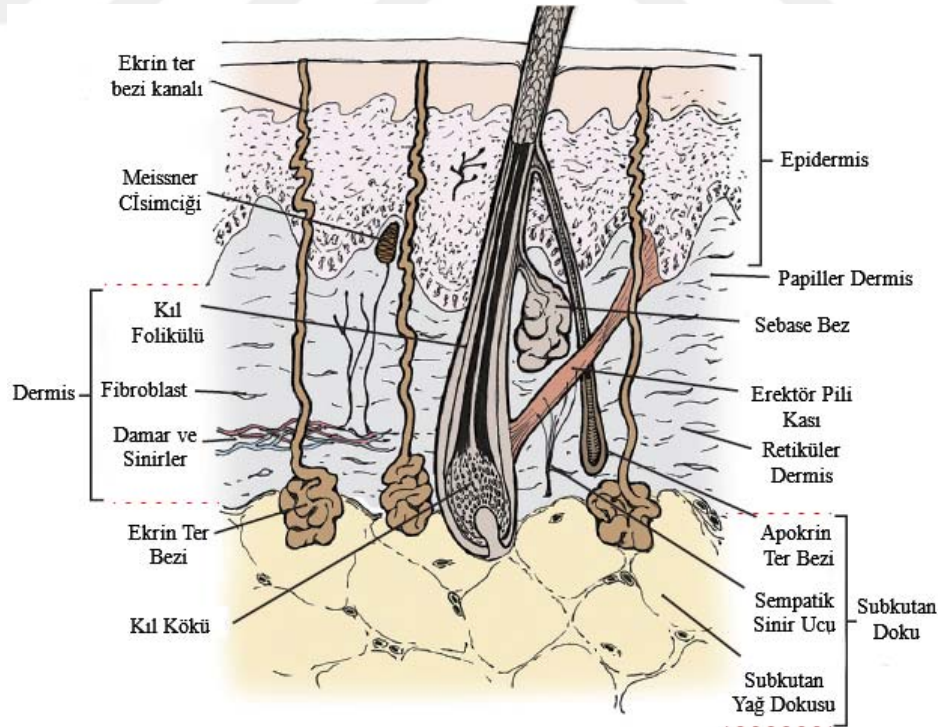
Deri kişiler arasında ve vücudun farklı bölgelerinde renk, kalınlık, yüzey özelliği, kıl kökü ve sebace bez içeriği açısından farklılıklar gösterir. Ayrıca yaş, cinsiyet ve anatomik bölgelere göre deri ekleri ve elastik liflerin miktarı da farklıdır. Memelilerin vücutları tüylerle kaplı olsa da, insan derisi kabaca kıl bulunduran ve kıl bulundurmayan (el ayası ve ayak tabanı) olarak ikiye ayrılabilir. Ayrıca kıl bulundurmayan kısımlarda epidermis kalınlığı fazla olduğu için kalın deri ve ince deri şeklinde de adlandırılabilir.

Deri gençlik ve sağlığın önemli bir göstergesidir. Derinin kendisine ait birçok hastalığında çeşitli bulgular görülmesinin yanı sıra sistemik durumların da deri bulguları söz konusudur. Örneğin fizik muayenede sarılık hepatobiliyer sistem rahatsızlıklarına, solukluk anemilere, mavi-mor renk siyanozla seyreden kardiyovasküler veya pulmoner rahatsızlıklara, pigment eksikliği ise albinizm gibi metabolik durumların belirtisi olarak değerlendirilmelidir.

Derinin görevleri

- Yaralanmalardan koruma(mekanik etki)
- Su kaybını (dehidrasyon) azaltan bir bariyerdir
- Vücut sıcaklığının düzenlenmesi (soğuktan koruma ve fazla ısıyı uzaklaştırma)
- İçerdiği dentritik hücrelerle mikroorganizmalara karşı savunma
- Tuz atılması
- D vitaminin sentezlenmesi
- Dokunma ile duysal fonksiyonların sağlanması

Şeklinde sıralanabilir (53).



Şekil 2.3: Derinin kesitsel yapısı.

((54) numaralı referanstan uyarlanılarak hazırlanmıştır.)

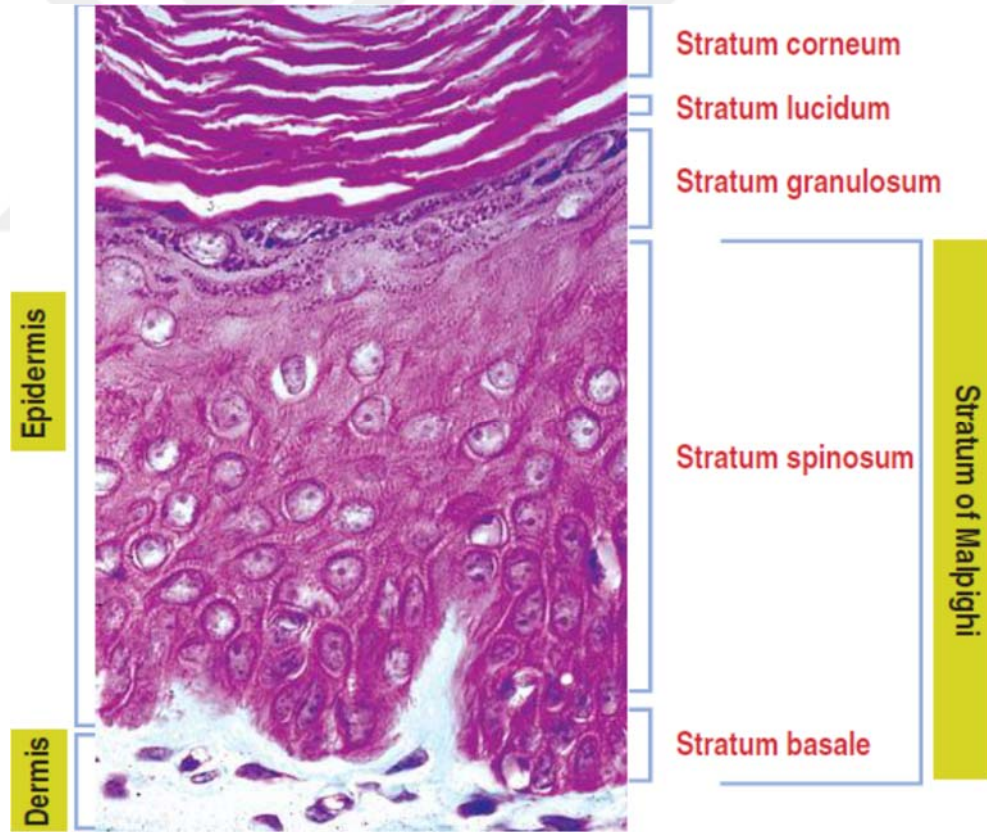
Deri içerisinde bulunan, deri ekleri(kıl kökleri, sebace bezler, ter bezleri), sinirler, damarlar ve immün sistem hücreleri ile bu fonksiyonları gerçekleştirir. Deri epidermis, dermiş ve hipodermis(deri altı) olarak 3 tabakaya ayrılabilir.

Embriyolojik olarak epidermis ve deri ekleri yüzey ektoderminden, dermiş ve subdermal tabaka mezoderminden köken alır. Gestasyonun 4. haftasında tek katlı ektoderm embriyoyu çevreler. Bu tek katlı epitelin altında gevşek bir organizasyon gösteren, farklılaşmamış mezoderm olan mezenkim bulunur. 6. hafta civarında ektoderm ve altındaki mezoderm prolifer olmaya ve farklılaşmaya başlar. Kıl folikülleri, tırnaklar ve bez yapıları 3. ayda gelişmeye başlar. 3. Ay sonunda deride düzenli kollajen demetleri görülmeye başlar. Epidermis altındaki embriyonik bağ doku da farklılaşarak yağ adacıklarıyla karakterize olan subdermal gevşek bağ dokusunu oluşturur (55).

2.2.1. Epidermis

Epidermis çok katlı yassı epitel yapısındadır ve temel olarak 4 farklı hücre tipi içerir. Keratinositler epiderminin ana hücreleridir (%80) ve ismini içerdiği ara filaman keratin proteininden alır. Melanin üretiminden sorumlu melanositler nöral krest kökenlidir. Langerhans hücreleri, T hücrelere antijen sunan kemik iliği kökenli dendritik yapıdaki hücrelerdir. Merkel hücreleri ise dokunma duyusunda görevli yine nöral krest kökenli hücrelerdir (53). Epidermis yapısında keratinositler 5 tabaka (stratum) şeklinde organize olmuşlardır. En altta bulunan bazal tabaka, bazal membran üzerinde yerleşmiş tek sıra kolumnar şekilli, metabolik olarak aktif

keratinositlerden oluşur. Bu keratinositler çoğalma özelliğine sahiptir ve belli bir oranda kök hücre içerirler. Çoğalan keratinositler daha yüzeysel tabakalara doğru göç eder, bu göç boyunca keratin içerikleri farklılaşır ve şekilleri yassılaşır. Bazal tabakanın üzerinde birkaç hücre kalınlığında olan stratum spinosum bulunur. Spinöz tabakadaki hücreler poligonal şekillidir ve eozinofilik sitoplazmaları belirgindir. Aralarında bulunan spinöz yapılar desmozomlardır ve ışık mikroskobu altında görülebilirler. Altındaki bu iki tabaka birlikte stratum malpighi olarak da adlandırılır.



Şekil 2.4: Epiderminin tabakaları

((53) numaralı referanstan uyarlanmıştır.)

Stratum granulosum isimini hücrelerin içinde bulunan bazofilik koyu renkli keratohyalin granüllerinden alır. Spinöz tabaka gibi ortalama 4 hücre sırasından oluşur. En dış tabaka olan stratum corneumda hücreler olgunlaşmasını tamamlar ve hücre çekirdeğini kaybederek yassı keratin plaklarına dönüşür. Avuç içi ve ayak tabanında stratum spinozum ve corneum arasında stratum lucidum denilen eleidin içeren bir tabaka daha bulunur.

Stratum corneum kalınlığı el ayası ve ayak tabanında en fazla, göz kapakları ve genital bölgede en az olacak şekilde farklılıklar gösterir. Epidermis kalınlığı ortalama 0,075-0,15mm kadardır. Doğumda ince olan epidermis, puberteyle birlikte kalınlaşır, 5.-6. dekad sonrası tekrar incelir. Bazal tabakadan stratum corneum a kadar keratinosit döngüsü yaklaşık 30 gün sürer(54).

Melanositler, stratum bazalede yerleşimli, pigment salgılayan, dendritik yapıda hücrelerdir. Keratinositlere oranı yüz bölgesinde 1:4, ekstremitelerde 1:10 kadardır. Melanin üretiminden sorumlu olan melanositler, melanozom şeklinde paketlenen melanini dendritik uzantıları aracılığıyla bazal ve spinöz tabakadaki keratinositlere aktarır. Keratinositler içerisinde melanin, nükleusu örten bir şemsiye şeklinde yerleşir ve ultraviyole radyasyon etkilerinden korunur. Irklar arasında melanosit sayısı değişmezken, melanozom sayısı ve büyüklükleri koyu ten rengine sahip ırklarda daha fazladır. Melanositlerin yokluğu vitiligo hastalığında görülürken, albinizmde melanositler bulunur ancak tirozinaz enzimi olmadığından melanin sentezi gerçekleşmez. Yaşla beraber melanosit yoğunluğunda ve tirozinaz aktivitesinde azalma görülür (56).

Langerhans hücreleri epidermise özgü olmayıp dermiste ve diğer yassı epitel dokularında da bulunur. Histolojik incelemelerde soluk boyanırken, elektron mikroskobisinde küçük raket şeklinde görülen Birbeck granülleri ile karakterizedir. Antijen sunan diğer hücreler gibi dendritik uzantıları bulunan langerhans hücreleri immün yanıtta rol oynar. Kontakt dermatit ve allograft reaksiyonlarında rol alır. Radyasyon langerhans hücrelerinin sayısını azaltan bir etmendir. Bu nedenle radyasyonun karsinogenezdeki rolünde langerhans hücrelerinin immün özelliklerini baskılanmasının rol aldığı düşünülmektedir. Langerhans hücrelerinin sayısı ayrıca yaşla beraber de azalır (57).

Epidermis yapısındaki nöroendokrin hücreler olan Merkel hücreleri, dokunma duyusunu algılayan, yavaş adapte olan mekanoreseptörler olarak görev yaparlar. Dokunma hassasiyeti yüksek olan dudak, parmaklar, ağız boşluğu ve kıl köklerinde bir araya gelerek taktıl disk yapısı oluştururlar. Epidermisin bazal keratinositlerin arasında bulunan Merkel hücreleri, bazal membranda bulunan sinir plaklarıyla bağlantılıdır. Bu sinir aksonları bazal membran sonrasında myelinli liflerle devamlılık gösterir (53). Merkel hücreleri nörotransmitterlerle benzerlik gösteren ve nöroendokrin hücrelerin markerları olan yoğun sitoplazmik granüller içerirler (58).

2.2.2. Deri Ekleri

Deri ekleri esas olarak dermis ve hipodermiste yerleşimli epidermal yapılardır. Ancak bu yapılar epidermisle bağlantılıdır. Yara iyileşmesinin epitelizasyon fazında rol oynarlar.

Kıl folikülü, erektör pili kası, sebase bezler ve sinir uçları bir araya gelerek pilosebace üniteyi oluşturur. Bu yapı motor ve duysal fonksiyonun yanında kıl ve sebum üretiminde rol alır. Skalpte foliküler kısmın baskın olması kalın terminal kılların oluşmasını sağlar. Burun ucunda ise sebase kısım baskındır ve sebase folikül olarak adlandırılabilir. El ayası, ayak tabanı ve mukozalarda bulunmazlar. Nörovasküler yapılardan zengin ve fibroblast içeren bağ dokudan oluşan papilla kılların gelişmesi için önemlidir. Bu gelişme 3 fazdan oluşan bir döngü bir şeklindedir. Anajen faz kıl foliküllerinin gelişme fazıdır. Katajen fazda kıl folikülü hacmi azalır, papilla erektör pili seviyesine yükselir, kapiller dolaşım azalır. Dinlenme fazı olan telojen fazda folikül kontrakte olur ve papilla ile bağlantısı kesilir ve en son dökülme görülür (55). Vücutta foliküllerin hepsi farklı zamanlarda farklı fazlarda bulunur. Skalpte foliküllerin %85 kadarı 3-4 yıl süren anajen fazda bulunur.

Sebase bezler, foliküle açılan kısa kanallar aracılığıyla sebum salgırlar. Bu yağlı salgı kılların ve derinin nemlenmesini sağlar. El ayası ve avuç içi hariç her yerde bulunan sebase bezler androjen hormonların etkisi altındadır. Doğumdan sonraki birkaç içerisinde aktivitesi azalan sebase bezler, puberteyle beraber tekrar aktive olur ve akne gelişiminde rol alır. Yaşla beraber sebum üretimi azalsa da

sebase bezler artar. Vermillon hattında, göz kapaklarında ve areolada kıl folikülüyle ilişkisi bulunmayan sebase bezler bulunur (55).

Ekrin ter bezleri müköz mebranlar, vermillon ve tırnak yatağı hariç tüm deri üzerinde bulunur. Avuç içi, ayak tabanı, koltukaltı ve alın bölgesinde yoğun olarak bulunur. Derinin vücut ısını düzenleme fonksiyonunda önemli rol alır. Salgı bezi ve doğrudan deri yüzeyine açılan ter kanalı olmak üzere iki yapıdan oluşur. Salgı bezi derin retiküler dermis veya dermo-hipodermal bileşkede bulunur. Ekrin ter bezleri kolinerjik sinir uyarımının yanında termal, mental ve gustatuar uyarımlara da duyarlıdır (54).

Apokrin ter bezleri genel olarak aksilla, areola, perine, göz kapakları (Moll bezleri), dış kulak yolunda bulunur. Puberteye kadar fonksiyonel hale gelmeyen apokrin ter bezleri, adrenerjik innervasyona yanıt olarak kokusuz bir salgı üretirler. Salgının daha sonra cilt florasındaki bakterilerle etkileşmesi kokuya neden olur. Salgı hücrelerinin apikal kısımlarının parçalanmasıyla salgı, kıl folikülünün infundibulum kısmına açılan ter bezi kanalına dökülür.

2.2.3. Dermis

Dermis epidermis ve subkutan yağdoku arasında bulunan ve derinin esas hacmini oluşturan bağ dokusu sistemidir. Dermis yapısında sinirler, damarsal ağlar, deri ekleri, fibroblastlar, makrofajlar ve mast hücreleri bulunur. Ekstraselüler dermal matriks esas olarak kollajen içermekle beraber elastin ve filamantöz ve amorf moleküllerin oluşturduğu ara madde de bulunur. Dermis derinin

dayanıklılığını, elastisitesini ve esnekliğini sağlar. Yüzeyel kısımda daha ince olan papiller dermis, derinde ve daha kalın olan retiküler dermiş olmak üzere iki tabakadan oluşur. Dermiş kalınlığı vücut bölgelerine göre farklılıklar gösterir. Yaşla beraber dermiş kalınlığı artarken, 4.-5. dekad sonrası azalmaya başlar. Genellikle erkeklerde dermis kalınlığı kadınlardan fazladır.

Dermisin esas yapısını ve cildin kuru ağırlığının %75'ini kollajen oluşturur. Kollajen fibroblastlar tarafından sentezlenir ve cilde gerim dayanımı ve elastisite kazandırır. Dermal kollajenin %85'i retiküler dermiste kalın bantlar şeklinde bulunan Tip-1 kollajendir. Tip-3 kollajen ise papiller dermiste ince lifler halinde bulunur ve kabaca kollajenin %10 kadarını oluşturur. Tip-4 ve Tip-7 kollajen ise bazal membran yapısında bulunur (59).

Kollajen lifleri sürekli bir yapım ve yıkım döngüsündedir. Matiks metalloproteinaz enzimleri tarafından yıkılırken diğer yandan yeni sentezlenen kollajen yıkılan kollajenin yerini alır. Bu dengenin yıkım lehine kayması histolojik olarak kollajen liflerin organizasyonunda bozulmaya sebep olur. Bu da klinikte deride kırışıklıklar ve yaşlanma belirtileri şeklinde görülür. Ultraviyole radyasyon matriks metalloproteinazları aktive ederken, tretinoin bunu azaltıcı etki gösterir. Bu da cilt görünümünün iyileşmesi ve ince çizgi ve kırışıklıkların giderilmesini sağlar (60, 61).

Dermis yapısında bulunan elastik lifler ise derinin gerim veya şekil değişikliği sonrası eski haline dönmesini sağlar. Esas olarak fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Papiller dermiste ince yapıda ve deri yüzeyine dik uzanacak şekilde bulunurlar. Retiküler dermis yapısında ise daha kalın bulunan elastik liflerin

uzanımı da deri yüzeyine paralel olacak şekildedir. Elastik lifler de kolajen gibi yapım-yıkım döngüsüne sahiptir. Elastik lifler, elastin, fibrilin glikoprotein yapıları içerir (62).

Ara madde dermisin fibröz komponentlerinin çevreleyen ve tüm vücutta bulunan bir yapıdır. Kondroitin sülfat ve dermatan sülfat gibi proteoglikanlar, hyalüronik asit gibi glikozaminoglikanlar ve fibronektin gibi filamentöz proteinlerden oluşur. Dermiste fibroblastlardan sentezlenir ve histolojik kesitlerde açık müsinöz stroma şeklinde görülür. Derinin nemini korumasında ve mekanik etkilerin yüzey alanı boyunca yayılmasına yardımcı olur.

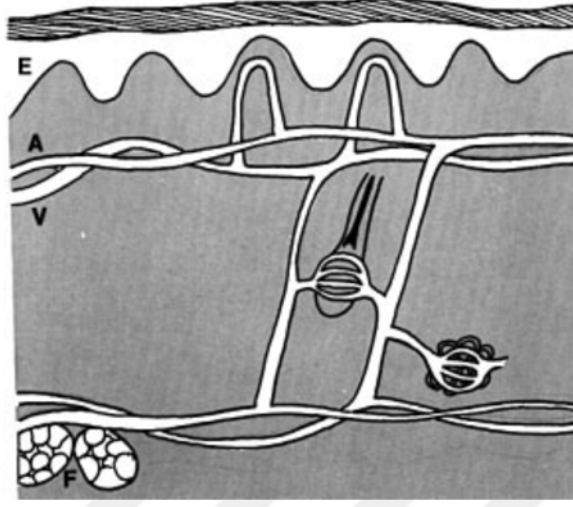
Dermisin ana hücresel elemanı fibroblastlardır. Kollajen, elastin ve ara madde sentezinden sorumludurlar. Papiller dermiste yoğun olarak, retiküler dermiste ise seyrek olarak bulunurlar. Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblastlar kontraktıl özellikleri sayesinde yara kontraksyonunu sağlarlar. Yaşla birlikte derideki fibroblast sayısı da azalır.

Monositler, makrofajlar ve dermal dendrositler dermisin fagositik hücrelerini oluştururlar. Mast hücreleri papiller dermis, deri eklerinin, damar ve sinir yapılarının çevresinde yoğun bulunan hücrelerdir. Allerjik reaksiyonlarda esas rol alan hücreler mast hücreleridir. Ayrıca deri bütünlüğünün bozulması sonrası iyileşme cevabının başlamasında da katkı sağlarlar (63).

Derinin damarları, subkutan dokuya ulaşan muskulokutanöz perforatörlerlerden beslenir. Deri yüzeyine paralel uzanan, yüzeysel ve derin olmak üzere iki dermal pleksus bulunur (Şekil-2.5). Bu iki sistemi birbirine bağlayan ara

damarlar da mevcuttur. Bu bağlantılar vücut ısısının düzenlenmesi için kan dolaşımının pleksuslar arasında yönlendirilmesinde rol alır. Dermis ve subkutan yağ doku birleşiminde derin vasküler pleksusu oluşturan damarlar bulunur. Derin pleksustan çıkan arterioller deri eklerini ve yüzeysel pleksusu besler. Yüzeysel pleksus, retiküler dermisin yüzeysel kısmında bulunur ve dermal papillaların içerisine uzanan zengin kapiller sistemi oluşturur. Bu kapiller ağ içerisinde damar bulunmayan epidermisin difüzyonla beslenmesini sağlar. Dermisin lenfatik sistemi de vasküler sisteme benzer şekildedir (64).

Deri, duysal reseptörlere bağlanan ve serbest sinir uçlarından zengin bir dokudur. Dış dünyadan gelen uyarılarla kesintisiz olarak vücudun uyarılmasını sağlar. Sıcaklık, kaşınma ve ağrı hem myelinli hem de papiller dermiste yaygın bulunan myelinsiz serbest sinir uçlarıyla iletilir. Merkel diskleri dermo-epidermal bileşkede, Meissner cisimcikleri dermal papillalarda ve Pascini ve Ruffini cisimleri derin dermis veya hipodermiste bulunan mekanoreseptörlerdir. Meissner cisimcikleri parmak ucu ve göz kapağı gibi özel yerlerde bulunur ve şekil ve doku gibi özellikleri algılamada rol alır. Ruffini cisimleri derin dermiste yerleşimlidir ve derideki gerime ve eklemlerdeki şekil değişikliklerine duyarlıdır. Pascini cisimcikleri ise vibrasyon ve derin basınca duyarlıdır, periost, eklem kapsülü ve pankreas gibi yapılarda bulunur (53). Duysal sinirler dışında dermiste, damarları ve deri eklerini innerve eden efferent sinirler de bulunur.



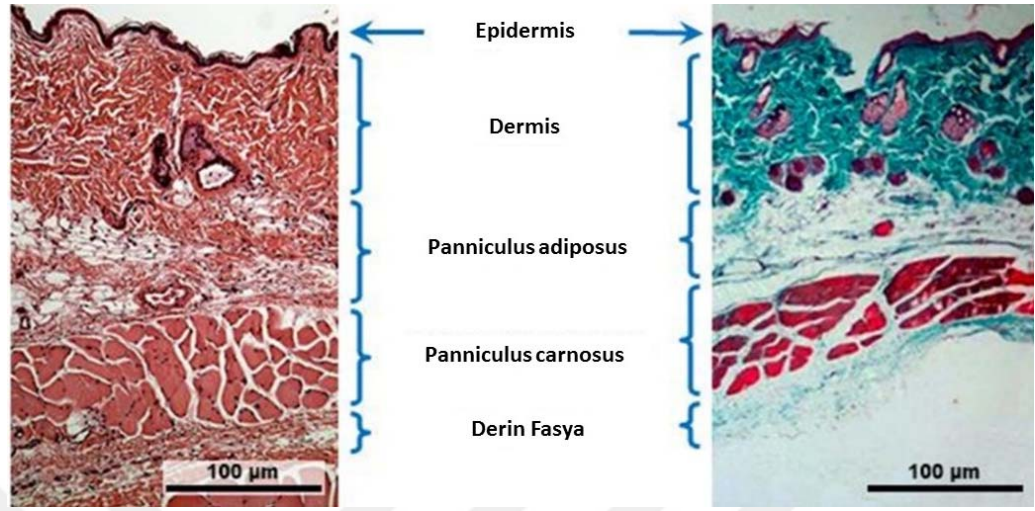
Şekil 2.5: Derinin damarsal yapısı.

E: epidermis A: Arteriol V: Venül F: subkutan yağ dokusu ((64) numaralı referanstan uyarlanarak hazırlanmıştır.)

2.2.4. İnsan ve Ratlar Arasında Deri Yapısındaki Farklar (65, 66)

- İnsanlarda bulunan apokrin ter bezleri ratlarda bulunmaz.
- Ekrin ter bezleri insanda yaygın bulunurken ratlarda ayakların palmar yüzüyle sınırlıdır.
- İnsanlarda kılların dağılımı, miktarı ve yaşam döngüsü farklılıklar gösterir.
- Ratlarda epidermisin çok katlı yassı epitel yapısı insandakine göre çok ince olup sadece 1-2 hücre kalınlığındadır. Epidermis kalınlığı insanda 100µm iken ratlarda 25-30µm kadardır.
- Stratum spinozum insanlarda epidermisin belirgin bir tabakasıdır, ancak sıçanlarda yalnız ayak tabanlarında görülür.

- Melanositler ratlarda yalnızca kıl foliküllerinde bulunur, insanlarda ise epidermis bazal tabakasında melanositler ve epidermiste melanin bulunur.
- Dermo-epidermal bileşke insan derisinde daha girintili çıkıntılı bir yapıdayken ratlarda yalnızca ayak tabanlarında buna benze bir ilişki görülür.
- İnsan dermisi yüzeysel ve derin damar pleksusları içerir ve termoregülasyonda bu ağlar rol oynar, ratlarda ise dermal damarlar çoğunlukla kıl kökleriyle ilişkilidir.
- Cilt altı yağ dokusu kalınlığı insanda anatomik bölgeye ve cinsiyete göre farklılıklar gösterirken, ratlarda kıl folikülü döngüsü ve mevsime göre farklılıklar gösterir. Ayrıca ratlarda cilt altı kahverengi yağ dokusu da bulunmaktadır.
- Cilt altı yağ dokusunun altında ratlarda panniculus carnosus adı verilen çizgili kas yapısında bir kas bulunur, insanda tek karşılığı boynun ön bölgesinde bulunan plastisma kasıdır, diğer bölgelerde bulunmaz.
- Ratlarda kıl folikülü döngüsü fazları kılların çoğunda benzer seyrederken insan kılları farklı zamanlarda farklı fazlarda bulunur.



Şekil 2.6: Rat derisinin histolojik görüntüsü

Sol tarafta hematoksilen-eosin ile sağ tarafta masson trikrom boyama ile hazırlanmış preparatlar. Subdermal yağ dokusu olan panniculus adiposus ve çizgili kas yapısındaki panniculus carnosus görülmektedir.((67) numaralı referanstan uyarlanarak hazırlanmıştır.)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 11.11.2019 tarihli toplantıda **G.Ü.ET-19.072** kod numarası ile etik kurul onayı almıştır. Deneysel çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinde (GÜDAM) gerçekleştirildi. Çalışmada minimum 12 haftalık, ağırlıkları 300 (± 25) gram erkek cinsiyette Wistar Albino türü hayvanlar kullanıldı. 2 deney ve 2 kontrol grubu olarak toplam 4 grupta, her grupta 6 adet hayvan olacak şekilde toplamda 24 deney hayvanı kullanılmıştır. Denekler, deney öncesi ve deney süresince serbest yem ve su ile beslenerek, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta olacak şekilde barındırıldı. Deneyin sonlandırılmasında ratlar intrakardiyak kan alınarak kurban edildi. Sırt bölgesinde enjeksiyon uygulanan bölgelere yapılan makroskopik değerlendirmenin ardından histolojik inceleme için örnekler alındı.

3.1. Gruplar ve Açıklamaları

Grup 1 (D-1)'de sırtta kıllar tıraş edildikten sonra Abobotulinumtoxin A (ABO) enjeksiyonu uygulandı.

Grup 2 (K-1)'de sırtta kıllar tıraş edildikten sonra serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu uygulandı.

Grup 3 (D-2)'de sırtta kıllar tıraş edildikten sonra Abobotulinumtoxin A (ABO) enjeksiyonu uygulandı, 3 ay sonra tıraş yapılmadan ABO enjeksiyonu tekrarlandı.

Grup 4 (K-2)'te sırtta kıllar tıraş edildikten sonra serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu uygulandı, 3 ay sonra tıraş yapılmadan SF enjeksiyonu tekrarlandı.

Gruplara yapılan işlemler Tablo-3.1' de özetlenmiştir.

Tablo 3.1: Deney Grupları ve yapılan işlemler

Grup Adı	Denek Sayısı	Enjeksiyon Zamanı ve Türü	Değerlendirme Zamanı
Grup -1 (Deney Grubu -1)	6	0. Ay -> ABO	3. Ay
Grup -2 (Kontrol Grubu -1)	6	0. Ay -> SF	3. Ay
Grup -3 (Deney Grubu -2)	6	0. Ay ve 3. Ay -> ABO	6. Ay
Grup -4 (Kontrol Grubu -2)	6	0. Ay ve 3. Ay -> SF	6. Ay

(ABO: Abobotulinumtoxin A, SF: Serum Fizyolojik)

3.2. Botulinum Toksininin Hazırlanması

Botulinum Toksin preparatı olarak Abobotulinumtoxin A (AboBT) etken maddeli Dysport® (Ipsen Limited, Wrexham, UK) kullanılmıştır. (Şekil - 3.1) Literatürde yapılan çalışmalarda doğrudan ratlarda uygulanacak intradermal AboBT dozunu belirten bir çalışma bulunmamaktadır. Ratlarda yapılan çalışmalarda çoğunlukla Onabotulinumtoxin A (OnaBT) kullanılmış ve uygulanan dozlar çalışmalara göre farklılık göstermiştir. Ratlarda iskemi-reperfüzyon modeli kullanılan bir çalışmada OnaBT dozu 37,5 U/kg olarak kullanılmış (68), random

paternli flep modelinde vazokonstriktör maddeler üzerine etkisi araştırılan başka bir çalışmada OnaBT dozu 29U/kg olarak belirlenmiştir (69). Farelerde yapılan ve farklı BT preparatlarının farmakodinamik özelliklerini karşılaştırmayı amaçlayan bir çalışmada, intramusküler enjeksiyon sonrası digital abduksiyon skoru üzerinden yapılan değerlendirmelerde, deneklerin %50 için etkin doz olan ED₅₀ değeri AboBT için 41 U/kg, OnaBT için 12U/kg olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada deneklerin yarısında ölümcül olan kas içi enjeksiyon dozları ise AboBT için 242 U/kg, OnaBT için 120 U/kg olarak bulunmuştur (70). Literatürde OnaBT ve AboBT için doz oranları farklı verilse de, AboBT için 2-3 kat doz oranı genel kabul görmüştür (1).



Şekil 3.1: Abobotulinumtoxin A preparatı Dysport® (Ipsen Limited, Wrexham, UK)

Literatürdeki bilgiler göz önüne alınarak çalışmamızda AboBT dozu 100U/kg olarak belirlenmiştir. Deneklerin ortalama ağırlıkları (300 gram) ile yapılan hesaplama sonucu denek başına 30 U AboBT şeklinde olmuştur. Dysport®

flakonunda 500 U AboBT bulunmaktadır. 5 ml SF ile sulandırıldığında, 30 U dozu için 0,3 ml hacim hesaplanmış ve kontrol gruplarında yapılacak SF hacmi de yine 0,3ml olarak belirlenmiştir.

3.3. Enjeksiyon Yöntemi

Tüm ratlarda intraperitoneal 45 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazin enjeksiyonu ile uygun anestezi sağlandıktan sonra işleme başlandı. Tüm denekler prone pozisyonda uygun olarak tespit edildi. Takiben sırt bölgesi tıraşlandı. İliak krestin 1 cm anteriorunda orta hatta 2x3 cm'lik alan belirlenip, 1x1 cm'lik 6 bölgeye ayrılacak şekilde işaretleme yapıldı (Şekil-3.2). Ardından octenidin hidroklorür (Octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Germany) ile antisepsi uygulandı. Steril örtünmeyi takiben 1x1'cm lik alanların orta noktasına 0,05m hacminde, deney gruplarında AboBT kontrol gruplarında SF, intradermal enjeksiyon yapıldı. Çalışmada tüm enjeksiyonlar 32G 8mm iğneli 0,5ml hacimde enjektör (Fine Micro Syringe™, Feel Tech Bio Co. Ltd, Korea)) kullanılarak yapılmıştır (Şekil-3.3).

Grup 1 ve 2 için 3. ay sonunda, grup 3 ve 4 için 6. ayın sonunda deney sonlandırıldı. Uygun anestezi sonrasında makroskopik inceleme için enjeksiyon bölgelerinde kıl örnekleri alındı. Ardından sırt tıraşlandı. Enjeksiyon bölgesi deri ve deri altı dokusu dâhil edilecek şekilde örnekler alınarak histolojik inceleme yapıldı.(Şekil-3.4) Makroskopik incelemede kıl örneklerinde kıl kökünün dâhil edildiği kontrol edildikten sonra uzunluk ölçümleri yapıldı (Şekil-3.5).

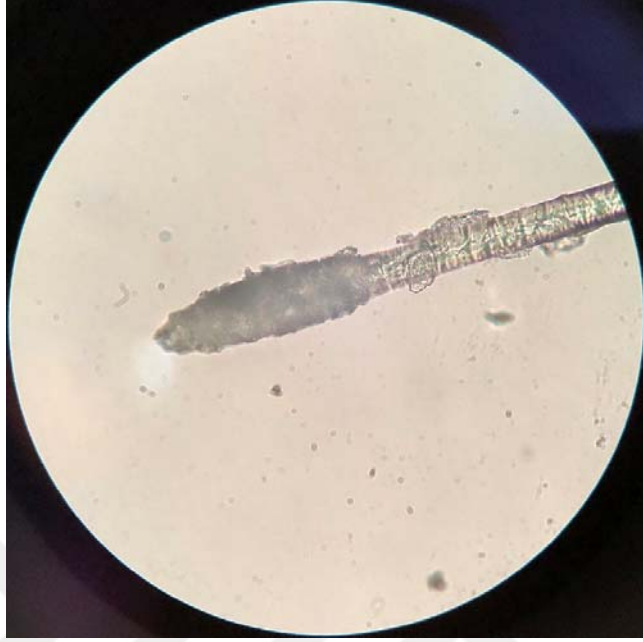


Şekil 3.2: Rat sırtında enjeksiyon yapılacak bölgenin işaretlenmesi.

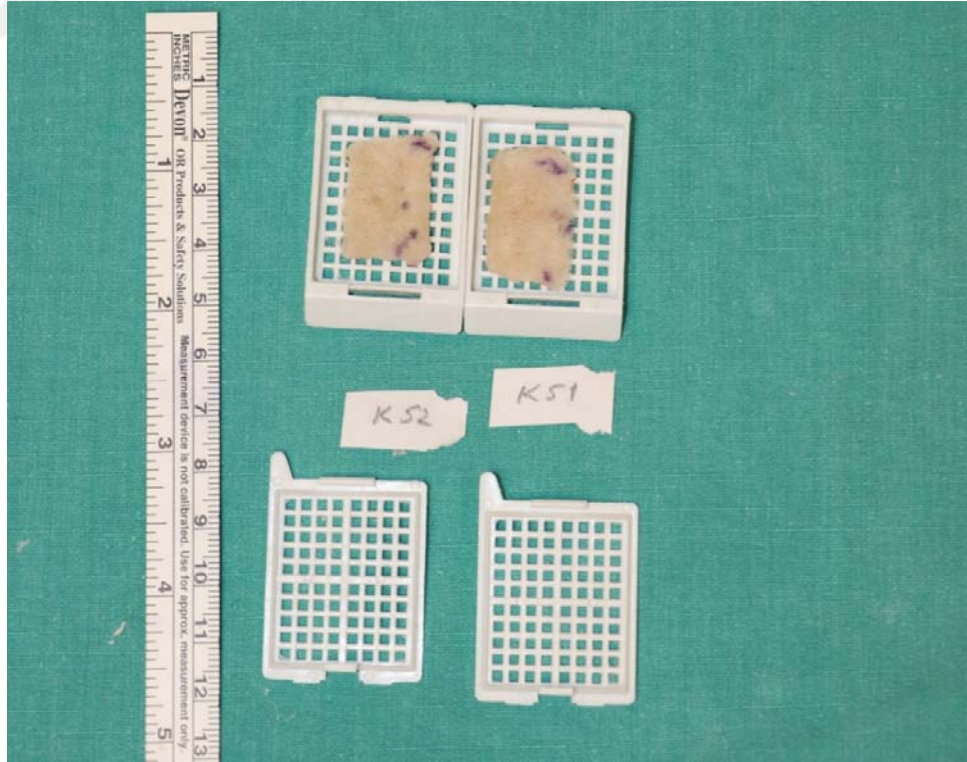
Düz çizgi iliak krest hizasını, noktalar enjeksiyon bölgesini oluşturan alanın köşelerini göstermektedir.



Şekil 3.3: 0,5ml Fine Micro Syringe™, Feel Tech Bio Co. Ltd, Korea



Şekil 3.4: Kıl kökünü mikroskop altında görüntüsü.



Şekil 3.5: Enjeksiyon bölgesinden histolojik inceleme için alınan doku örnekleri.

3.4. Histolojik Değerlendirme

Alınan dokular nötral formaldehitte fikse edildikten sonra, akar suda yıkanarak dokulardan formaldehit uzaklaştırıldı. Dehidratasyon ve şeffaflaştırma sonrasında sıvı parafine gömülen dokulardan 5µm'lik kesitler alındı. Kesitler 56°C etüvde 2 saat boyunca deparafinize edildi. Azalan alkol serisinden geçirilerek rehidrate edilen doku kesitleri hematoksilin eozin ve Masson'un üçlü boyası (CB6095.0100) kullanılarak boyandı.

Hematoksilen eozin boyama aşamaları:

1. Rehidratasyon sonrası 15 dakika (dk) hematoksilinle boyandı. Yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı.
2. Glasiyal asetik asit çözeltisiyle boyama sonlandırıldı. Yıkanarak asit uzaklaştırıldı.
3. Eozinle 15 dk boyandıktan sonra yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı.
4. Artan alkol serilerinden geçirildi. Boyanan kesitler ksilole alındı ve entellan yardımıyla lamelle kapatıldı.

Masson'un üçlü boyası aşamaları:

1. Distile suyla rehidratasyon sonrası, Weigert A ve Weigert B çözeltilerinin karışımıyla oluşturulan çözelti kesitlere damlatıldı 10 dk inkübe edildi. Ayraç uzaklaştırıldıktan sonra yıkamadan 5 dk kurutuldu.
2. Kesitler pikrik asitle örtüldü. 4 dk sonra ayraç uzaklaştırıldı ve distile suyla yıkandı.

3. Gelincik kıvılcı- asit fuksin ile örtüldü. 4 dk sonra uzaklaştırılıp distile suyla yıkandı.
4. Fosfotungstik asit çözeltisi ile 10 dk inkübe edildi yıkanmadan 5 dk kurutuldu.
5. Anilin mavisi ile örtülen kesitler 5dk sonra yıkandı.
6. Artan alkol serisinden geçirilerek ksilole alınan kesitler entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Distile suyla rehidratasyon sonrası, sitrat tamponlu çözelti (AP-9003-500, LOT: MK170924) ile mikrodalgada 5 dk ısıyla indüklenmiş antijen retrieval işlemi yapılarak antijenler açığa çıkarıldı. Oda sıcaklığına gelen kesitler fosfat tamponlu çözelti (PBS) ile örtüldü. Hidrojen peroksit çözeltisi (TA-125-HP, LOT: HP46013) ile 15 dk boyunca inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Özgül olmayan bağlantıların engellenmesi için UV block çözeltisi (TP-125-HL, LOT: PHL250251) ile 10 dk inkübe edildi. Kollajen 1 (1:200, bs10423R, LOT: AH08315802) ve kollajen 3(1:200, bs0549R, LOT: AH0092472) karşı geliştirilmiş primer antikorlarla +4°C’de gece boyunca inkübe edildi. PBS’le yıkanan kesitler 10 dk boyunca sekonder antikorla (TP-125-HL, LOT: PHL250251) inkübe edildi. Ardından tekrar yıkanan kesitler streaptavidin peroksidaz çözeltisiyle (TP-125-HL, LOT: PHL250251) 5 dk inkübe edildi. Tekrar yıkanan kesitler AEC solüsyonuyla (TA125-HA, LOT: HA45338) 15 dakika inkübe edilerek antijen ve antikor

eşleşmesi kromojenle görünür hale getirildi. Reaksiyon PBS'le sonlandırılarak Hematoksilenle zemin boyaması yapıldı. Distile suyla yıkanarak lamelle kapatıldı.

Boyanan kesitler DM4000 LEİCA Germany Görüntülü Analiz Sistemleri ve ImageJ (NIH) ile iki histolog tarafından değerlendirildi. Hematoksilen eozin ve üçlü boya yapılan kesitlerde: epidermis, dermiş, cilt altı yağ dokusu (panniculus adiposus) ve cilt altı kas tabakası (panniculus carnosus) kalınlığı ölçüldü. Kesitlerde birim alana düşen kıl kökü sayısı ve sebase bez alanının dermis alanına oranı hesaplandı. Cilt altı yağ dokusundaki kollajen lif yüzdesi hesaplandı. Cilt altı yağ dokusunda kollajen 1/ kollajen 3 oranı hesaplandı.

3.6 .İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistik analizi SPSS 21.0 (IBM) programı ile gerçekleştirildi. Epidermis, dermis, hipodermis ve panniculus carnosus kalınlıkları, epidermis/dermis oranı, cilt altı yağ dokusundaki kollajen lif yüzdesi, kollajen 1/3 oranı, birim alana düşen kıl folikülü sayısı, sebase bez alanları toplamının dermis alanına oranı, kıl uzunlukları açısından ikili gruplar arasındaki farklar bağımsız t-testi ile belirlendi. p değerinin 0,05 ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arası değerlendirmeler;

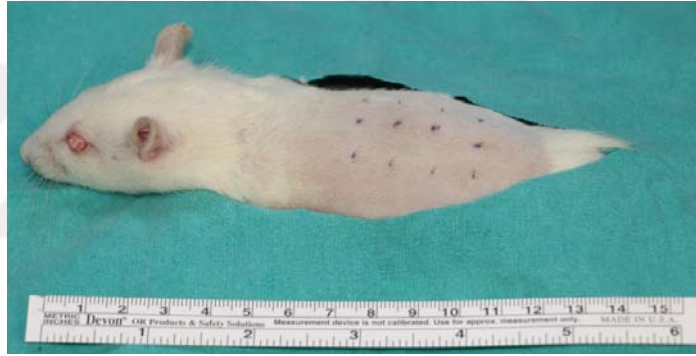
- Grup-1(D-1) ve Grup-2(K-1) arasında,
- Grup-3(D-2) ve Grup-4(K-2) arasında,
- Deney grupları Grup-1(D-1) ve Grup-3(D-2) arasında,
- Kontrol grupları Grup-2(K-1) ve Grup-4(K-2) arasında,

olacak şekilde yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular ve Klinik Gözlem

Deney süresince deneklerin hiçbirinde bir komplikasyona rastlanmadı. Deney süresince ve deney sonlanımında yapılan değerlendirmelerde, hayvanlar arasında makroskopik olarak herhangi bir fark gözlenmedi. Deney sonlanımında hayvanlar tıraş öncesi ve sonrası makroskopik olarak değerlendirildi ve fotoğraflandı. (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1: Grup 2 (Kontrol Grubu-1) den bir deneğin deney sonlanımında tıraş sonrası görünümü.

Mavi noktalar enjeksiyon bölgesinin köşelerini göstermektedir.



Şekil 4.2: Grup 3 (Deney Grubu-2)'den bir deneğin 6.ayda tıraş öncesi görünümü.

4.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Histolojik kesitlerde; epidermis, dermis, hipodermis ve panniculus carnosus kalınlıkları milimetre(mm) olarak, epidermis/dermis oranı, cilt altı yağ dokusundaki (hipodermis) kollajen lif yüzdesi, kollajen 1/3 oranı, birim alana (milimetrekare) düşen kıl folikülü sayısı, sebace bez alanları toplamının dermis alanına oranı, kıl uzunlukları (mm) açısından değerlendirmeler yapıldı. Değerlendirmelere ait tanımlayıcı istatistik verileri Tablo-4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Tüm Gruplar için tanımlayıcı istatistikler.

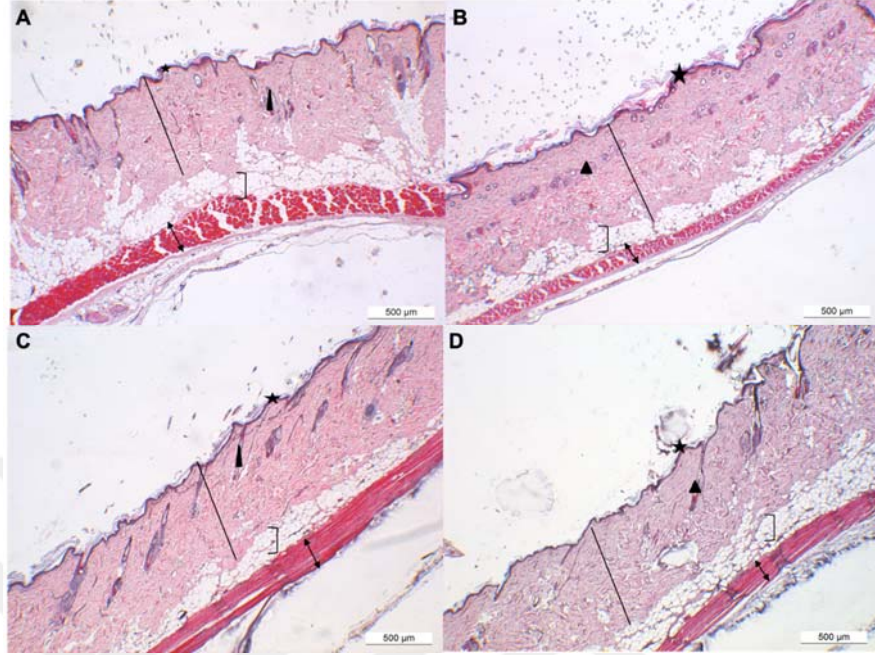
	Grup	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	En Küçük	En Büyük
EPİDERMİS KALINLIK (mm)	1(D-1)	0,022065	0,004765	0,020385	0,018485	0,0311222
	2(K-1)	0,023624	0,003378	0,024352	0,0182	0,0268888
	3(D-2)	0,022117	0,003381	0,020745	0,01925	0,0272928
	4(K-2)	0,019509	0,001577	0,019821	0,016975	0,02123
DERMİS KALINLIK (mm)	1(D-1)	0,878808	0,076913	0,888516	0,752226	0,963488
	2(K-1)	1,010387	0,087442	1,007076	0,8752	1,111428
	3(D-2)	1,012716	0,084561	0,985069	0,916786	1,1222
	4(K-2)	0,981166	0,108253	1,009715	0,774286	1,06338
HIPODERMİS KALINLIK (mm)	1(D-1)	0,319996	0,095005	0,334494	0,1904625	0,437997
	2(K-1)	0,390759	0,099780	0,384206	0,266988	0,519053
	3(D-2)	0,402899	0,089239	0,384609	0,301357	0,536807
	4(K-2)	0,261901	0,166726	0,196012	0,1475	0,5839
P. CARNOSUS KALINLIK (mm)	1(D-1)	0,104898	0,019078	0,100552	0,08198	0,12775
	2(K-1)	0,191373	0,036867	0,1841025	0,154643	0,254988
	3(D-2)	0,128504	0,030669	0,120742	0,09665	0,182539
	4(K-2)	0,260056	0,076544	0,261391	0,17812	0,3835

Tablo-4.1 (Devamı)

	Grup	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	En Küçük	En Büyük
HIPODERMİS KOLLAJEN YÜZDESİ	1(D-1)	25,1569	7,516356	21,91795	20,8593	40,3422
	2(K-1)	29,359	6,067474	30,1682	19,0819	36,0835
	3(D-2)	23,15852	5,891541	22,31755	14,737	31,153
	4(K-2)	29,23259	4,500887	28,86178	22,854	36,428
HIPODERMİS KOLAJEN 1/3	1(D-1)	1,231153	0,1424948	1,230428	1,001375	1,447872
	2(K-1)	1,286876	0,1620561	1,233891	1,150223	1,574863
	3(D-2)	1,820413	0,6536185	1,569911	1,155066	2,884786
	4(K-2)	1,485004	0,2271593	1,432513	1,221772	1,765817
KIL UZUNLUĞU (mm)	1(D-1)	15,66	3,386	15	12	21
	2(K-1)	16	2,828	16	13	20
	3(D-2)	16,66	3,559	15,5	13	22
	4(K-2)	16,83	4,665	15,5	13	25
KIL FOLİKÜLÜ SAYISI/ mm ²	1(D-1)	15,510070	7,772064	16,953837	5,409855	24,116143
	2(K-1)	11,221796	4,969278	13,118075	5,026850	15,58543
	3(D-2)	3,558113	0,833314	3,787697	2,134472	4,505954
	4(K-2)	4,504562	1,919767	4,585611	2,342342	7,407407
SEBASE BEZ ALANI/DERMİS ALANI	1(D-1)	0,019306	0,004571	0,019828	0,013253	0,024255
	2(K-1)	0,017426	0,006056	0,016603	0,012219	0,028549
	3(D-2)	0,01542	0,003591	0,013673	0,0129	0,022033
	4(K-2)	0,009099	0,005290	0,010015	0,001085	0,014599

4.2.1. Epidermis Kalınlığı

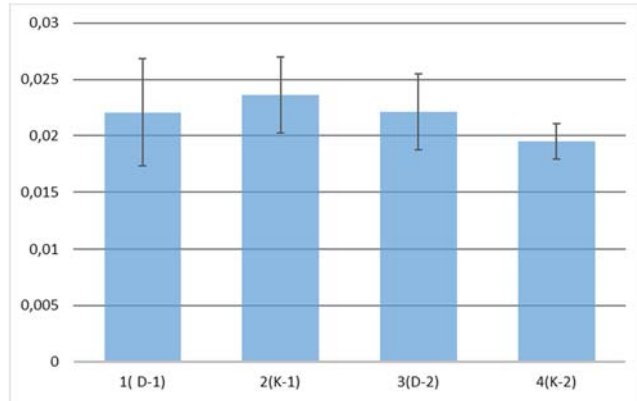
Epidermis kalınlığı ortalamaları en yüksek Grup-2 (K-1)'de ($0,023624 \pm 0,003378$) en düşük Grup-4 (K-2)'te ($0,019509 \pm 0,001577$) olarak bulundu. Bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,022$).



Şekil 4.3: K-1(A), D-1(B), K-2 (C), D-2(D) gruplarından örneklere ait mikrograflar (Hematoksilen eozin).

Epidermis yıldız, dermis düz çizgi (—), cilt altı yağ dokusu parantez (]), cilt altı kas dokusu çift taraflı ok(↔), kıl kökleri ise üçgen kullanılarak işaretlenmiştir.

Epidermis kalınlıkları açısından diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Epidermis kalınlığı ortalamaları Şekil-4.4'te grafik şeklinde gösterilmiştir. Epidermis kalınlıkları açısından yapılan değerlendirmelere ait p değerleri Tablo-4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Epidermis kalınlığını(mm) gösteren grafik.

(Ortalama±SS)

Tablo 4.2: Epidermis kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar.

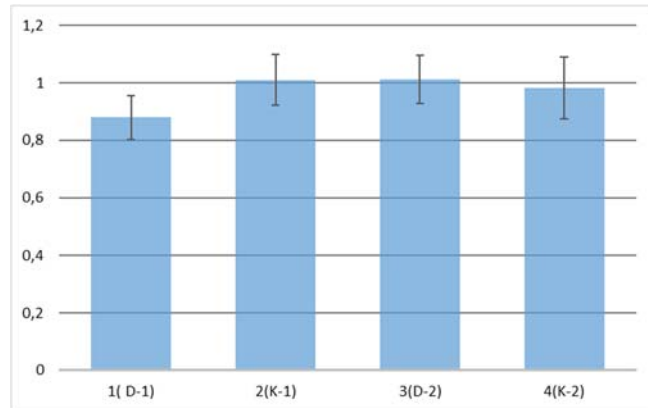
EPİDERMİS KALINLIĞI		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,528
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,118
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,983
Grup-2 (K-1) ↑	Grup-4 (K-2)	0,022*

(*: istatistiksel anlamlı p değeri, ↑: Ortalaması yüksek grup)

4.2.2. Dermis Kalınlığı

Dermis kalınlığı ortalaması en yüksek Grup-3 (D-2)'de ($1,012716 \pm 0,084561$) en düşük Grup-1 (D-1)'de ($0,878808 \pm 0,076913$) olarak bulundu. Bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,017$). Ayrıca Grup-1 (D-1) ve Grup-2 (K-1) ($1,010387 \pm 0,087442$) ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,02$).

Dermis kalınlıkları açısından diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Epidermis kalınlığı ortalamaları Şekil-4.5'te grafik şeklinde gösterilmiştir. Epidermis kalınlıkları açısından yapılan değerlendirmelere ait p değerleri Tablo-4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Dermis kalınlığını(mm) gösteren grafik. (Ortalama±SS)

Tablo 4.3: Dermis kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar

DERMİS KALINLIĞI		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1) ↑	0,020*
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,586
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2) ↑	0,017*
Grup-2 (K-1)	Grup-4 (K-2)	0,618

(*: istatistiksel anlamlı p değeri, ↑: Ortalaması yüksek grup)

4.2.3. Hipodermis Kalınlığı

Hipodermis kalınlığı ortalaması en yüksek Grup-3 (D-2)'de ($0,402899 \pm 0,089239$) en düşük Grup-4 (K-2)'de ($0,261901 \pm 0,166726$) olarak bulundu. Hipodermis kalınlığı açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Hipodermis kalınlıkları açısından yapılan değerlendirmelere ait p değerleri Tablo-4.4'te gösterilmiştir..

Tablo 4.4: Hipodermis kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar

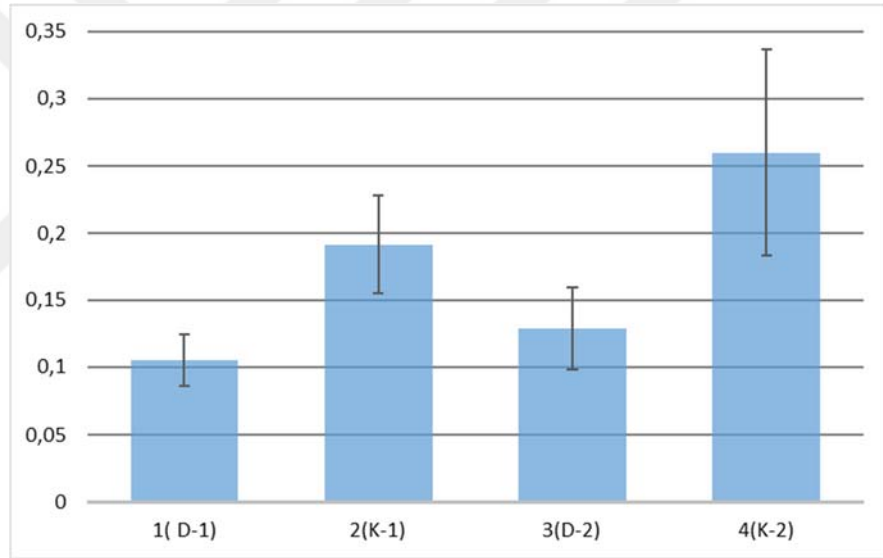
HİPODERMİS KALINLIĞI		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,237
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,098
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,150
Grup-2 (K-1)	Grup-4 (K-2)	0,135

4.2.4. P. carnosus Kalınlığı

P. carnosus kalınlığı ortalaması en yüksek Grup-4 (K-2)'de ($0,260056 \pm 0,076544$) en düşük Grup-1 (D-1)'de ($0,104898 \pm 0,019078$) olarak bulundu. Grup-

1 (D-1) ve Grup-2 (K-1) ($0,191373 \pm 0,036867$) ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Grup-3 (D-2) ($0,128504 \pm 0,030669$) ve Grup-4 (K-2) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,003$).

P. carnosus kalınlıkları açısından diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). *P. carnosus* kalınlığı ortalamaları Şekil-4.6’da grafik şeklinde gösterilmiştir. *P. carnosus* kalınlıkları açısından yapılan değerlendirmelere ait p değerleri Tablo-4.5’te gösterilmiştir.

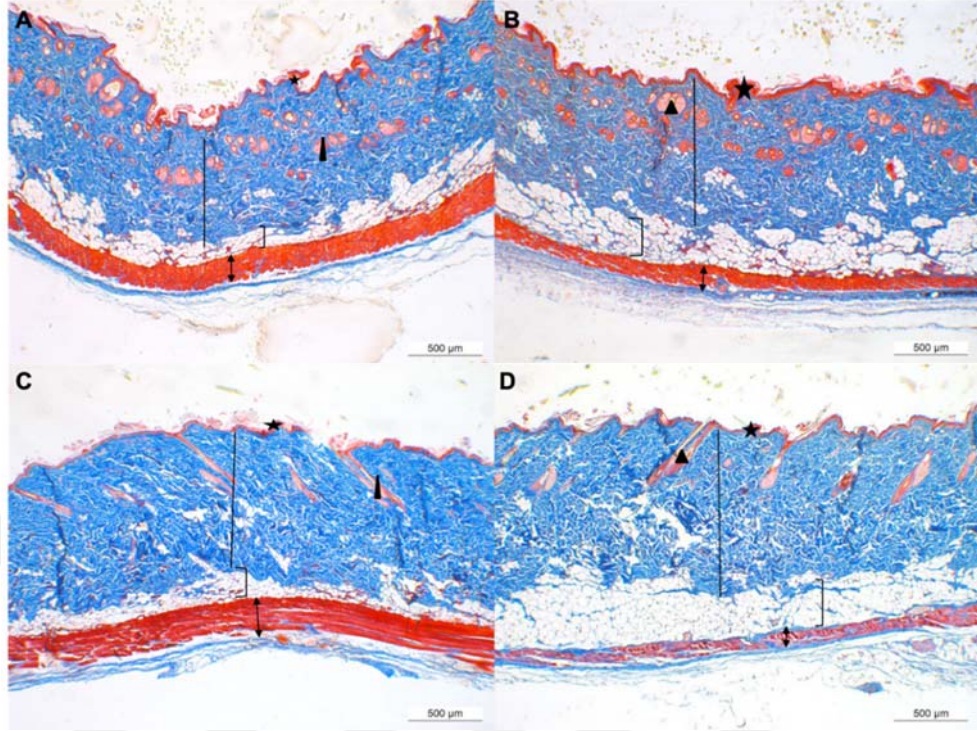


Şekil 4.6: *P. carnosus* kalınlığını(mm) gösteren grafik (Ortalama±SS)

Tablo 4.5: *P. carnosus* kalınlığı ortalamasına göre gruplar arası karşılaştırmalar.

P. CARNOSUS KALINLIĞI		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1) ↑	<0,001*
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2) ↑	0,003*
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,140
Grup-2 (K-1)	Grup-4 (K-2)	0,076

(*: istatistiksel anlamlı p değeri, ↑ : Ortalaması yüksek grup)



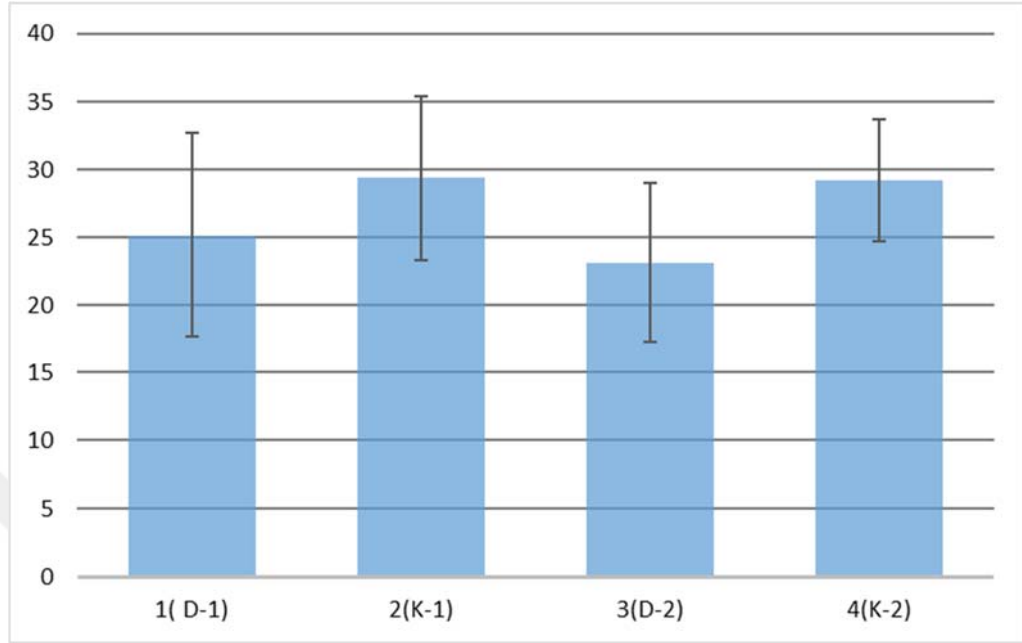
Şekil 4.7: K-1(A), D-1(B), K-2 (C), D-2(D) gruplarından örneklere ait mikrograflar (Masson'un üçlü boyası).

Epidermis yıldız, dermis düz çizgi (—), cilt altı yağ dokusu parantez (]), cilt altı kas dokusu çift taraflı ok($\leftrightarrow$), kıl kökleri ise üçgen kullanılarak işaretlenmiştir.

4.2.5. Hipodermis Kollajen Yüzdesi

Hipodermis kollajen yüzdesi en yüksek Grup-2 (K-1)'de ($29,359 \pm 6,067474$), en düşük ise Grup-3 (D-2)'te ($23,15852 \pm 5,891541$) bulunmuştur. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda, deney gruplarında kontrol gruplarına göre ortalama değerler daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Hipodermis kollajen yüzdesi açısından diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Hipodermis kollajen yüzdesi ortalamaları Şekil-4.8'de grafik şeklinde gösterilmiştir. Hipodermis kollajen yüzdesi açısından yapılan değerlendirmelere ait p değerleri Tablo-4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8: Hipodermis kollajen yüzdesi(%) gösteren grafik (Ortalama±SS)

Tablo 4.6:Hipodermis kollajen yüzdesine göre gruplar arası karşılaştırmalar.

HİPODERMİS KOLLAJEN YÜZDESİ		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,312
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,073
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,619
Grup-2 (K-1)	Grup-4 (K-2)	0,968

4.2.6. Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 Oranı

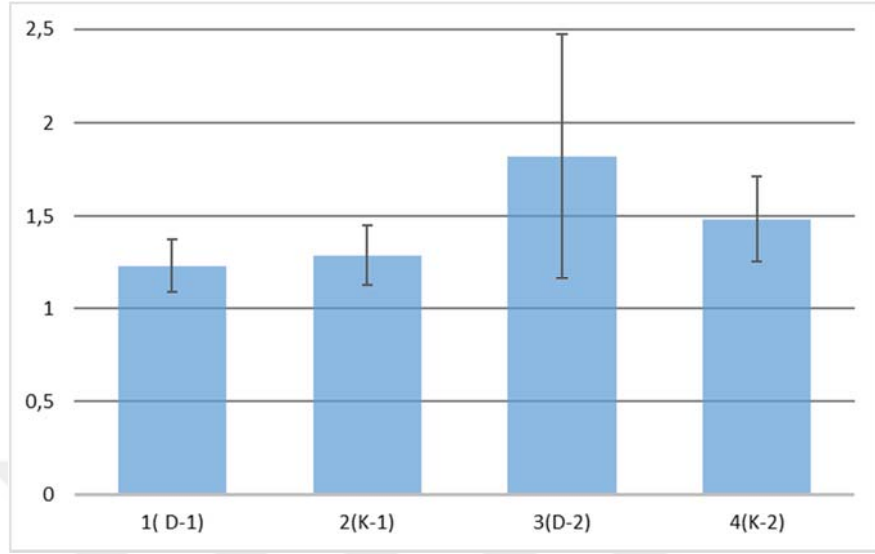
Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 oranı en yüksek Grup-3 (D-2)'de ($1,820413 \pm 0,6536185$), en düşük Grup-1 (D-1)'de ($1,231153 \pm 0,142494$) bulunmuştur. Grup-1 (D-1) ile Grup-3 (D-2) arasındaki fark istatistiksel olarak

anlamli değildir ($p>0,05$). Grup-2 (K-1) ($1,286876 \pm 0,162056$) ve Grup-4 (K-2) ($1,485004 \pm 0,227159$) arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamli değildir ($p>0,05$).

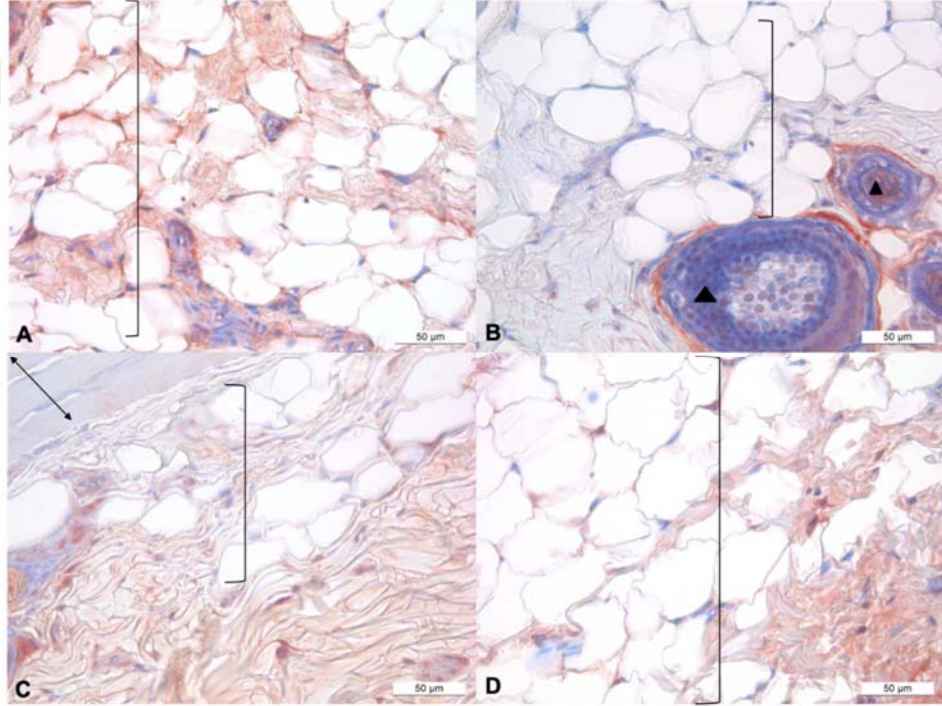
Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 oranı ortalamaları açısından kontrol grubu-deney grubu karşılaştırmalarında da anlamli fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 oranı ortalamaları Şekil-4.9’da grafik şeklinde gösterilmiştir. Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 oranı ortalamaları açısından yapılan değerlendirmelere ait p değerleri Tablo-4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Hipodermis Kollajen-1/3 oranına göre gruplar arası karşılaştırmalar.

HİPODERMİS KOLLAJEN-1/3 ORANI		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,541
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,263
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,056
Grup-2 (K-1)	Grup-4 (K-2)	0,113

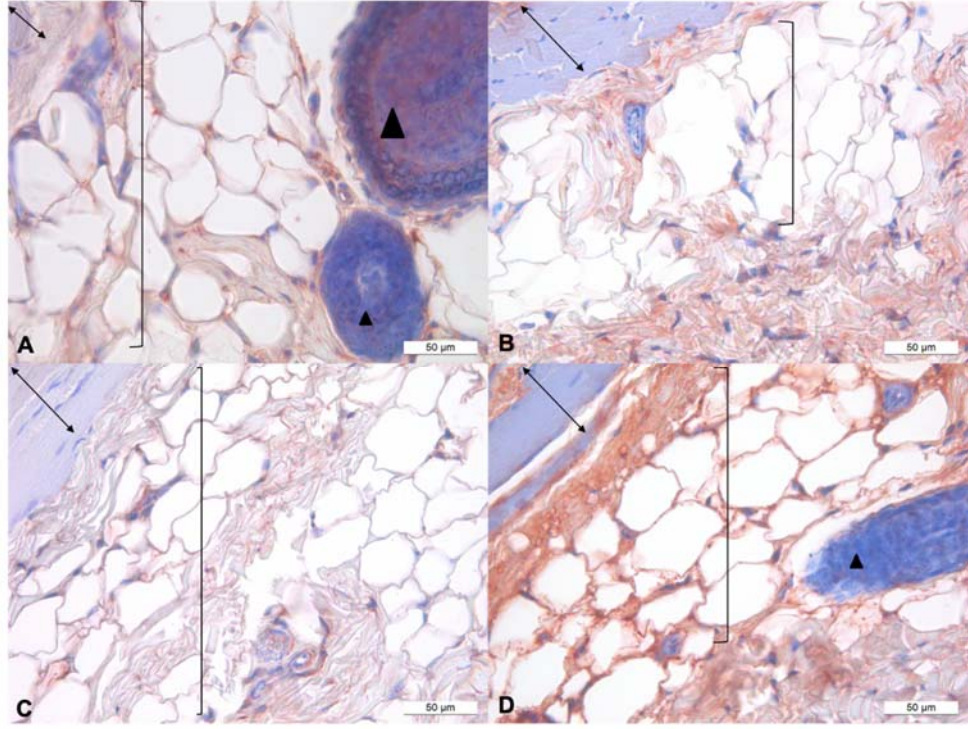


Şekil 4.9: Hipodermis Kollajen-1/Kollajen-3 oranlarını gösteren grafik
(Ortalama±SS)



Şekil 4.10: K-1(A), D-1(B), K-2 (C), D-2(D) gruplarından örneklere ait mikrograflar (Kollajen tip 1 immünohistokimyasal boyama).

Cilt altı yağ dokusu parantez (]), cilt altı kas dokusu çift taraflı ok(↔), kıl kökleri ise üçgen kullanılarak işaretlenmiştir. Kollajen tip 1 kırmızı renkli görünmektedir

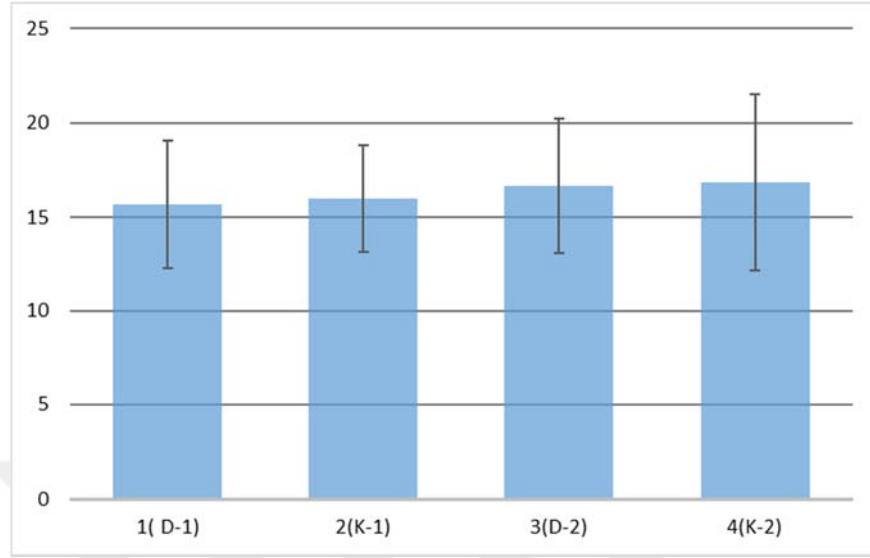


Şekil 4.11: Kontrol1(A), deney 1(B), kontrol2 (C), deney 2(D) gruplarından örneklerle ait mikrograflar (Kollajen tip 3 immünohistokimyasal boyama)

Cilt altı yağ dokusu parantez (]), cilt altı kas dokusu çift taraflı ok($\leftrightarrow$), kıl kökleri ise üçgen kullanılarak işaretlenmiştir. Kollajen tip 3 kırmızı kromojenle işaretlenmiştir.

4.2.7. Kıl Uzunluğu

Kıl uzunluğu açısından gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Kıl uzunluğu ortalamaları Şekil-4.12’de grafik olarak gösterilmiştir. Kıl uzunluğu açısından gruplar arasında yapılan değerlendirmelere ait p değeri Tablo-4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12: Kıl uzunluklarını (mm) gösteren grafik (Ortalama±SS)

Tablo 4.8: Kıl uzunluğuna göre gruplar arası karşılaştırmalar

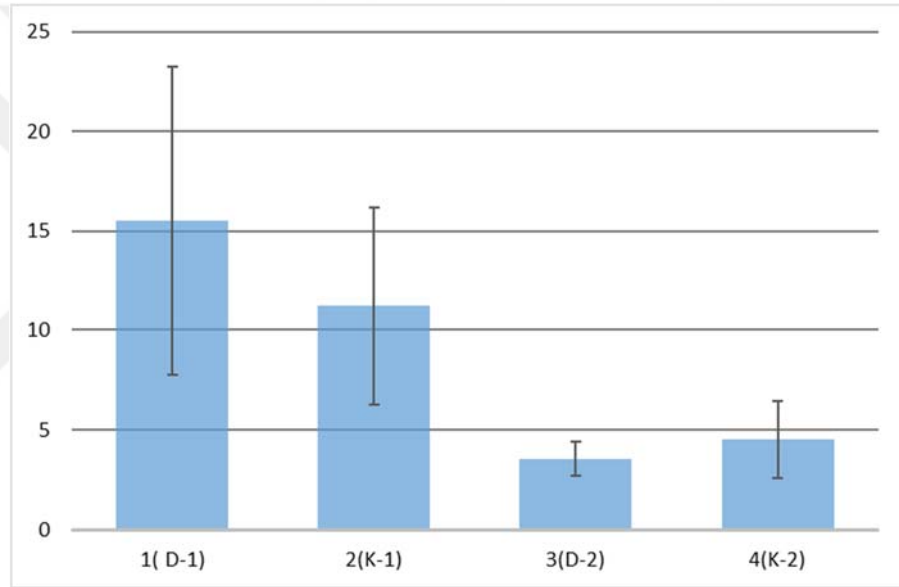
KIL UZUNLUĞU		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,857
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,946
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,629
Grup-2 (K-1)	Grup-4 (K-2)	0,716

4.2.8. Kıl Folikülü Sayısı

Birim alanda (mm^2) kıl folikülü sayısı en yüksek Grup-1 (D-1)'de ($15,51 \pm 7,77$), en düşük Grup-3 (D-2)'de ($3,55 \pm 0,83$) bulunmuştur. Bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,004$). Grup-2 (K-1)'de ($11,22 \pm 4,96$) kıl folikülü sayısı Grup-4 (K-2)'ten ($4,50 \pm 1,91$) yüksek bulunmuştur. Bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,034$).

Birim alanda kıl folikülü sayısı 1 kez işlem yapılan gruplarda (D-1+K-1)

($13,36 \pm 6,61$) ve 2 kez işlem yapılan gruplardan (D-2+K-2) ($4,03 \pm 1,49$) yüksek bulunmuştur. Bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Birim alanda kıl folikülü sayısı açısından diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Birim alanda kıl folikülü sayısı ortalamaları Şekil-4.13’de grafik şeklinde gösterilmiştir. Karşılaştırmalara ait p değeri Tablo-4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.13: mm2 de kıl folikülü sayısını gösteren grafik (Ortalama±SS)

Tablo 4.9: Birim alanda (mm²) kıl folikülü sayısına göre gruplar arası karşılaştırmalar.

KIL FOLİKÜLÜ SAYISI / mm ²		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,281
Grup-3 (D-2)	Grup-4 (K-2)	0,294
Grup-1 (D-1) ↑	Grup-3 (D-2)	0,004*
Grup-2 (K-1) ↑	Grup-4 (K-2)	0,034*

(*: istatistiksel anlamlı p değeri, ↑: Ortalaması yüksek grup)

4.2.9. Sebase Bez Alanı

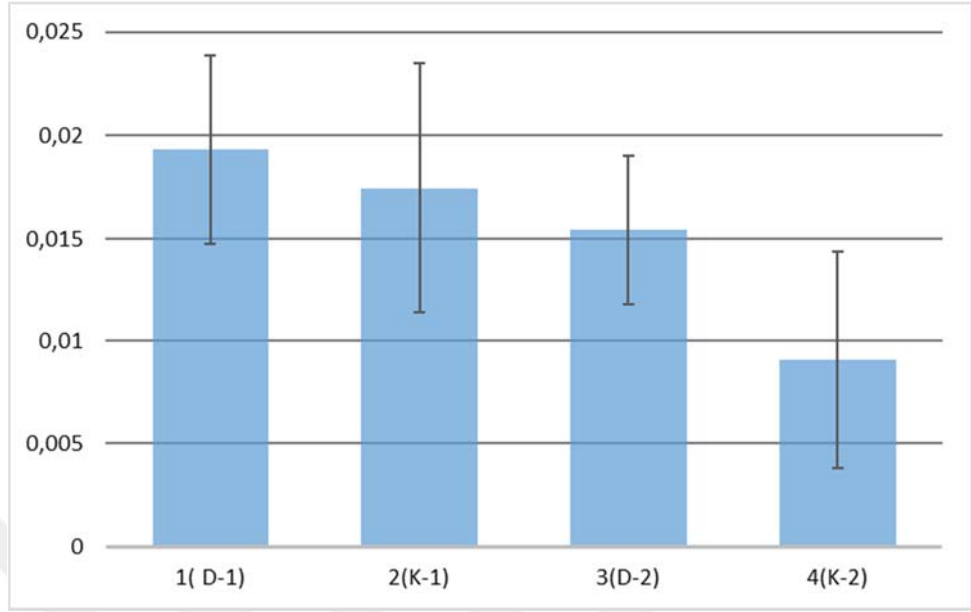
Dermisteki sebase bezlerin alanı, toplam dermis alanına oranlanarak değerlendirilmiştir. Bu oran en yüksek Grup-1 (D-1)'de ($0,019306 \pm 0,004571$) en düşük Grup-4 (K-2)'de ($0,09099 \pm 0,005290$) bulunmuştur. Grup-3 (D-2) 'deki oran ($0,01542 \pm 0,003591$), Grup-4 (K-2) ile kıyaslandığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,036$). Grup-2 (K-1) oranı ($0,017426 \pm 0,006056$) Grup-4 (K-2) oranından yüksek ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,03$).

Sebase bez alanı/dermis alanı oranı açısından diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Sebase bez alanı/dermis alanı oranı ortalamaları Şekil-4.14'te grafik şeklinde gösterilmiştir. Karşılaştırmalara ait p değeri Tablo-4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10: Sebase bez alanı/dermis alanı oranlarına göre gruplar arası karşılaştırmalar.

SEBASE BEZ ALANI / DERMİS ALANI		
Karşılaştırılan Gruplar		p değeri
Grup-1 (D-1)	Grup-2 (K-1)	0,557
Grup-3 (D-2) ↑	Grup-4 (K-2)	0,036*
Grup-1 (D-1)	Grup-3 (D-2)	0,133
Grup-2 (K-1) ↑	Grup-4 (K-2)	0,03*

(*: istatistiksel anlamlı p değeri, ↑: Ortalaması yüksek grup)



Şekil 4.14: Sebase bez alanı/dermis alanı oranlarını gösteren grafik
(Ortalama±SS)

5. TARTIŞMA

Botulinum nörotoksini (BT), 1970’li yıllardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve günümüzde bir çok tedavi protokolünde yerini almıştır (1). Temel etki mekanizması olan sinir-kas kavşağında asetilkolin salınımını inhibisyonu nedeniyle, ilk kullanım alanı kas spazmları ve distoniler olurken, estetik uygulamaların kullanımıyla beraber BT en sık uygulanan estetik prosedür haline gelmiştir (2). Klinik çalışmalarda, uzun süreli tedavilerde etkinliği ve güvenirliliğinin de yüksek olduğu ortaya konmuştur (71).

Yaklaşık 50 yıllık geçmişine rağmen günümüzde çeşitli hastalıkların veya bozuklukların tedavisinde, BT için yeni kullanım endikasyonları araştırılmaktadır. Sebase kistler, akne, rozesea, psöriazis, keloidler ve skarlar gibi deri ile ilişkili durumlar ve asetilkolin dışındaki Substance P ve CGRP gibi nörotransmitterler üzerindeki etkileri bu tür araştırmaların konusunu oluşturmaktadır (3).

Literatürde çok sayıda araştırmaya konu olmasına rağmen BT’nin deri tabakaları ve deri eklerinin yapısında neden olduğu değişiklikleri doğrudan konu alan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada BT’nin deri üzerindeki etkileri, 3 ay ve 6 ay olmak üzere iki farklı sürede, kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Botulinum toksininin kas-sinir kavşağında neden olduğu etkinin kaslarda denervasyon atrofisine neden olması beklenen bir durumdur. Atrofi etkisi yüz ve bacak konturunun değiştirilmesinde istenen bir etki iken, baş ağrısı ve kırıksıklıkların tedavisi için istenmeyen bir etkidir (72). Guyuron ve ark. baş ağrısı tedavisi için BT

uygulanan 92 hastasında uygulama sonrası 1 ayda ortaya çıkan temporal kas atrofisinin, bir kaç ay sonra düzeldiğini bildirmişlerdir (73). Zhao ve ark. yine baş ağrısı endikasyonu ile BT uygulanan bir hastada corrugator supercilii atrofisinin uygulama sonrası 2,5 ayda başladığı ve 1. yılda geçtiğini bildirmişlerdir (74). Ward ve ark. ratlarda tibialis anterior kasına BT uyguladıkları deneysel çalışmalarında; SF uygulanan kontrol gruplarıyla da kıyaslama yapmış ve kas kitlesinde azalma olarak görülen atrofi etkisinin uygulama sonrası 1 ay ortaya çıktığını, 3. ay sonrası başlayan iyileşmeyle kasın normal boyutuna ulaşmasının 1 yıl sürdüğünü bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada yaptıkları fonksiyonel değerlendirme kas fonksiyonunu iyileşmesinin ise daha uzun sürdüğünü bildirilmiştir (75). Çalışmamızda, deri altında bulunan kas dokusu olan Panniculus Carnosus kalınlığının deney gruplarında kontrol gruplarına göre azaldığı görülmüştür. Bu fark tek uygulama yapılan gruplar arasında da, iki uygulama yapılan gruplar arasında da görülmüştür. Son BT uygulamasından sonra 3. ayda alınan doku örneklerinde bu etkinin görülmesi de literatürle paralellik göstermektedir.

El-Domyati ve ark. 16 gönüllü ile BT uygulamasından önce ve uygulamadan 3 ay sonra orbita lateralinden aldıkları punch biyopsi materyallerinin histolojik ve immünohistokimyasal özelliklerini inceledikleri klinik çalışmadaki bulguları şu şekildedir: histolojik değerlendirmede granüler hücre tabakasının kalınlığının artmış, epidermis ve dermis kalınlığında bir değişiklik olmamıştır; immünohistokimyasal değerlendirmede ise dermal kollajen-1 ve 3 yoğunluğu değerlendirilmiş ve fark bulunmamıştır. Çalışmamızda epidermis kalınlığı açısından BT uygulanan ve SF uygulanan gruplar arasında epidermis kalınlığı

açısından fark bulunmamıştır. Kontrol grupları arasında ise epidermal kalınlık 2 kez uygulama yapılan grupta anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Dermis kalınlığı ise 1 defa BT uygulanan grupta (Grup-1 (D-1)) kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Ancak 2 defa işlem yapılan gruplar arasında BT uygulanan grupta (Grup-3 (D-2)) kontrol grubundan (Grup-4 (K-2)) daha yüksek olmasına rağmen anlamlı fark bulunmamıştır. Bu bulgular epidermis ve dermis kalınlığı üzerinde BT'nin etkili olmadığını düşündürmektedir.

Hipodermis kalınlığı açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır. Literatürde ratlarda 12 hafta sonrasında epidermis, dermis ve hipodermis kalınlığının değişkenlik göstermediği belirtilmiştir (76).

Normlade deride Kollajen-1 %85, Kollajen-3 ise %10 kadar bulunmakta, Kollajen-3 skar ve fibrozis ile ilişkili durumlarda artmaktadır (53). Literatürde BT enjeksiyonlarının skar iyileşmesine katkı sağladığı ve keloid gibi aşırı skar dokusu oluşumuyla seyreden durumlarda tedavide kullanılabileceği yayınlar bulunmaktadır (77, 78). Oh ve ark. insan dermal fibroblast kültürlerinde yaptıkları deneysel çalışmada, BT'nin fibroblastlarda kollajen-1 sentezinde rol alan COL1A1 ve COL1A2 genlerinin ekspresyonunun artırabileceğini göstermişlerdir (79). Çalışmamızda hipodermiste kollajen yüzdesi açısından gruplar arasında bir fark bulunmamıştır. Kollajen-1 ve 3 ün birbirine oranı değerlendirildiğinde BT'nin kontrol gruplarına göre bir fark yaratmadığı görülmüştür. 2 kez enjeksiyon uygulanan gruplarda 1 kez uygulanan gruplara göre bu oran yüksek olmasına rağmen fark anlamlı değildir. Literatürdeki çalışmalarda doğrudan bu oranı

değerlendiren bir çalışma olmasa da enjeksiyon işleminin kendisinin, kollajen sentezini uyararak bu farka neden olabileceği düşünülmüştür.

Freund ve Schwartz, BT'nin erkek tipi alopesi şikayeti olan hastalar üzerinde 48 haftalık takipte sklapte saç sayısını artırdığını bildirmiştir (80). Singh ve ark. androjenik alopesisi olan 10 hastanın 8'inde BT'nin saç sayısını artırdığını belirtmiştir (81). Her iki çalışmada da bu etkinin, BT nin skalpte kas gevşemesine yol açtığını bunun da skalp dokusunun oksijenizasyonunu artırdığı fikri ön plana çıkmıştır. Bunun sonucunda 5- α redüktaz enziminin etkisinin azaldığı ve testosteronun dihidrotestosterona dönüşümünün azalmasıyla alopesinin azaldığı vurgulanmıştır. Zhang ve ark. yine benzer hasta grubunda BT tedavisi uygulamış ve 24 hastanın 11 inde 6 ay sonunda saç sayısında artış olduğunu bildirmiştir (82). Carloni ve ark. ise bu çalışmaların da dahil olduğu bir sistematik derleme yapmış, olumlu sonuçlar olmasına rağmen BT'nin etkinliğini yüksek kanıt seviyesinde destekleyen çalışmaların eksikliğini vurgulamıştır (83). Ratlarda erişkin dönemde kıl folikülü sayısında zamanla bir değişiklik olmadığı yine çalışmalarda ortaya konmuştur (76). Çalışmamızda BT gruplarıyla kontrol grupları arasında kıl uzunluğu ve mm²'de kıl folikülü sayısında bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak bir defa enjeksiyon yapılan gruplara göre iki defa enjeksiyon yapılan gruplarda mm²'de kıl folikülü sayısı yüksek bulunmuş bu da tekrarlayan enjeksiyonların kıl folikülü yoğunluğunu azaltabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

Küçükkaya ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları, yara ve deri grefti üzerine BT nin etkisini araştırdıkları deneysel çalışmada, histolojik inceleme de yapmış ve BT'nin yara ve deri grefti kontraksyonu azaltıcı etkisinin yanında kıl folikülleri ve

sebase bezleri de azalttığını belirtmişlerdir (84). Rose ve ark. alın bölgesine intradermal BT uygulanan 23 hastayı 3 ay takip etmiş ve sebum üretiminin tedavi öncesine göre anlamlı olarak azaldığını ortaya koymuşlardır (85). Min ve ark. 42 gönüllü üzerinde yine alın bölgesine BT uygulamış ve enjeksiyon bölgesinde sebum üretiminin belirgin şekilde arttığını ancak enjeksiyon bölgesinin 2,5 cm etrafındaki bölgede reaktif olarak artış olduğunu bildirmişlerdir (32). Bu çalışmaların yanında bu etkiyi sorgulayan çalışmalar da mevcuttur. Diğer çalışmalardan farklı olarak Kapoor ve ark. sebum üretimindeki azalmanın BT etkisinden mi yoksa enjeksiyon iğnesi etkisinden mi olduğunu araştırmak için 10 gönüllüde sağ ve sol yüz yarımında randomize şekilde intradermal BT ve SF enjeksiyonlarını uygulamış, 1. hafta ve 4. hafta yapılan değerlendirmede tüm yüz yarımalarında sebum üretiminde azalma olmasına rağmen BT ve SF arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda rat derisi uygun olmadığından sebum üretimi değerlendirilememiş ancak histolojik olarak sebase bezler değerlendirilmiştir. Sebase bez alanlarının dermis alanına oranlanmasıyla yapılan değerlendirmede iki defa SF uygulanan grupta, iki defa BT uygulanan ve bir defa SF uygulanan gruba göre sebase bezlerin azaldığı görülmüştür. BT gruplarıyla SF grupları kıyaslandığında, SF gruplarında sebase bez alanlarının azamış olduğu ancak bu fark iki defa enjeksiyon yapılan gruplar arasında anlamlı, tek enjeksiyon yapılan gruplar arasında anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu veriler ışığında BT'nin sebase bezlerin fonksiyonunu azaltıcı etkisi olsa da bunun SF ile kıyaslandığında belirgin olmadığı ve derinin yapısına histolojik olarak yansımadığı düşünülmüştür.

Bulstrode ve Grobbelaar yüz kırışıklıklarının tedavisi için uzun süreli BT tedavisi uyguladıkları 52 hastayı ortalama 16.3 ay takip etmişler ve 2 hastalarında istenmeyen etki olarak frontal bölgede kuruluk şikayeti olduğunu bildirmişlerdir. Etkin mekanizma olarak da ter bezlerinin salgısının BT nedeniyle azalması olduğu vurgulanmış. Bu hastaların ikisinin de erkek olması üzerine, kadın hastaların yüzleri için sıklıkla nemlendirici kullanmaları nedeniyle kuruluk şikayetinin kadınlarda belirgin olmayabileceğini belirtmişlerdir (86). Ratların dorsal derisinde ekrin ter bezlerinin bulunmaması nedeniyle çalışmamızda ter bezlerinin yapısına dair bir değerlendirme yapılamamıştır. Bunun yanında El-Domyati ve ark. çalışmasında (87) değerlendirilen granüler tabaka yapısı da ratlarda çok ince olduğu için değerlendirilememiştir.

Bu eksikliklere rağmen çalışmamız BT etkisini, SF enjesyonu yapılan kontrol gruplarıyla kıyaslaması açısından literatürdeki çalışmalardan ayrılmaktadır. Çalışmamızın değeri açısından bir diğer önemli nokta ise çalışma süresinin 6 ay olması ve histolojik değerlendirme yapılan diğer çalışmalardan daha uzun olmasıdır.

BT'nin deri üzerindeki etkisinin ortaya konulması adına, daha kapsamlı değerlendirmelerin yapıldığı deneysel çalışmalara ve negatif kontrol gruplarının bulunduğu, yüksek hasta sayısı ve uzun çalışma süresine sahip klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Abobotulinumtoksin A, deri üzerinde ve kıl yapısı üzerinde makroskopik değerlendirmede herhangi bir etkisi görülmemiştir. Kıl uzunlukları üzerinde de AboBT nin etkisi olmadığı görülmüştür.

Histolojik parametrelerden deri altında bulunan kas yapısı Panniculus Carnosus kalınlığını, kontrol grubuna göre azalttığı görülmüştür.

Üç ay arayla iki kez AboBT enjeksiyonunun, SF enjeksiyonu yapılan grupla karşılaştırıldığında sebase bez alanının dermis alanı oranının azalmasını önlediği görülmüş ancak bu etki bir kez enjeksiyon yapılan gruplarda görülmemiştir. Ayrıca 2 kez SF enjeksiyonu, bu oranın 1 kez SF enjeksiyonu yapılan gruba göre azalmasına neden olmuştur.

AboBT'nin mm²'de kıl folikülü sayısı üzerinde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında bir etkisi görülmemiştir. Ancak iki defa enjeksiyon yapılan gruplarda kıl foliküllerinin sayısının, bir defa enjeksiyon yapılan gruplara göre azaldığı görülmüştür.

Histolojik değerlendirmelerde, AboBT'nin epidermis, dermis ve hipodermis kalınlıkları üzerinde bir etkisi görülmemiştir. İmmünohistokimyasal değerlendirmede, hipodermiste kollajen-1 ve kollajen-3 üzerinde AboBT'nin etkisi görülmemiştir.

7. ÖZET

Ratlarda Abobotulinumtoxin-A Enjeksiyonlarının Deri Üzerindeki Uzun Süreli Etkilerinin Araştırılması

Botulinum nörotoksini, Clostridium botulinum tarafından üretilen, nöromusküler kavşakta asetilkolin salınımını bloke eden güçlü bir toksindir. Yedi farklı serotipi bulunan botulinum nörotoksininin, A ve B serotipleri 1970'li yıllardan itibaren çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve günümüzde en sık uygulanan estetik işlem haline gelmiştir. Literatürde çok sayıda çalışma botulinum toksinini konu almış olsa da deri üzerindeki uzun süreli etkileri üzerine araştırmalar kısıtlı sayıdadır. Çalışmamızın amacı uzun süreli botulinum nörotoksin uygulamasının deri yapısındaki etkilerinin deneysel olarak ortaya koyulması ve bu bilgiler ışığında klinik pratiğin değerlendirilmesine katkı sağlamaktır.

Çalışmada 24 adet Wistar abino türü erkek rat 4 gruba ayrıldı. Sırtta iliak krestin 1cm kraniyalinde belirlenen 2x3cm'lik alan da 6 noktada olacak şekilde enjeksiyonlar yapıldı. Grup-1'de (Deney Grubu-1) bir defa 100U/kg dozunda Abobotulinumtoxin A (AboBT), Grup-2'de (Kontrol Grubu-1) bir defa serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı. Grup-3 (Deney Grubu-2) ve Grup-4 (Kontrol Grubu-2) için sırasıyla aynı işlemler, 3 ay arayla 2 kez gerçekleştirildi. Son enjeksiyondan 3 ay sonra denekler sakrifiye edilerek makroskopik değerlendirme kıl uzunlukları ve deri örnekleri alınarak yapılan histolojik değerlendirmede epidermis, dermis, hipodermis, panniculus carnosus kalınlıkları, birim alanda kıl

folikülü sayısı, sebase bez alanlarının dermis alanına oranı, kollajen-1 ve 3 yüzdeleri ve birbirlerine oranları ele alındı.

AboBT enjeksiyonu yapılan gruplarda, kontrol gruplarına göre deri altındaki kas dokusu olan Panniculus Carnosus kalınlığı azalmış bulundu ($p<0,05$). Birim alandaki kıl folikülü sayısında 2 kez enjeksiyon yapılan gruplarda 1 kez enjeksiyon yapılan gruplara göre azalma olduğu görüldü ($p<0,05$). SF enjeksiyonu yapılan gruplarda sebase bez alanının dermis alanına oranı 2 kez enjeksiyonla azalmış, 2 kez AboBT enjeksiyonunun bu etkiyi azalttığı görülmüştür ($p<0,05$). Diğer parametrelerde AboBT'nin etkisi anlamlı değildir.

Abobotulinumtoxin A enjeksiyonlarının uzun süreli uygulanmasında kas kalınlığını azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür. Botulinum toksin uygulamalarının deri yapısındaki etkileri değerlendiren, uzun süreli çalışmalarla bu konunun araştırılması klinik uygulamalara yol gösterici olması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Botulinum Nörotoksin, Abobotulinumtoxin A, Deri

8. SUMMARY

The Long-term Effects of Abobotulinumtoxin A on Skin in A Rat Model

Botulinum neurotoxin (BT) is a potent toxin, produced by *Clostridium botulinum*, that blocks release of acetylcholine in neuromuscular junction. Serotype A and B have been used in various medical treatments since 1970s. BT injections have become the most popular aesthetic procedure. Although there is lots of researches about BT, the number of publications investigating the effect on skin structure of it is limited. The aim of our study is elucidating the long-term effect of BT on skin experimentally and making contribution to the reassessment of clinical practice.

The study designed with a total of 24 male, Wistar rats divided in 4 groups. Injections were made at 6 point in 2x3 cm area localized 1 cm cranial to the iliac crest. In Group-1 (Experimental Group-1), single dose of (100U/kg) Abobotulinumtoxin A (AboBT), in Group-2 (Control Group-1), saline (SF) injection was performed. In Group-3 (Experimental Group-2) and Group-4 (Control Group-2), AboBT and SF injected 2 times with an interval of 3 months, respectively. 3 months after the last injection, the subjects were sacrificed and the hair lengths at the injection site were measured. Skin samples were taken and histological evaluation of epidermis, dermis, hypodermis, panniculus carnosus thickness, number of hair follicles per unit area, ratio of sebaceous gland areas to dermis area, collagen-1 and 3 percentages and their ratios to each other were evaluated.

Panniculus Carnosus, the subcutaneous muscle tissue, thickness was found to be decreased in the groups with the injection of AboBT compared to the control groups ($p < 0.05$). There was a decrease in the number of hair follicles per unit area in groups that were injected 2 times compared to the single injection groups ($p < 0.05$). In the saline injected groups, the ratio of sebaceous gland area to the dermis area decreased with 2 injections, besides 2 times of AboBT injection reduced this effect ($p < 0.05$). For other parameters, the effect of AboBT is not significant.

It has been observed that the long-term administration of Abobotulinumtoxin A injections have a decreasing effect on muscle thickness. Investigating this issue with long-term studies evaluating the effects of botulinum toxin applications on skin structure is important in terms of reevaluation of clinical practice.

Keywords: Botulinum Neurotoxin, Abobotulinumtoxin A, Skin

9.KAYNAKLAR

1. Noland ME, Lalonde DH, Yee GJ, Rohrich RJ. Current Uses of Botulinum Neurotoxins in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(3):519e-30e.
2. Aesthetic Plastic Surgery National Databank Statistics. The Aesthetic Society®; 2019.
3. Benedetto AV. Botulinum Toxins in Clinical Aesthetic Practice 3E, Volume One: Clinical Adaptations: Taylor & Francis Group; 2018.
4. Schantz EJ, Johnson EA. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. *Perspect Biol Med*. 1997;40(3):317-27.
5. Scott AB. Development of botulinum toxin therapy. *Dermatol Clin*. 2004;22(2):131-3, v.
6. Markey AC. Dysport. *Dermatol Clin*. 2004;22(2):213-9.
7. Monheit GD, Pickett A. AbobotulinumtoxinA: A 25-Year History. *Aesthet Surg J*. 2017;37(suppl_1):S4-S11.
8. Sharma SK, Singh BR. Hemagglutinin binding mediated protection of botulinum neurotoxin from proteolysis. *J Nat Toxins*. 1998;7(3):239-53.
9. Wohlfarth K, Müller C, Sassin I, Comes G, Grafe S. Neurophysiological double-blind trial of a botulinum neurotoxin type a free of complexing proteins. *Clinical neuropharmacology*. 2007;30(2):86-94.
10. Rzany BJ, Ascher B, Avelar RL, Bergdahl J, Bertucci V, Bodokh I, et al. A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Dose, Phase III, Non-Inferiority Study Comparing PrabotulinumtoxinA and OnabotulinumtoxinA for the Treatment of Moderate to Severe Glabellar Lines in Adult Patients. *Aesthet Surg J*. 2020;40(4):413-29.
11. Aoki KR. Pharmacology, immunology, and current developments. In: Benedetto AV, editor. *Botulinum Toxins in Clinical Aesthetic Practice*. Second Edition ed: Informa Healthcare; 2011. p. 1-14.
12. Zhang L, Lin WJ, Li S, Aoki KR. Complete DNA sequences of the botulinum neurotoxin complex of *Clostridium botulinum* type A-Hall (Allergan) strain. *Gene*. 2003;315:21-32.
13. Hambleton P, Capel BJ, Bailey NJ, Heron N, Crooks AJ, Melling JR, et al. Production, purification and toxoiding of *Clostridium Botulinum* type A toxin. In: GEJ L, editor. *Biomedical Aspects of Botulism*. New York: Academic Pres, Inc.; 1981. p. 247-60.

14. Lacy B, Tepp W, Cohen A, DasGupta B, Stevens R. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature Structural & Molecular Biology*. 1998;5:898-902.
15. Kedlaya D. Botulinum Toxin 2019 [Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/325451-overview#a1>].
16. Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354(1381):259-68.
17. Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(10):1578-83.
18. Duchen LW. An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J Neurol Sci*. 1971;14(1):47-60.
19. Rogozhin AA, Pang KK, Bukharaeva E, Young C, Slater CR. Recovery of mouse neuromuscular junctions from single and repeated injections of botulinum neurotoxin A. *J Physiol*. 2008;586(13):3163-82.
20. Gordon MF, Barron R. Effectiveness of repeated treatment with botulinum toxin type A across different conditions. *South Med J*. 2006;99(8):853-61.
21. Filippi GM, Errico P, Santarelli R, Bagolini B, Manni E. Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta Otolaryngol*. 1993;113(3):400-4.
22. Naumann M, So Y, Argoff CE, Childers MK, Dykstra DD, Gronseth GS, et al. Assessment: Botulinum neurotoxin in the treatment of autonomic disorders and pain (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2008;70(19):1707-14.
23. Ishikawa H, Mitsui Y, Yoshitomi T, Mashimo K, Aoki S, Mukuno K, et al. Presynaptic effects of botulinum toxin type A on the neuronally evoked response of albino and pigmented rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Japanese journal of ophthalmology*. 2000;44(2):106-9.
24. Lowe NJ, Yamauchi PS, Lask GP, Patnaik R, Moore D. Botulinum toxins types A and B for brow furrows: preliminary experiences with type B toxin dosing. *J Cosmet Laser Ther*. 2002;4(1):15-8.
25. Hsiung GY, Das SK, Ranawaya R, Lafontaine AL, Suchowersky O. Long-term efficacy of botulinum toxin A in treatment of various movement disorders over a 10-year period. *Mov Disord*. 2002;17(6):1288-93.

26. Naumann M, Lowe NJ, Kumar CR, Hamm H, Hyperhidrosis Clinical Investigators G. Botulinum toxin type a is a safe and effective treatment for axillary hyperhidrosis over 16 months: a prospective study. *Arch Dermatol*. 2003;139(6):731-6.
27. Wilke K, Martin A, Terstegen L, Biel S. Neurobiology of skin appendages: eccrine, apocrine, and apoeccrine sweat glands. *Neuroimmunology of the Skin*: Springer; 2009. p. 167-75.
28. Lindh B, Hökfelt T. Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. *Progress in brain research*. 84: Elsevier; 1990. p. 175-91.
29. Plewig G, Kligman AM. *Acne and rosacea*: Springer Science & Business Media; 2012.
30. Li ZJ, Park SB, Sohn KC, Lee Y, Seo YJ, Kim CD, et al. Regulation of lipid production by acetylcholine signalling in human sebaceous glands. *Journal of dermatological science*. 2013;72(2):116-22.
31. Turner IM, Agrillo T. Migraine, Botulinum Toxin type-A, and the Disappearing Sebaceous Cyst. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2005;45(2):166-7.
32. Min P, Xi W, Grassetti L, Trisliana Perdanasari A, Torresetti M, Feng S, et al. Sebum production alteration after botulinum toxin type A injections for the treatment of forehead rhytides: a prospective randomized double-blind dose-comparative clinical investigation. *Aesthetic surgery journal*. 2015;35(5):600-10.
33. Bloom BS, Payongayong L, Mourin A, Goldberg DJ. Impact of intradermal abobotulinumtoxinA on facial erythema of rosacea. *Dermatologic Surgery*. 2015;41:S9-S16.
34. Ward NL, Kavlick KD, Diaconu D, Dawes SM, Michaels KA, Gilbert E. Botulinum neurotoxin A decreases infiltrating cutaneous lymphocytes and improves acanthosis in the KC-Tie2 mouse model. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(7):1927.
35. Ziade M, Domergue S, Batifol D, Jreige R, Sebbane M, Goudot P, et al. Use of botulinum toxin type A to improve treatment of facial wounds: a prospective randomised study. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. 2013;66(2):209-14.
36. Shaarawy E, Hegazy RA, Abdel Hay RM. Intralesional botulinum toxin type A equally effective and better tolerated than intralesional steroid in the treatment of keloids: a randomized controlled trial. *Journal of cosmetic dermatology*. 2015;14(2):161-6.
37. Jeong HS, Lee BH, Sung HM, Park SY, Ahn DK, Jung MS, et al. Effect of botulinum toxin type A on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue. *Plastic and reconstructive surgery*. 2015;136(2):171e-8e.
38. Permatasari F, Hu Y-y, Zhang J-a, Zhou B-r, Luo D. Anti-photoaging potential of Botulinum Toxin Type A in UVB-induced premature senescence of human dermal fibroblasts in vitro

- through decreasing senescence-related proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2014;133:115-23.
39. Jung J-A, Kim B-J, Kim M-S, You H-J, Yoon E-S, Dhong E-S, et al. Protective Effect of Botulinum Toxin against Ultraviolet-Induced Skin Pigmentation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2019;144(2):347-56.
 40. Friedland S, Burde RM. Porcelainizing discolorization of the periorcular skin following botulinum A toxin injections. *Journal of neuro-ophthalmology: the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. 1996;16(1):70-2.
 41. Goschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies--therapeutic consequences. *Exp Neurol*. 1997;147(1):96-102.
 42. Dolimbek BZ, Aoki KR, Steward LE, Jankovic J, Atassi MZ. Mapping of the regions on the heavy chain of botulinum neurotoxin A (BoNT/A) recognized by antibodies of cervical dystonia patients with immunoresistance to BoNT/A. *Mol Immunol*. 2007;44(5):1029-41.
 43. Brin MF, Comella CL, Jankovic J, Lai F, Naumann M, Group CDBS. Long-term treatment with botulinum toxin type A in cervical dystonia has low immunogenicity by mouse protection assay. *Mov Disord*. 2008;23(10):1353-60.
 44. Yablon SA, Brashear A, Gordon MF, Elovic EP, Turkel CC, Daggett S, et al. Formation of neutralizing antibodies in patients receiving botulinum toxin type A for treatment of poststroke spasticity: a pooled-data analysis of three clinical trials. *Clin Ther*. 2007;29(4):683-90.
 45. Bakheit AM, Fedorova NV, Skoromets AA, Timerbaeva SL, Bhakta BB, Coxon L. The beneficial antispasticity effect of botulinum toxin type A is maintained after repeated treatment cycles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(11):1558-61.
 46. Zuber M, Sebald M, Bathien N, de Recondo J, Rondot P. Botulinum antibodies in dystonic patients treated with type A botulinum toxin: frequency and significance. *Neurology*. 1993;43(9):1715-8.
 47. Frevert J, Dressler D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? *Biologics*. 2010;4:325-32.
 48. Solstice Neurosciences, Inc. Myobloc® (rimabotulinumtoxinB) Prescribing Information. 2019.
 49. Naumann M, Carruthers A, Carruthers J, Aurora SK, Zafonte R, Abu-Shakra S, et al. Meta-analysis of neutralizing antibody conversion with onabotulinumtoxinA (BOTOX(R)) across multiple indications. *Mov Disord*. 2010;25(13):2211-8.

50. Brashear A, Bergan K, Wojcieszek J, Siemers ER, Ambrosius W. Patients' perception of stopping or continuing treatment of cervical dystonia with botulinum toxin type A. *Mov Disord.* 2000;15(1):150-3.
51. Ipsen Biopharm Ltd. Dysport® (abobotulinumtoxinA) Prescribing Information. 2019.
52. Goldsmith LA. My organ is bigger than your organ. *Archives of dermatology.* 1990;126(3):301-2.
53. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology*: Elsevier Health Sciences; 2016.
54. Baker SR. *Local Flaps in Facial Reconstruction*: Elsevier/Saunders; 2014.
55. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics.* 2011;19(2):229-34.
56. Yaar M, Gilchrist B. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clinical and experimental dermatology.* 2001;26(7):583-91.
57. Grewe M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. *Clinical and experimental dermatology.* 2001;26(7):608-12.
58. Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental biology.* 2009;336(1):76-83.
59. Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clinical orthopaedics and related research.* 1992(282):250-72.
60. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New England Journal of Medicine.* 1997;337(20):1419-29.
61. Fligiel SE, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *Journal of Investigative Dermatology.* 2003;120(5):842-8.
62. Christiano AM, Uitto J. Molecular pathology of the elastic fibers. *Journal of investigative dermatology.* 1994;103.
63. Church MK, Clough GF. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 1999;83(5):471-5.
64. Braverman IM, editor *The cutaneous microcirculation. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 2000: Elsevier.

65. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas: Academic Press; 2017.
66. Maynard RL, Downes N. Anatomy and Histology of the Laboratory rat in Toxicology and Biomedical Research: Academic Press; 2019.
67. Casal D, Pais D, Iria I, Mota-Silva E, Almeida MA, Alves S, et al. A Model of Free Tissue Transfer: The Rat Epigastric Free Flap. *J Vis Exp*. 2017(119).
68. Park TH, Park YJ. The effect of botulinum toxin a on ischemia-reperfusion injury in a rat model. *BioMed research international*. 2017;2017.
69. Roh TS, Jung BK, Yun I, Lew DH, Kim YS. Effect of botulinum toxin A on vasoconstriction and sympathetic neurotransmitters in a murine random pattern skin flap model. *Wound Repair and Regeneration*. 2017;25(1):75-85.
70. Kim SB, Ban B, Jung KS, Yang GH. A pharmacodynamic comparison study of different botulinum toxin type a preparations. *Dermatologic Surgery*. 2013;39(1pt2):150-4.
71. Carruthers A, Sadick N, Brandt F, de Almeida ART, Fagien S, Goodman GJ, et al. Evolution of facial aesthetic treatment over five or more years: a retrospective cross-sectional analysis of continuous onabotulinumtoxinA treatment. *Dermatologic Surgery*. 2015;41(6):693-701.
72. Durand PD, Couto RA, Isakov R, Yoo DB, Azizzadeh B, Guyuron B, et al. Botulinum toxin and muscle atrophy: a wanted or unwanted effect. *Aesthetic surgery journal*. 2016;36(4):482-7.
73. Guyuron B, Rose K, Kriegler JS, Tucker T. Hourglass deformity after botulinum toxin type A injection. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2004;44(3):262-4.
74. Zhao Ch, Stillman M. Atrophy of corrugator supercilii muscle in a patient induced by the onabotulinum toxin injection. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2012;52(2):309-11.
75. Ward SR, Minamoto VB, Suzuki KP, Hulst JB, Bremner SN, Lieber RL. Recovery of rat muscle size but not function more than 1 year after a single botulinum toxin injection. *Muscle & nerve*. 2018;57(3):435-41.
76. Ikawa A, Ishii Y, Suzuki K, Yasoshima A, Suzuki N, Nakayama H, et al. Age-related changes in the dorsal skin histology in Mini and Wistar rats. *Histology and histopathology*. 2002.
77. Kim YS, Lee HJ, Cho SH, Lee JD, Kim HS. Early postoperative treatment of thyroidectomy scars using botulinum toxin: a split-scar, double-blind randomized controlled trial. *Wound Repair and Regeneration*. 2014;22(5):605-12.

78. Chen H-C, Yen C-I, Yang S-Y, Chang C-J, Yang J-Y, Chang S-Y, et al. Comparison of steroid and botulinum toxin type A monotherapy with combination therapy for treating human hypertrophic scars in an animal model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2017;140(1):43e-9e.
79. Oh SH, Lee Y, Seo YJ, Lee JH, Yang JD, Chung HY, et al. The potential effect of botulinum toxin type A on human dermal fibroblasts: an in vitro study. *Dermatologic surgery*. 2012;38(10):1689-94.
80. Freund BJ, Schwartz M. Treatment of male pattern baldness with botulinum toxin: a pilot study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;126(5):246e-8e.
81. Singh S, Neema S, Vasudevan B. A pilot study to evaluate effectiveness of botulinum toxin in treatment of androgenetic alopecia in males. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2017;10(3):163.
82. Zhang L, Yu Q, Wang Y, Ma Y, Shi Y, Li X. A small dose of botulinum toxin A is effective for treating androgenetic alopecia in Chinese patients. *Dermatologic Therapy*. 2019;32(4):e12785.
83. Carloni R, Pechevy L, Postel F, Zielinski M, Gandolfi S. Is there a therapeutic effect of botulinum toxin on scalp alopecia? Physiopathology and reported cases. A systematic review of the literature. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2020.
84. Kucukkaya D, Irkoren S, Ozkan S, Sivrioglu N. The effects of botulinum toxin A on the wound and skin graft contraction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2014;25(5):1908-11.
85. Rose AE, Goldberg DJ. Safety and efficacy of intradermal injection of botulinum toxin for the treatment of oily skin. *Dermatologic Surgery*. 2013;39(3pt1):443-8.
86. Bulstrode N, Grobbelaar A. Long-term prospective follow-up of botulinum toxin treatment for facial rhytides. *Aesthetic plastic surgery*. 2002;26(5):356-9.
87. El-Domyati M, Attia SK, El-Sawy AE, Mofteh NH, Nasif GA, Medhat W, et al. The use of Botulinum toxin-A injection for facial wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. *Journal of cosmetic dermatology*. 2015;14(2):140-4.

10 . ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ali SADİOĞLU

Doğum Tarihi : 30 Ekim 1988

Doğum Yeri : Diyarbakır

Eğitim:

Tıpta Uzmanlık: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı (2020)

Lisans: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (2013)

Lise: Ankara Fen Lisesi (2006)

İlköğretim: Özel M.Sabuncu İlköğretim Okulu, Elazığ (2003)

Yabancı Dil: İngilizce

Bilimsel Etkinlikler (aldığı burslar, ödüller, projeler, yayınlar):

1. Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği, 38. Ulusal Kurultayı, 27-30 Ekim 2016, Antalya, Türkiye
2. GÜDAM 21. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 14-22 Kasım 2107, Ankara, Türkiye
3. Rekonstrüktif Mikrocerrahi Derneği, 31. Temel Mikrocerrahi Kursu 9 - 13 Ocak 2018, İstanbul, Türkiye
4. The Aesthetic Meeting 2018, 26 Nisan-1 Mayıs 2018, New York, ABD
5. The Rhinoplasty Society Annual Meeting 2018 Thursday, April 26 Nisan 2018 New York, ABD
6. Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği, 40. Ulusal Kurultayı, 17-21 Ekim 2018, Antalya, Türkiye
7. Full Circle Rhinoplasty Live Surgery Meeting, 7-9 Mart 2019, İstanbul, Türkiye