

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA MEZOTERAPİSİNİN BOTULİNUM TOKSİN TİP-A İLE OLUŞTURULAN ÇİZGİLİ KAS PARALİZİSİNE İNHİBİTÖR ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. M. HAKAN BULAM

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. SÜHAN AYHAN

ANKARA 2012

ÖNSÖZ

Çalışmanın her aşamasında bilimsel ve teknik olarak bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışma boyunca bir ağabey yakınlığıyla yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sühan AYHAN'a;

Tez çalışmalarım sırasında değerli fikirsel desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Cemalettin ÇELEBİ'ye, Sayın Prof. Dr. Seyhan ÇENETOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Osman LATİFOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Selahattin ÖZMEN'e, Sayın Doç. Dr. Serhan TUNCER'e, Sayın Doç. Dr. Ayşe GÜLŞEN'e, Sayın Öğr. Gör. Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU'na;

Uzmanlık eğitimimde büyük katkıları olan bölümümüz emekli öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Kenan ATABAY ve Sayın Prof. Dr. Reha YAVUZER'e;

Çalışmanın elektronöromyografik incelemelerini büyük özveriyle yapan ve yorumlayan Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Murat ZİNNUROĞLU'na, genetik çalışmalarını yürüten Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ece Mercanoğlu KONAÇ'a ve Araş. Gör. Nuray VAROL'a;

Çalışmanın deneysel aşamalarının yürütüldüğü Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi veteriner hekimlerine ve personeline ve Gazi Üniversitesi Hastanesi Elektronöromyografi Laboratuvarı personeline;

Çalışmanın istatistiksel analizlerini yapan Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik AD.'ndan Dr. Duygu AYDIN'a

Tezimin her aşamasında yardımcı olan Dr. Billur SEZGİN'e ve yıllardır beraber çalıştığımız diğer tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Sevgili eşim Dr. Sibel Şahin BULAM ve canım oğlum Sinan Bartu BULAM'a;

Ve beni yetiştiren ve bugünlere getiren anneme, babama ve ablama;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. M. Hakan BULAM

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ 1

II. GENEL BİLGİLER 3

2.1 Trombosit ve Trombositten Zengin Plazma 3

2.2 Botulinum Toksin 9

2.3 Mezoterapi ve Napaj Yöntemi 17

2.4 Tavşan Anterior Auricular Kas Anatomisi ve Deney Modeli 20

2.5 Metalloproteazlar ve Metalloproteaz İnhibitörleri 24

III. GEREÇ VE YÖNTEM 25

3.1 Deney Öncesi Hazırlıklar 25

3.2 Trombositten Zengin Plazmanın Kullanıma Hazırlanması 27

3.3 Botulinum Toksinin Kullanıma Hazırlanması 29

3.4 Çalışma Grupları 30

3.5 Deney İçin Gerekli Araç-Gereçler 32

3.6 Değerlendirme Yöntemleri 33

3.7 Verilerin İstatistiksel Analiz Yöntemleri 43

IV. BULGULAR 44

4.1 Genel Değerlendirme Bulguları 44

4.2 Görsel Değerlendirme ve Fotoğrafik Kayıt Bulguları 44

4.3 Elektronöromyografik Değerlendirme Bulguları 49

4.4 Genetik Değerlendirme Bulguları 55

V. TARTIŞMA VE SONUÇ 60

VI. ÖZET 68

VII. İNGİLİZCE ÖZET 70

VIII. KAYNAKLAR 72

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otolog kanın santrifüj edilmesi ile elde edilen 'Trombositten Zengin Plazma' (TZP) on yıllardır başta Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi, Diş Hekimliği ve Ortopedi olmak üzere bir çok bölümün üzerinde yoğunlaştığı ve deneysel ve klinik çalışmalarla etkilerini araştırdığı bir kan ürünüdür.[1-6] TZP'nin kronik yara, kemik ve eklem kıkırdağı iyileşmesindeki etkileri, yüz gençleştirmedeki yeri, yağ ve kemik greftlerinin kalıcılığındaki rolü ve periodontal doku rejenerasyonundaki etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Yüksek konsantrasyondaki otolog trombositlerin aktive olarak alfa granülü içinde bulunan büyüme faktörleri (TGF-β, bFGF, PDGF vb.) ile progenitor hücreleri diferansiyasyona sürüklediği, hücre proliferasyonunu, anjiogenezi, epitelizasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunu arttırdığı ortaya konulmuştur.[7-10] TZP'nin fibroblast proliferasyonu ve kollajen artışı sağlayarak foto-yaşlanmayla oluşan yüz kırışıklıkların ve akne skarlarının belirginliğini azalttığı gösterilmiştir.[11-17] Trombositlerin alfa granülünün büyüme faktörlerinden başka pıhtılaşma faktörleri, glikoproteinler, proteoglikanlar, α-2 makroglobulin ve albumin gibi bir çok komponenti vardır. Son yıllarda TZP hazırlanmasında kullanılan yeni teknikler ile TZP uygulaması kolay, yan etki ve allerjik reaksiyon riski düşük, minimal invazif bir yöntem olarak yüz gençleştirme amacıyla intrakutanöz uygulama (mezoterapi) yoluyla kullanılmaya başlanmıştır.

Botulinum Toksin Tip-A (BTxA) Clostridium Botulinum'dan elde edilen, nöromuskuler bileşkede asetilkolin salımını inhibe ederek paralitik etkisini gösteren kuvvetli bir nörotoksindir. Enjekte edilebilecek ilaç formuna getirilmiş olarak Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Cerrahi, Göz Hastalıkları, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon bölümlerince sıkça kullanılmaktadır. Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'de mimik kaslarının aktivitesine bağlı oluşan yüz kırışıklıklarının tedavisinin yanında, hiperhidrozis, tortikollis, kas denervasyonu ve flep cerrahisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Bir yüz gençleştirme işlemi olarak BTxA uygulaması maliyeti düşük, etkinliği yüksek, güvenli bir yöntem olarak çok sık uygulanmaktadır.

BTxA ağır ve hafif zinciri olan, 150kD büyüklüğünde, metalloproteaz (çinko endopeptidaz) aktivitesi olan polipeptid bir yapıdadır. Motor-son-plakta kolinerjik sinir uçlarına endositoz yoluyla alınır. Sinir uyarımı sonrası asetilkolinin sinir terminaline ekzositozunda görev alan SNARE (Soluble N-ethylmaleimide–sensitive factor attachment

protein receptors) proteinlerine bağlanarak bu proteinlerde kırılma oluşturur. Sonuç olarak kas fibrillerinde aksiyon potansiyeli oluşamaz.[18]

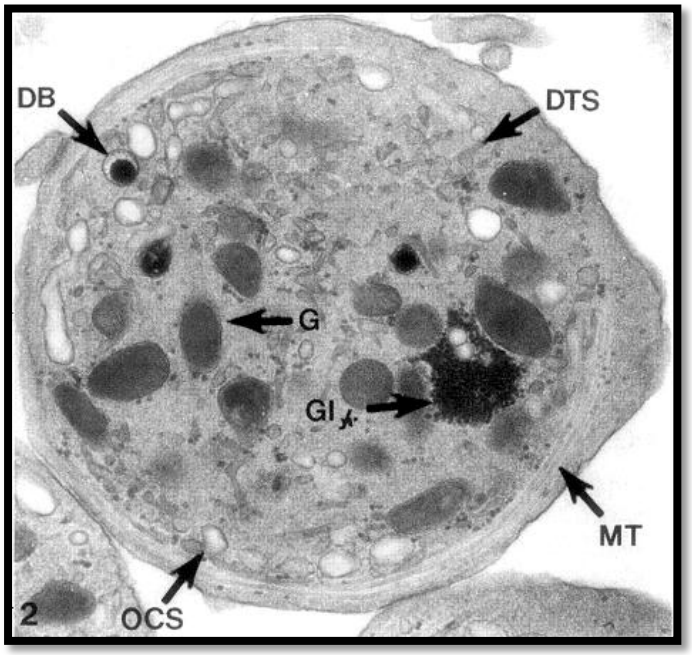
BTxA toksininin inhibisyonu için toksinin sinir terminaline endositoz yoluyla alımı noktasında, SNARE proteinleri üzerindeki proteolitik etkisini inhibe ederek, sinir terminalinde aksiyon potansiyelini uzatarak etki eden maddeler tanımlanmıştır.[19,20] Bu maddelerin bazılarının kendisinin toksik olması bazılarının ise yüksek konsantrasyonda etkili olmaları nedeniyle klinik kullanımları nadirdir.

TZP mezoterapisi ve BTxA intramuskuler enjeksiyonu yüzde aynı bölgelere (frontal bölge, periorbital bölge, nazolabial bölge vb.) uygulanabilmektedir. Klinik deneyimlerde bu uygulamalar birlikte yapıldığında BTxA'nın kas aktivitesine olan etkisinin daha az olduğu, hatta BTxA'nın etkisinin ortaya çıkmadığı gözlemlenmiştir. Literatür taramasında TZP ile BTxA arasında böyle bir etkileşimi gösterebilen ve açıklayabilen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı TZP mezoterapisinin, BTxA ile aynı anda uygulandığında BTxA tarafından oluşturulan çizgili kas paralizisi üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu çalışma yüz gençleştirme amacıyla çok sık kullanılan iki ürünün birbiri ile etkileşimini -varsa- ortaya koymasının yanında, botulinum toksin etkisini azaltabilecek veya inhibe edebilecek otolog bir kan ürününün varlığını da sorgulayacağından ayrıca önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 TROMBOSİT VE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA

Trombositler kemik iliğinde megakaryositler tarafından üretilirler. Çekirdeksiz ancak mitokondri ve mRNA içeren, 2-4µm çapında disk şeklinde parçacıklardır. Periferik dolaşıma geçtiğinde ortalama 8-10 gün yaşarlar. Bu bakımdan kanda yaşam döngüsü en hızlı olan hücresel elemandır. Periferik yaymada kümeler halinde gözlenirler. Periferik yaymada gruplar halinde izlenen trombositlere daha yakından bakıldığında açık mavi boyanan periferal "hyalomer" ve mor renkli granüller ve mitokondrilerden oluşan santral "granülomer" alanları görülür. Hücre zarında parmak gibi stoplazmaya doğru girinti yapan ve yüzeye açılan "açık kanaliküler sistem" ve hyalomer bölgesinde trombosit aktivasyonu için gerekli kalsiyumu depolayan "yoğun tübüler sistem" olarak adlandırılan iki fonksiyonel sistem vardır[21] (**Şekil 1**). Yüzey reseptörleri trombin, kollajen vb. tarafından uyarıldığında aktifleşen trombositler şekil değiştirerek psödopodlar içeren globüler bir şekil alır ve sitoplazmalarındaki granülleri açık kanaliküler sistem ile dışarı boşaltırlar.[22, 23]



Şekil 1: Trombosit yapısı (x19.000). DB (Dense Body): Yoğun Cisim, G: α-granül, Gly: Glikojen, MT: Mikrotübül, DTS (Dense Tubuler System): Yoğun Tübüler Sistem, OCS (Surface Connected Open Canalicular System): Açık Kanaliküler Sistem (White JG, Rao GH. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. Am J Pathol. 1998;152(2):597-609).

Granüller yoğunluk ve içeriklerine göre delta, alfa ve lambda olarak 3 çeşittir (**Tablo 1**).

Alfa Granül	Delta Granül (Yoğun Cisim)	Lambda Granül (Lizozomlar)
1) **Hemostaz Faktörleri** Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Protein S, Plazminojen vb. .	1) **Nükleotidler** ATP, ADP, GTP, GDP	1) **Asit Proteazlar** Katepsin D ve E, Karboksipepdidazlar, Kollajenaz, Asit Fosfataz, Arisülfataz
2) **Hücresel Mitojenler** PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, FGF-II vb.	2) **Aminler** Serotonin, Histamin	2) **Glikohidrolazlar** Heparinaz
3) **Glikoproteinler** Fibronektin, vWF, Trombospondin vb	3) **Çift değerlikli katyonlar** Kalsiyum, Magnezyum	
4) **Proteoglikanlar** PF4, HRGP, PBP vb.		
5) **Proteaz inhihitörleri α-2 makroglobulin α-2 antiplazmin**		
6) **Albumin-immünogloblinler**		

Tablo 1: Trombositlerde bulunan granüller ve içerikleri.

Alfa granüller 200-400 nm çapında, tek membranlı granüllerdir. Trombositlerin esas granülleridir. Hem hemostazda yer alan pıhtılaşma faktörlerini, hem de inflamasyon ve yara iyileşmesinde yer alan birçok protein ve büyüme faktörünü içerir. Aynı zamanda proteaz inhibitörleri içermektedir (α-2 makroglobulin, α-2 antiplazmin).[7] Delta granüller 250-300 nm çapındadır ve kalsiyum, ADP, ATP ve serotonin içerir. Lambda granüller ise asit hidrolaz gibi lizozomal enzimler içerir.

TROMBOSİTLERDEN SALINAN BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Dolaşımda bulunan trombositlerin α-granüllerinde VEGF, PDGF, TGF-β1, TGF-β2, bFGF gibi pek çok büyüme faktörü bulunur. Çeşitli uyaranlara karşı trombosit aktivasyonu olduğunda bu maddeler granüllerden salınır. TZP proliferatif etkilerini bu büyüme faktörleri üzerinden göstermektedir.[8-17]

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): PDGF yara iyileşmesinde makrofajları ve fibroblastları uyararak hücrelerin çoğalmasına, anjiogenezin artmasına, kollajen ve hyaluronik asit üretiminin artmasına, diğer büyüme faktörlerinin salınmasına, kemotaksise ve hücre fonksiyonlarının artmasına neden olur.[23-26] Mezenkimal hücreler için birincil mitojen olan bir büyüme faktörüdür. Yara iyileşmesinin yeniden şekillendirme aşamasında kollajenaz aktivasyonu yaparak katkı sağlar.[27-33] PDGF diyabet veya iskemi kaynaklı deri ülserlerinde yara iyileşmesini arttırmak amacıyla, maksillofasiyel cerrahide kemik grefti yerleştirilen bölgelerde, oral ve nazal fistüllerin onarımında ve kemik-entegre implantlarla birlikte kullanılmıştır.[34-42] Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş olan PDGF (Becaplermin 0,01%- Regranex OMP, Raritan, NJ) kronik yaralarda yara iyileştirmesini arttırmak amacıyla kullanılmıştır.[43,44]

Transforme edici büyüme faktörü (TGF-β): TGF-β1 ve TGF-β2 fibroblastları aktive ederek kollajen üretimini arttırır. Hücre büyümesi, farklılaşması ve ekstrasellüler matriks üretiminde rol alır.[37, 44, 45]

Fibroblast büyüme faktörü (FGF): Fibroblast, endotel, osteoblast, kondrosit ve keratinlerin çoğalmasını arttırır, anjiogenezde rol alır.[46-48] Keratinosit proliferasyonuna neden olur.[32]

İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1): IGF-1 fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast, mezangial eritroid progenitor hücreler gibi birçok hücre üzerinde proliferatif etkisi vardır.[49-50]

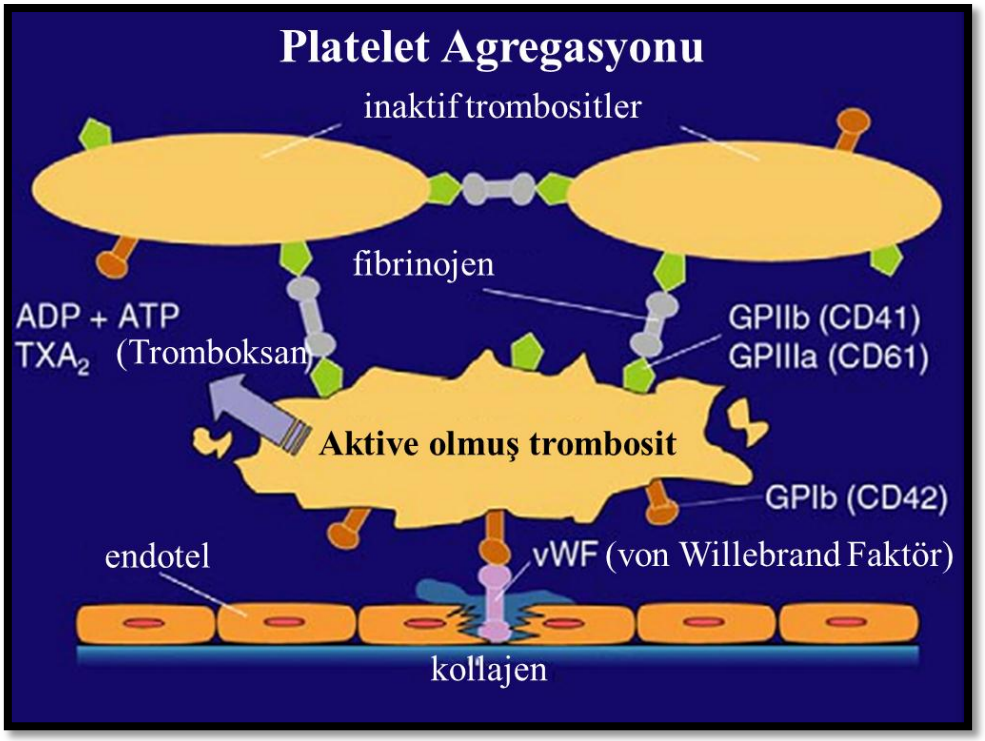
Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF): VEGF en kuvvetli anjiogenez uyarıcısıdır. Anjiogenezin farlık basamaklarında kollajenaz indüksiyonu ve α integrinlerin ekspresyonu sağlar. Vasküler geçirgenliği arttırır. Fibroblastların ve endotelyal hücrelerin proliferasyonu ve göçünde rol alır.[51,52]

Epidermal büyüme faktörü (EGF): Yara iyileşmesinin erken safhalarında fibronektin ve kollajen gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır.[53]

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA

Trombositlerin hemostaza katkıları ve fonksiyonlarının yanında içerdiği büyüme faktörleri ile yara iyileşmesine yaptığı katkı 2000'li yıllarda tespit edilmiştir.[7-10] Trombositler aktive olduklarında α-granülü içindeki pıhtılaşma faktörlerinin yanında birçok büyüme faktörünü de ortama salmaktadırlar. Santrüfüj edilerek yoğunluğu arttırılmış trombositlerin trombin ile in-vitro olarak aktive edilmesi veya dokuya uygulandığında kollajen ile teması (in-vivo aktivasyon) ile aktive olması temeline dayanan bir uygulamadır. İlk uygulamalarda kanın ve TZP'nin tüplerden aktarılmasında ve tekrarlayan santrifüjler nedeniyle kontaminasyon sorunları oluşmuştur. Bu nedenle TZP elde edilmesine yönelik kapalı sistemler geliştirilmiştir. Regen ACR (Regenlab, İsviçre), Hemagen PRP kit (Hemagen Biotechnology Labaratory, Kanada), Smart PReP (Harvest Technologies, ABD), Plateltex (Plateltex S.R.O, Çek Cumhuriyeti), gibi temelde venöz kanın santrifüj edilmesi ve trombosit konsantrasyonunun arttırılması olan birçok kit klinik kullanıma girmiştir. Kaux ve ark. 2011'de yaptığı çalışmada Regen ACR kitinin ve bu kit ile uygulanan prosedürün trombositleri biriktirmedeki etkinliği gösterilmiştir.[54]

Otolog kandan hazırlanması tercih edilse de allojenik kan ürünlerinden de hazırlanabilmektedir ancak bu durumda viral hastalık transmisyonu ve allerjik yan etkiler ortaya çıkabilir. Hastadan antikoagülan solüsyon (sodyum sitrat) içeren tüplere 8-60 cc kan alınır ve santrifüj işleminden geçirilir. Kırmızı kan hücreleri tabanda birikir onun hemen üzerinde trombositten zengin plazma onun da üzerinde trombositten fakir plazma bulunmaktadır. Farklı yöntemler ile elde edilen TZP'de trombosit konsantrasyonunu kana göre 3-11 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir.[10, 56] Mezoterapi şeklinde uygulanacak olan TZP'ye trombin veya kalsiyum ilavesi yapılmaz çünkü bu trombositleri in-vitro aktive eder ve pıhtılaşma ile trombosit jeli oluşmasına neden olur.[1, 2, 16, 17] Bu jel mezoterapi yöntemleri ile intradermal olarak uygulamaya elverişli değildir. Ancak kemik defektleri, yara iyileşmesi, sinir iyileşmesi çalışmalarında çalışılan dokunun üzerine konulacağı ve çevrede trombosit aktivasyonu sağlayabilecek yeterince kollajen olmadığı düşünüldüğünde gereklidir. Deri içine uygulanan trombositler buradaki zengin kollajen ağı içinde aktive olur (in-vivo aktivasyon) (**Şekil 2**).



Şekil 2: Trombositin kollajen ile teması ile aktivasyonu

TZP'nin klinik ve deneysel alanda kullanıma girmesi 90'lı yılların sonunda olmuştur. İlk kez Whitman ve arkadaşları 1997'de osteointegre titanyum implanlar ile yapılan maksillofasiyel ameliyatlarda kullanmıştır.[57] 1998'de Marx ve arkadaşları kansellöz kemik greftlerinde kemik iyileşmesine olumlu etkilerini saptamışlardır.[58] 2000'li yıllar ile TZP ile yapılan çalışmalar hızla artmıştır. Eppley ve arkadaşları 2004'te yara iyileşmesi üzerine[52], Fındıkçıoğlu ve arkadaşları 2009'da kalvarial kemik defektleri üzerine[40], Sarıguney ve arkadaşları 2008'de sinir iyileşmesi üzerine[59], Aspenberg ve arkadaşları ise 2004'te tendon iyileşmesine TZP'nin olumlu etkileri olduğunu saptamışlardır.[60] Birçok çalışma TZP'nin bu etkisinin vaskülarizasyonu, epitelizasyonu ve granülasyonu arttırarak sağladığını bildirmektedir.

Yüz germe, boyun germe, meme küçültme, karın germe ameliyatlarında kullanımının dren koyma ihtiyacında, seroma oluşumunda, ameliyat sonrası şişlik ve ağrı yakınmalarında azalma sağlayabileceği bildirilmiştir. TZP, özellikle hazırlama aşamasını kolaylaştıran ve kontaminasyon riskini düşüren TZP hazırlama kitlerinin üretilmesi ile yüz gençleştirme amacıyla başvuran hastalara sunabileceğimiz bir yöntem haline gelmiştir. Kim ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı çalışmada TZP'nin yüz gençleştirme amacıyla kullanımı ve etkinliği sorgulanmıştır. Bu çalışmada TZP'nin dermal fibroblastlar üzerinde kollajen

ekspresyonunu ve mRNA miktarını arttırıcı etki yaptığı ve yaşlı deride doku yeniden şekillendirilmesini (remodelling) arttırdığı saptanmıştır.[11] Nakamura ve arkadaşları ise 2010 yılında TZP'nin yağ grefti kalıcılığına etkisini araştırmışlardır. TZP'nin yağ grefti hacminin korunmasında ve yağ grefti sağkalımında etkin olduğu saptanmıştır.[61] Cervelli ve arkadaşları da 2009'da yüze uygulanan yağ grefti ve TZP karışımı ile olumlu klinik sonuçlarını bildirmiştir.[15]

Sonuç olarak TZP, etki mekanizması ve farklı dokular üzerindeki etkisi halen araştırılan, bir yandan da ulaşılan olumlu sonuçlar ile klinik kullanımı artan bir kan ürünüdür. Genellikle yüz gençleştirme amacıyla diğer prosedürler (laser, botulinum toksin uygulamaları, dolgu vb.) ile birlikte uygulanmaktadır.

2.2 BOTULİNUM TOKSİN TİP-A (BTX-A)

Botulinum toksini anaerobik sporlu gram (+) bir basil olan Clostridium Botulinum tarafından üretilen bir egzotoksindir. Dr. Justinus Kerner tarafından 1817 yılında tanımlanan bu toksin Botulizm olarak isimlendirilen besin zehirlenmesine neden olmaktadır. Klasik Botulizme özellikle geleneksel konserve yiyeceklerdeki uygun ortamda toksin üreten C. Botulinum neden olmaktadır. Botulizmde gıdaların yenmesinden 12-36 saat sonra başlayan çift görme, ptozis, midriazis, ağız kuruluğu, yutma güçlüğü ve ses kısıklığı şikayetleri görülür. Solunum yetmezliği ile ölüme neden olabilir.

Botulizm için ilk antiserum 1897'de W. Kemper tarafından bulunmuştur. 1949'da Bungen toksinin etki mekanizmasını tanımlamıştır. Scott intramuskuler uygulamalarda botulinum toksinin kas paralizisi etkisi ve güvenilir doz aralığı araştırmıştır ve 1973'te strabismus tedavisinde ilk kez kullanmıştır.[62] 1980'lerde FDA (Food and Drug Administration) onayını alan botulinum toksini ile strabismus, hemifasyal spazm ve blefarospazm tedavisinde ilk klinik uygulamalar yapılmıştır. Günümüzde botulinum toksini miyofasiyal ağrı sendromu, spazmodik disfoni, oromandibular distoni, kranioservikal distoni, Frey sendromu, Hirschsprung hastalığı, tortikollis, hiperhidrosis ve migrende de etkin olarak kullanılmaktadır.

Botulinum toksinini alnın ve göz çevresi kırışıklıkları için kullanımı ilk kez Jean Carruthers ve Alastair Carruthers tarafından tanımlanmıştır.[63] 1990'larda botulinum toksininin estetik amaçlarla kullanımı giderek yaygınlaşmıştır ve hiperkinetik mimik kasları ile oluşan kırışıklıklar ve platysma bantları için kullanılmıştır.[64] FDA 2002'de botulinum toksin uygulamalarını glabellar kırışıklıklar için onaylamıştır. 2011 ASAPS (The American Society for Aesthetic Plastic Surgery) verilerine göre yılda 2,5 milyondan fazla botulinum toksin enjeksiyonu yapılmaktadır.[65] Cerrahi olmayan girişimler içinde en sık yapılan girişimdir.

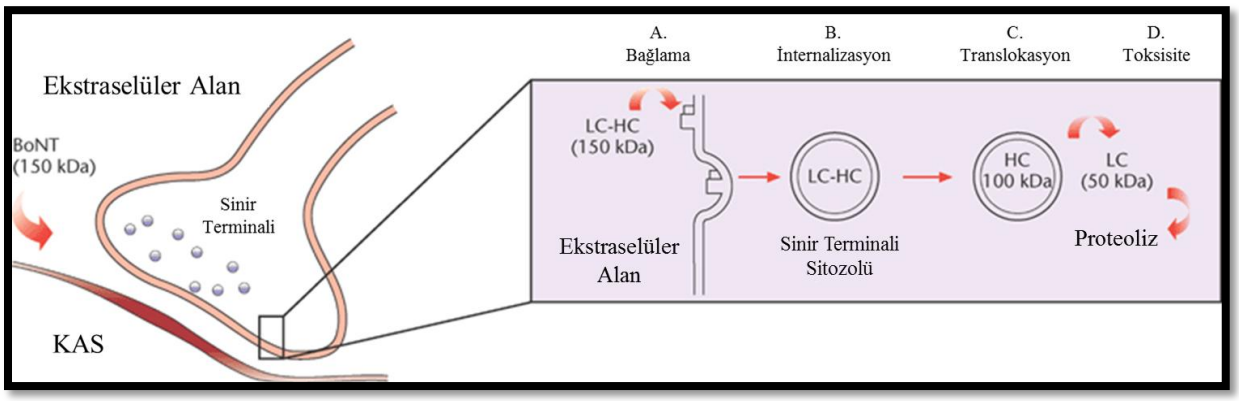
BOTULİNUM TOKSİNİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Botulinum toksinini periferik sinir sistemine etki eden kuvvetli bir nörotoksindir. Nöromusküler bileşkede presinaptik terminallerden asetil kolin salınımını inhibe ederek gevşek paralizi oluşturur. 100 kDa ağır zincir ve 50 kDa hafif zincirin disülfid bağıyla bir arada tutulduğu polipeptid yapıdadır.

Botulinum toksininin A, B, C1, C2, D, E,F ve G olmak üzere sekiz farklı serotipi tanımlanmıştır. Bunlardan Botulinum toksin tip A tıbbi uygulamalarda en sık kullanılan serotiptir.

Botulinum sporları çevresel şartlara çok dayanıklıdır ancak ekzotoksini sıcaklık ve pH değişikliklerine hassastır ve 80°C' de 10 dk.'da inaktive olur.[66]

Botulinum toksini 4 aşamalı bir mekanizma ile etki eder (**Şekil 3**):



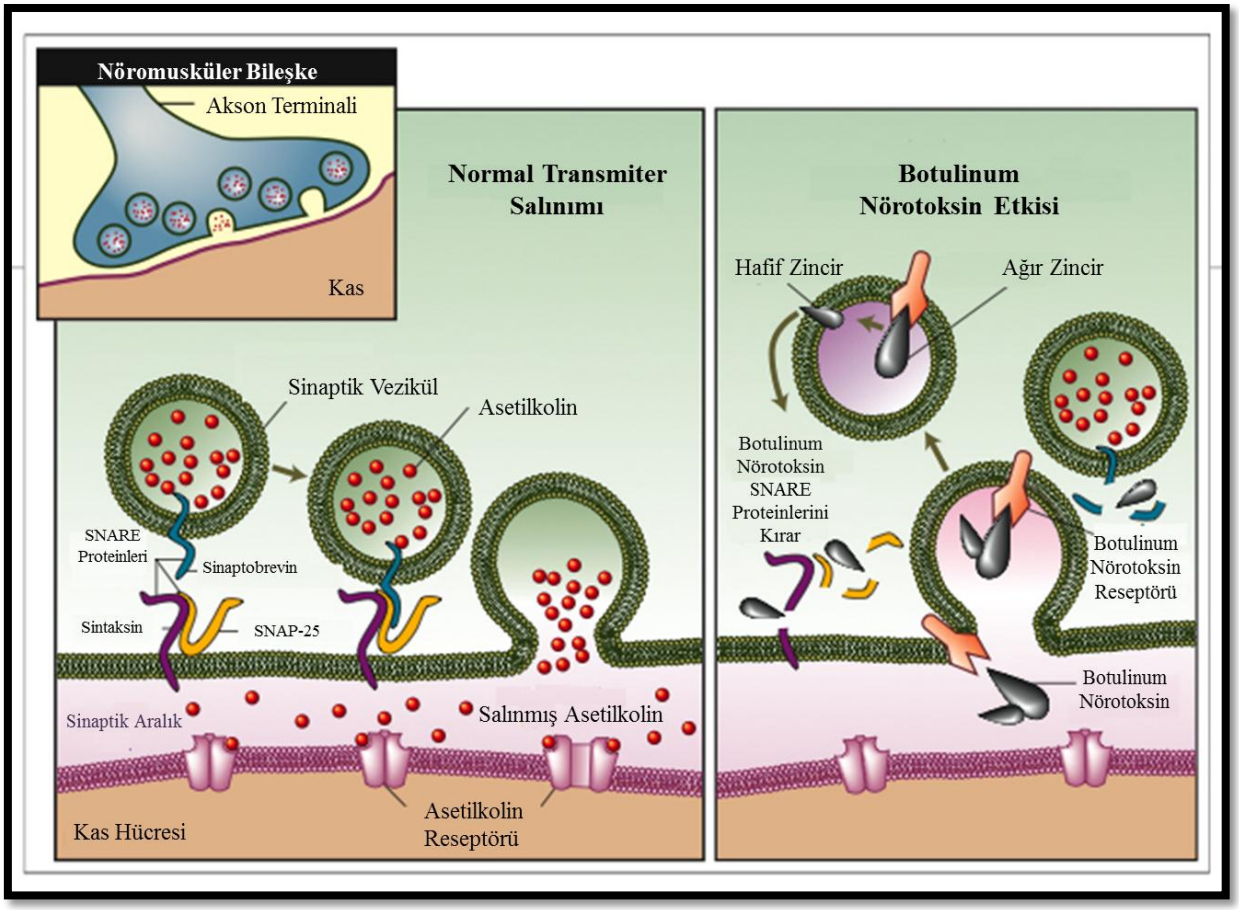
Şekil 3: Botulinum toksinin 4 aşamalı etki mekanizması. BoNT: Botulinum toksin, LC: Hafif zincir, HC: Ağır zincir (Keller, J. E. and Vann, W. F. 2006. Botulinum Toxin. eLS.).

1. Bağlanma: Toksin presinaptik kolinerjik reseptörlere geri dönüşsüz olararak bağlanır. Bu aşamada ağır zincirin 50 kDa'luk karboksi terminali görev alır.

2. İnternalizasyon: Botulinum toksini reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine alınır.

3. Translokasyon: Daha sonra vezikül içi proton pompası ATPase ile asidik hale gelir ve toksinin konformasyonunda değişiklik olur. Bu değişiklik ağır zincirin 50 kDa'luk amino terminalinin görev aldığı bir translokasyon ile hafif zincir sitoplazmaya çıkar.

4. Toksisite: Asetilkolin içeren veziküllerin hücre zarı ile birleşip Asetilkolini nöromuskuler kavşağa veya ekrin bezlerin otonomik boşluklarına bırakması için SNARE kompleksi proteinleri gereklidir. Synaptobrevin, SNAP-25 (Synaptosome associated protein of 25kDa) ve Sintaksin proteinleri SNARE kompleksini oluştururlar. Botulinum toksininin hafif zinciri çinko bağımlı endopeptidaz aktivitesi bu proteinleri parçalar ve işlevsiz hale getirir. Sonuç olarak asetil kolin sinaptik aralığa salınamaz ve postsinaptik aksiyon potansiyeli oluşamaz. Botulinum toksinin farklı serotipleri farklı SNARE proteinleri üzerinden etkisini gösterir. Serotip A ve E SNAP 25'i, Serotip B, D, F ve G Synaptobrevin'i, Serotip C hem Sintaksin'i hem SNAP 25'i kırarak etki eder (**Şekil 4**). Botulinum Toksin-Serotip A SNAP-25'i Gln197-Arg198 aminoasitlerinin arasından kırarak işlevsiz hale getirmektedir.



Şekil 4: Normal kas-sinir kavşağı Asetilkolin salınımı ve Botulinum toksin etki mekanizması (Dickerson JT, Janda KD. The Use of Small Molecules to Investigate Molecular Mechanism and Therapeutic Targets for Treatment of Botulinum Neurotoxin A Intoxication. ACS Chem Biol.1(6):359-359, 2006.).

Botulinum toksin tarafından yapılan inhibisyonu birbirini takip eden iki aşamalı bir süreçte sonlanır.

1. Aksonal filizlenme ve sinir terminallerinin yeni nöromusküler bileşkeyi oluşturması: Sinirden etkilenmiş sinir terminali bölgesine doğru yeni aksonal uzantılar gelişir. Filizlenen aksonlar son organa doğru ilerleyerek burada işlevsel yeni bir nöromusküler bileşke oluştururlar 28 günde iletim başlar.

2. Etkilenmiş ana sinir terminali yeniden iletim fonksiyonunu kazanır ve aksonal filizlenme ile kazanılan sinaptik oluşumlar geriler ve bu yollardan iletim durur. Bu aşama yaklaşık 91 gün sonra tamamlanır.

BOTULİNUM TOKSİN İNHİBİTÖRLERİ

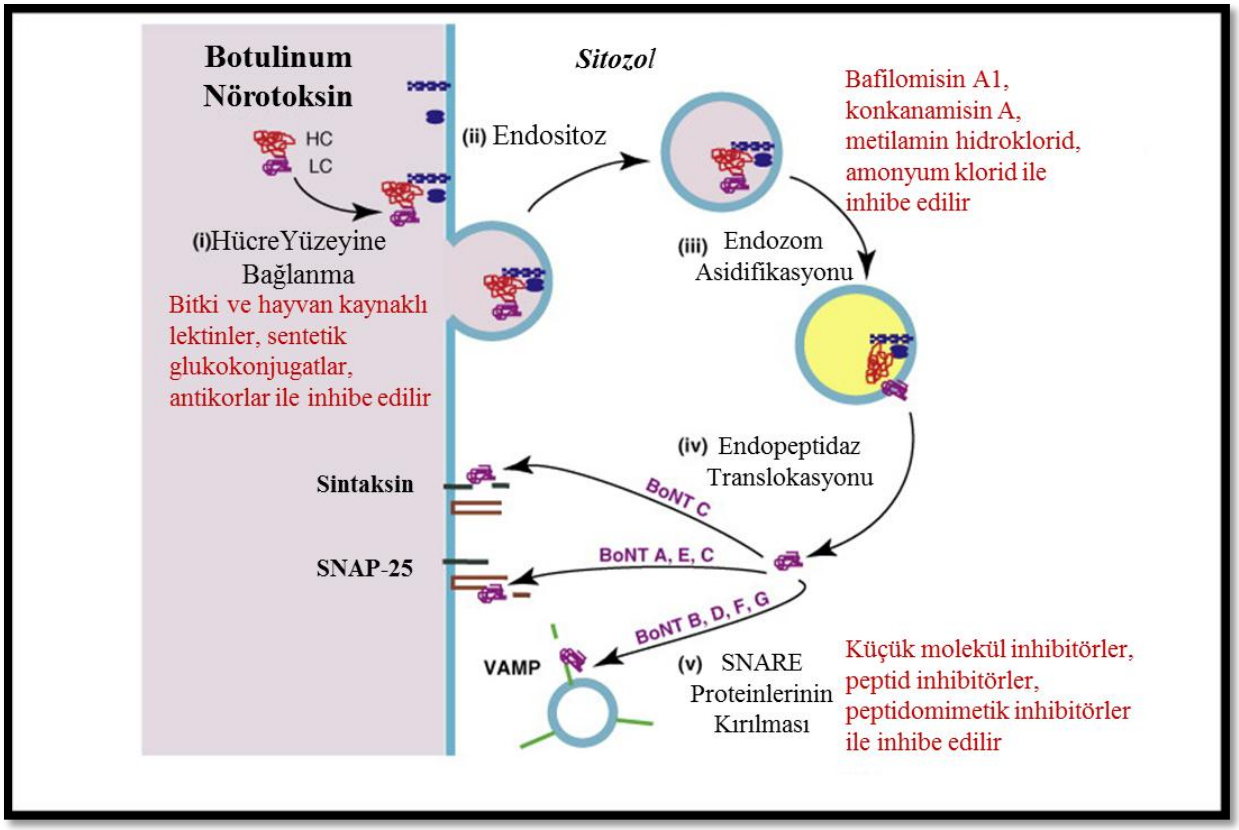
Aşılama ile Clostridium Botilinum'a karşı bağışıklık oluşturulabilir. Zayıflatılmış Botulinum suşları bu amaçla kullanılmıştır. Günümüzde pentavalan botulinum toksoidi ile aşılama CDC'nin (Centers for Disease Control and Prevention) araştırılan yeni ilaçlar kategorisindedir. Clostridium Botilinum ile karşılaşıldıktan sonra hemen dolaşımdayken etki edebilecek at kaynaklı botulinum antitoksinleri Sanofi-Pastor tarafından üretilmektedir. Ancak bu serumlar ile ciddi anafilaktik reaksiyonlar da bildirilmiştir. Bu immünolojik yollar dışında botulinum toksininin etkisini durdurabilecek, geciktirebilecek veya geri döndürebilecek biyouyumlu bir madde arayışı devam etmektedir.

Termolizin inhibitörü fosforamidon BTxB'nin zayıf bir inhibitörüdür. Bir ACE (Angiotensin Converting Enzyme) inhibitörü olan Kaptopril ise yüksek konsantrasyonda kullanıldığında botulinuma bağlı paralizi oluşmasını bir süre geciktirebilmektedir.[67]

Botulinum toksinin internalizasyonu ve translokasyonu için asidik veziküler kompartmanlar ve enerji gerekir. Ph düşüşünü engelleyen ajanlar (proton iyonoforlar, nigericin, monencin) botulinum toksinin etki göstermesini geciktirmektedir.[68] Aynı şekilde amonyum klorid ve metilamin hidroklorid konsantrasyon bağımlı olarak etki zamanını geciktirmektedir. İnternalizasyonu geciken botulinum toksin antikorlara duyarlı hale gelmektedir.

Bazı aminopridinler ise K^+ kanallarını bloke ederek aksiyon potansiyeli süresini uzatırlar ve sinir terminaline Ca^{+2} içeri girişini arttırırlar bu botulinum toksin etkilerini geçici olarak hafifletir.

Son 10 yıldır botulinum toksinin etki merkezi olan SNARE proteinlerinin proteolizi inhibitör çalışmalarının esas odak noktası olmuştur (**Şekil 5**). Aktif-bölge inhibisyonu için birçok yaklaşımla buluşlar yapılmaya çalışılmıştır. Birçok peptid, organik madde, peptidomimetik bu amaçla denenmiştir. Bazılarında başarılı olunmuştur. Örneğin bis(5-amidino-2benzimidazolil) BTxB'nin aktif bölgesindeki çinkoyu çıkaran ve aktif bölgeyi yeniden şekillendiren bir yapıdadır.



Şekil 5: Botulinum toksin inhibitörlerinin etki mekanizmaları. HC: Ağır zincir, LC: Hafif zincir, BoNT: Botulinum toksin (Hakami RM, Ruthel G, Stahl AM, Bavari S. Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin. Trends Microbiol.18(4):164-72, 2010).

İlk irreversibl inhibitör 2010 yılında Capkova ve arkadaşları tarafından benziliden siklopentenedion yapıda aktif bölgeye kovalent modifikasyon yapan bir madde olarak tanımlanmıştır.[70]

Tanımlanan ve bulunan maddelerin hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde toksisite çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Laboratuvarda etkinmiş gibi görülen maddeler bazen etkisiz bazen toksik olabilmektedir.

Botulinum toksini toksine karşı oluşan bazı antikorlar ile de inhibe olmaktadır.[71] Nörotoksin molekülünün toksin olmayan bölgesine bağlanan antikorlar onun aktivitesini değiştirmezler ve non-nötralizan antikorlar olalak isimlendirilirler. Nötralizan antikorlar ise aktif bölgeye karşı oluşur ve toksin aktivisini bloke eder. Nötralizan antikorların oluşumunda botulinum toksin uygulamalarının olması gerekenden daha sık ve daha yüksek dozlarda

yapılması etkilidir. Uygulama aralarının 8-12 haftadan uzun olması ve en düşük etkin dozun kullanılması direnç gelişimini engelleyebilir.[72]

BOTULİNUM TOKSİN DOZ ÖNERİLERİ VE SAKLAMA KOŞULLARI

Botulinum toksin serotiplerinden Tip-A en sık kullanılan serotiptir (BTxA). Botox® (Allergan Pharmaceuticals Inc, Irvine CA, USA), Dysport® (Ipsen, Maidenhead, UK) en sık kullanılan ticari formlarıdır. Bir MU (Mouse unit)botulinum toksin intraperitoneal enjeksiyon sonrası 18-22 gr dişi Swiss-Webster farelerinin yarısını öldürebilen dozdur. Ticari formların doz etkileri birbirinden farklıdır. Örneğin 1 Botox ünitesi 3-4 Dysport ünitesine karşılık gelmektedir. Spastisite için kullanılan en yüksek doz 400 ünitedir. Yüz kırışıklıkları için her seansta genellikle 40-60 U Botox dozu yeterli olmaktadır. 70 kg ağırlığında bir insan için LD50 (median lethal dose) değeri 2500-3000 ünitedir. İyatrojenik zehirlenme rapor edilmemiştir. Ancak zehirlenme yada yüksek doz enjeksiyon sonrası 24 saat içinde antidot verilmelidir.

Botox flakonunun -5 °C' de, Dysport flakonunun +2-8°C' de saklanması, sulandırıldıktan sonra her ikisinin de +2-8°C' de saklanması gerekir. Sulandırılan preperatların 8 st içinde kullanılması önerilir. Sulandırılmış ve +4°C' de saklanan Botox' un aktivitesi 1. gün sonunda 90%, 3. günde 70-80%, 7. günde 40-50% ve 14. günde minimal olduğu gösterilmiştir. 2007 yılında Elmas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise sulandırılıp 2 hafta süre ile +4°C' de saklanan Botox' un, taze Botox ile aynı etkileri oluşturabileceği ancak etki süresinin kısaldığı gösterilmiştir.[73]

BOTULİNUM TOKSİN YAN ETKİLERİ

Enjeksiyon bölgesinde ağrı, ödem ve ekimoz uygulama tekniği ile ilgilidir ve yan etki olarak değerlendirilmezler. Baş ağrısı, ağız kuruluğu ve grip benzeri tablo görülebilir. Baş ağrısının sebebi iğne ile periostun uyarılması, lokalize kas içi hematomlar ve stres olarak açıklanmaktadır. Uygulama bölgesinde geçici hiperestezi enjeksiyon travmasına ve/veya Botulinum toksininin lokalize antinososeptif etkisine bağlı olabilir. Literatürde bir olguda enjeksiyon sonrası psöriasis benzeri deri lezyonları oluşmuş ve 5 ay sonra kendiliğinden düzelmiştir. Ter bezi aktivitesinin bloke olmasından dolayı enjeksiyon bölgesinde ciltte kuruma ve pullanma gelişebilir.

Botulinum toksin preperatlarındaki albümin potansiyel bir allerjen olmasına rağmen literatürde ciddi bir alerjik reaksiyon veya ürtikeryal döküntü bildirilmemiştir. Uzun dönemde immünolojik, karsinojenik veya diğer potansiyel zararlı etkisi tespit edilmemiştir.[13,64]

Hastaların mutlaka konuşma zorluğu, yürüme zorluğu, görmede bozulma gibi sistemik dolaşıma geçme belirtileri açısından uyarılmaları gerekir.

TAVŞANLARDA BOTULİNUM TOKSİN DENEYLERİ

Tavşan denekleri üzerinde botulinum toksin çalışmaları 1960 ve 1970'lerde botulinum toksin serolojisi, tiplendirmesi ve etki mekanizması üzerine yoğunlaşmıştır. 1980'lerde tıbbi uygulamaya girmesiyle birlikte botulinum toksinin ekstraoküler kaslara ve vitreusa etkileri araştırılmıştır. Kullanımının yaygınlaşması ile birlikte 2000'li yıllarda kas paralizisi çalışmaları, elektromyelografik değerlendirme yöntemleri, elektron mikroskobik değerlendirme yöntemleri ile tavşanlar üzerinde çalışmalar devam etmiştir.

Jabor ve ark. 2003 yılında tavşan anterior auriküler kas modelini tanımlamışlardır.[74] Önce bir pilot çalışma ile kasın lokalizasyonunu ve minimum etkin botulinum toksin dozunu göstermişlerdir. Tavşan anterior auriküler kasına yapılacak olan 2,5 U Botox®'un güvenli etkin minimum doz olduğunu tespit edilmiştir. Daha sonra bu modelde botulinum toksini hazırlama ve saklama koşullarının botulinum toksinin etkinliğine olan etkisini araştırılmıştır. Araştırmamızda da bu model kullanılmıştır.

Görgü ve ark. 2006 yılında tavşan anterior auriküler kas modelinde botulinum toksin ile lokal anestezik ajanların birlikte uygulanmasının botulinum toksin etkiliğine etkisini araştırmışlardır.[75]

Elmas ve ark. 2007 yılında aynı modeli kullanmış ve her kulağa 2,5 U Botox® (0,05 cc) enjeksiyonu ile botulinum toksin bekletilme süresi ile etkinliğini karşılaştıran araştırmalarını yapmışlardır.[73]

2.3 MEZOTERAPİ VE NAPAJ TEKNİĞİ

Mezoterapi ilaç ve yardımcı madde (bitki özleri, vitaminler, eser elementler vb.) karışımlarının çok sayıda ve küçük hacimde enjeksiyonlarla intradermal veya subkutan olarak verilmesinin genel ismidir. İlk kez 1952' de Fransa' da Dr. Michel Pistor prokain ile ağrı tedavisinde bu yöntemi uygulamıştır. Daha sonra eklem ve kas ağrılarının yanında selülit ve saç dökülmesi tedavisinde, deri gençleştirme ve vücut şekillendirme amacıyla kullanılmıştır.[76]

Fibromyalji, başağrısı, bel ağrısı, tendinit, bursit tedavisi için piroksikam, ketorolak, baklofen, diazepam karışımları bu yöntemle kullanılmıştır. Buflomidil ve pentoksifilinin lokal doku mikrosirkülasyonunu arttırarak etkili olduğu düşünülmüştür.

Enjeksiyon lipoliz amacıyla fosfatidil kolin, L-Karnitin, hyalurinidaz, kollajenaz, glikolik asit, retinoik asit, multivitaminler (ADEK), eser elementler (çinko, bakır, selenyum, krom, mangenez), lidokain, tiroid hormonları, aminofilin, isoproterenol kullanılmaktadır.

Alopesi tedavisinde minoksidil, finasteride, lidokain ve multivitamin karışımları kullanılmaktadır.[77]

Mezoterapi kullanım alanları bunlarla sınırlı değildir.[78] Birçok hastalığın tedavisinde kullanımı araştırılmaktadır (**Tablo 2**).

Mezoterapi Kullanım Alanları		
Selülit	Artirit	Psöriasis
Kilo kaybı	Astım	Vitiligo
Telenjiektazi	Bel ağrısı	Egzema
Vücut Şekillendirme	Gut	İnsomnia
Ksantelezma	Başağrısı	Tendinit
Akne	Fibromyalji	Bursit
Alopesi	Herpetik nöralji	Tinnitus
Fotoyaşlanma	Konstipasyon	
Hiperpigmentasyonn	Stria	
Melasma	Venöz staz	

Tablo 2: Mezoterapi kullanım alanları

Bir kan ürünü olan Trombositten Zengin Plazma da son dönemlerde mezoterapi yöntemiyle yüz gençleştirme ve alopesi tedavisinde kullanılmaktadır.[11-13]

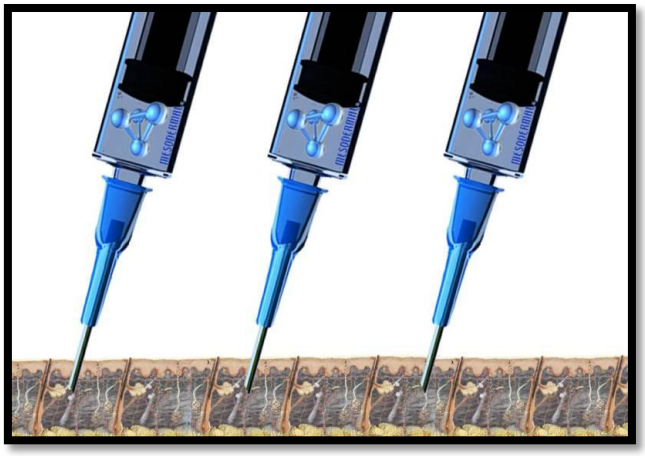
Yüz gençleştirmede etkisini fibroblast aktivitesini artırıp kollajen, elastin ve hyaluronik asit sentezini uyararak ve hücreler için optimum fizyolojik bir çevre yaratarak göstermektedir. Birçok madde bu amaçla kullanılmaktadır (**Tablo 3**).

Mezoterapide Gençleştirme Amaçlı Uygulanan Preparatlar
Hyaluronik asit (1.35%-3.5%)
Hyaluronik asit (0.2%, 1%, 3%) ve diğer ek biyoaktif maddeler
Polinükleotid makromoleküller
Organik silisyum
Kültüre edilmiş otolog fibroblastlar
Büyüme faktörleri
Trombositten Zengin Plazma

Tablo 3: Gençleştirme amaçlı uygulamalarda kullanılan preperatlar. (*Vitaminler, mineraller, aminoasitler, koenzim, nükleik asitler, β-glukan)

Mezoterapi preperatları farklı teknikler ile uygulanabilir.[78]

1. Nokta tekniği: Pistorun uyguladığı tekniktir. 1 cm aralarla 4 mm derinliğe 0,02-0,05ml enjeksiyonlardır.
2. **Napaj tekniği (Kaplama)**: 2mm derinliğe 45° açıyla, hafif ve sabit basınçla, el bileğinin hızlı sallanma hareketleriyle yapılan enjeksiyon tekniğidir. Enjeksiyon yapılırken yüzeyde kalan karışım deri üstüne yayılır ve deri "kaplanır" (**Şekil 6**). Çalışmamızda bu yöntem kullanılmıştır.
3. Epidermik teknik: 1mm derinliğe, bazal membran geçilmeden yapılan enjeksiyonlardır.
4. Mesogun: Napaj tekniğinin kolaylaştırılmış şeklidir. Seri olarak ileri geri hareket enjeksiyon tabancası ile mezoterapi karışımının uygulanmasıdır.



Şekil 6: Napaj Tekniği ile Mezoterapi uygulaması

Yan etkiler:

Çok nadiren hiperestezi, kaşıntı, ödem, eritem, hassas subkutan nodüller, bulantı, kusma, diyare görülebilir. Deri ve yağ nekrozu, hiperpigmentasyon, hipersensitivite reaksiyonu daha da nadirdir. Kullanılan ilaçlara bağlı yan etkiler görülebilir. İsoproterenol, yohimbin ve amino triptilin; anksiyete, tremor, çarpıntı, kas kramplarına neden olabilir. Mikobakteriye bağlı deri enfeksiyonları rapor edilmiştir.[79]

Kontraendikasyonları:

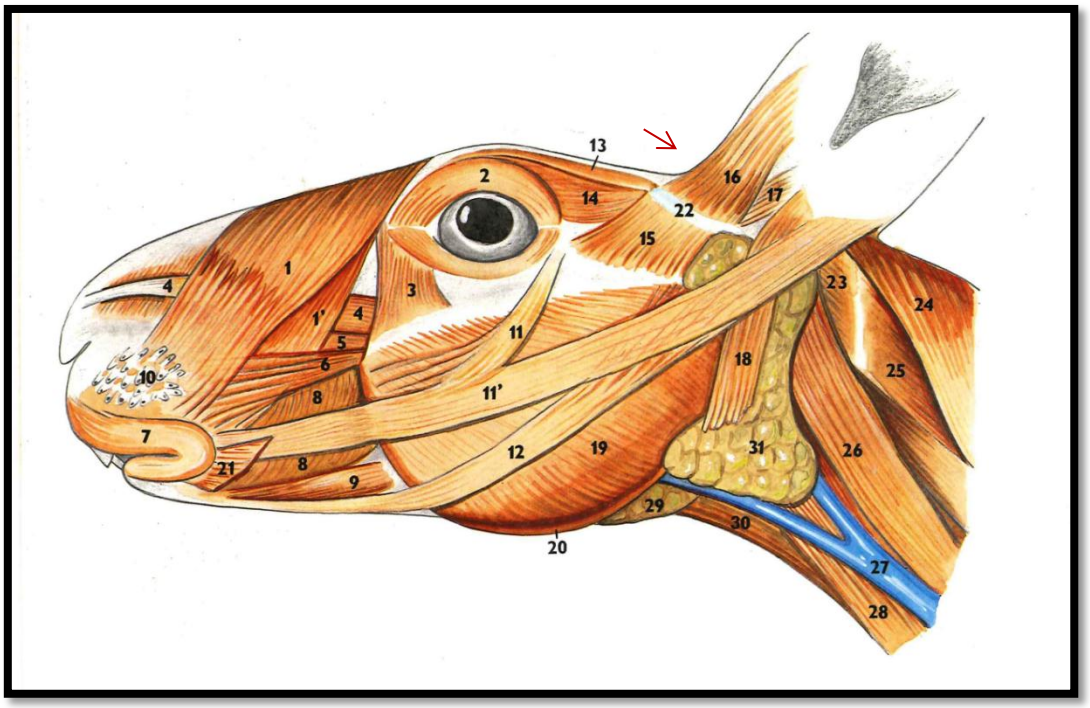
Kullanılan ilaçlara karşı hipersensitivite, kardiyak, karaciğer, böbrek hastalıkları, diyabet, lupus, gebelik ve laktasyonda, aşırı şişmanlıkta uygulanmaz.[78]

2.4 TAVŞAN ANTERİOR AURİCULAR KAS ANATOMİSİ VE DENEY MODELİ

Tavşan kulağının hareketlerini sağlayan 3 grup kas vardır. Anterior, medial ve lateral gruplar kulakların pozisyonu değiştirirler. Daha önce yapılmış anatomik çalışmalarda bu kas gruplarından anterior auriküler kasın (**Şekil 7**: 16. m. Skutuloauricularis superficialis dorsalis) yüzeyden hissedilebilen hacimli kitlesi ile bu bölgede enjeksiyon yapmaya uygun tek kas olduğu görülmüştür.[74]

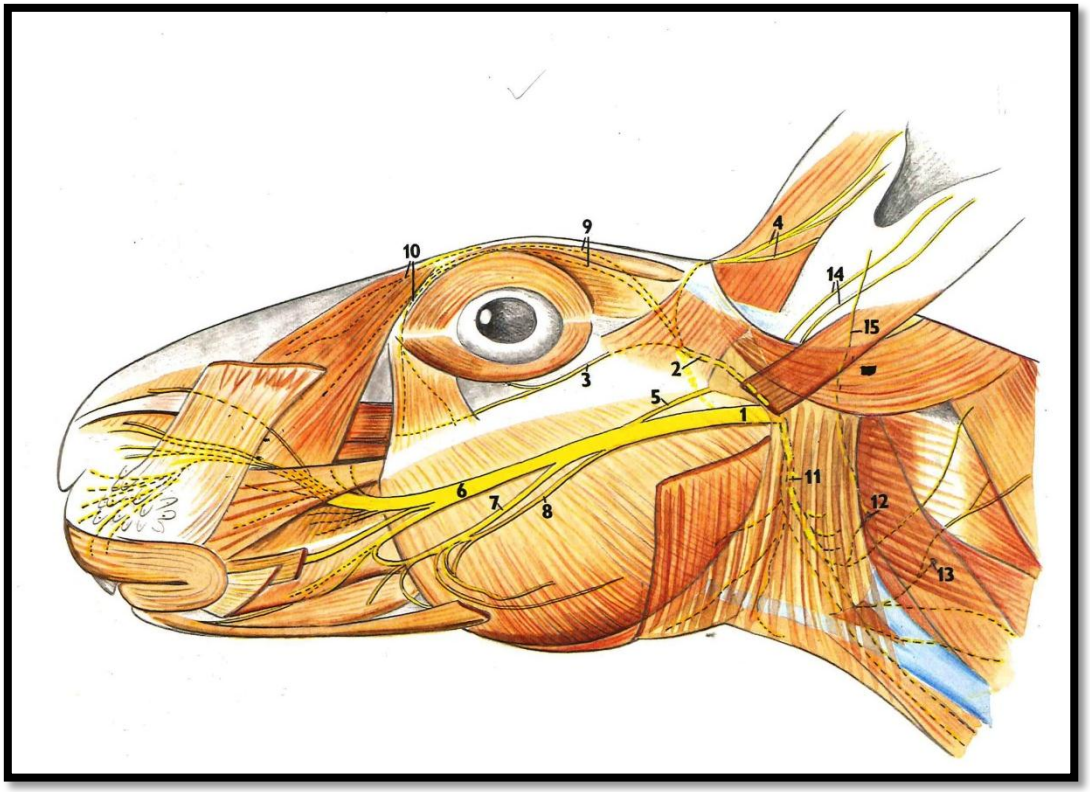
Kasın orijini frontal kemikte medial kantusun yaklaşık 2 cm kraniyelinden başlamaktadır. İnsersiyonu kulağın ventromedial kenarına yapmaktadır. Uzunluğu 15-20 mm genişliği 7-8 mm' dir.

Bu kasın paralizisi kulakta düşme ve kulağın öne doğru kaldırılamaması ile sonuçlanmaktadır. Ancak medial ve lateral kas grupları ile kulak hareketleri kısmen devam etmektedir.



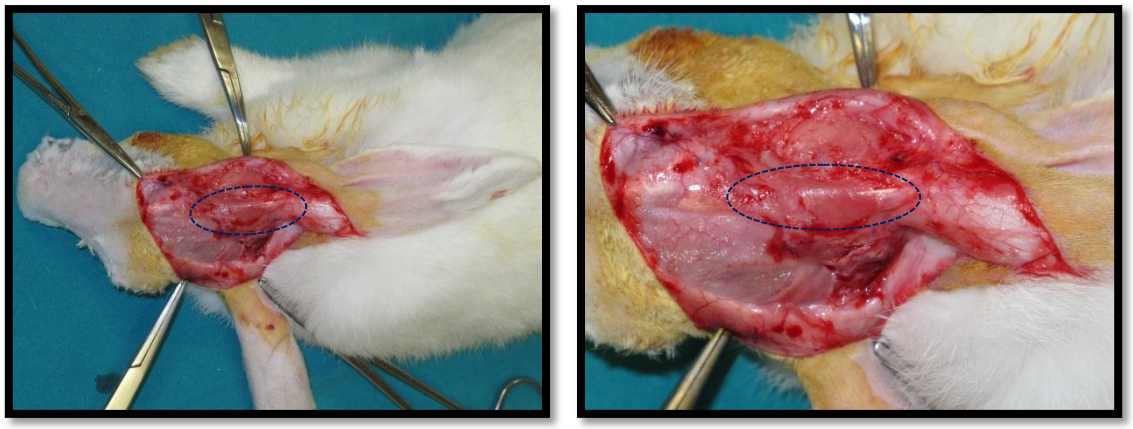
Şekil 7: Tavşan yüz ve boyun kasları. Kulak çevresinde m. scutuloauricularis superficialis dorsalis (16), m. scutuloauricularis superficialis ventralis (17), m. parotidoauricularis (18) ve m. zygomaticus portio auricularis (11´) kulak hareketlerinden sorumludur (A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals. PeterPopesko, Viera Ratjova, Jindrich Horak, Wolfe Publishing Ltd. 1990. Sayfa 18).

m. scutuloauricularis superficialis dorsalis (anteror auriculer kas) innervasyonu fasiyal sinirin n. auriculopalpebralis dalının rami auriculares rostarales dalı tarafından sağlanmaktadır (**Şekil 8**).

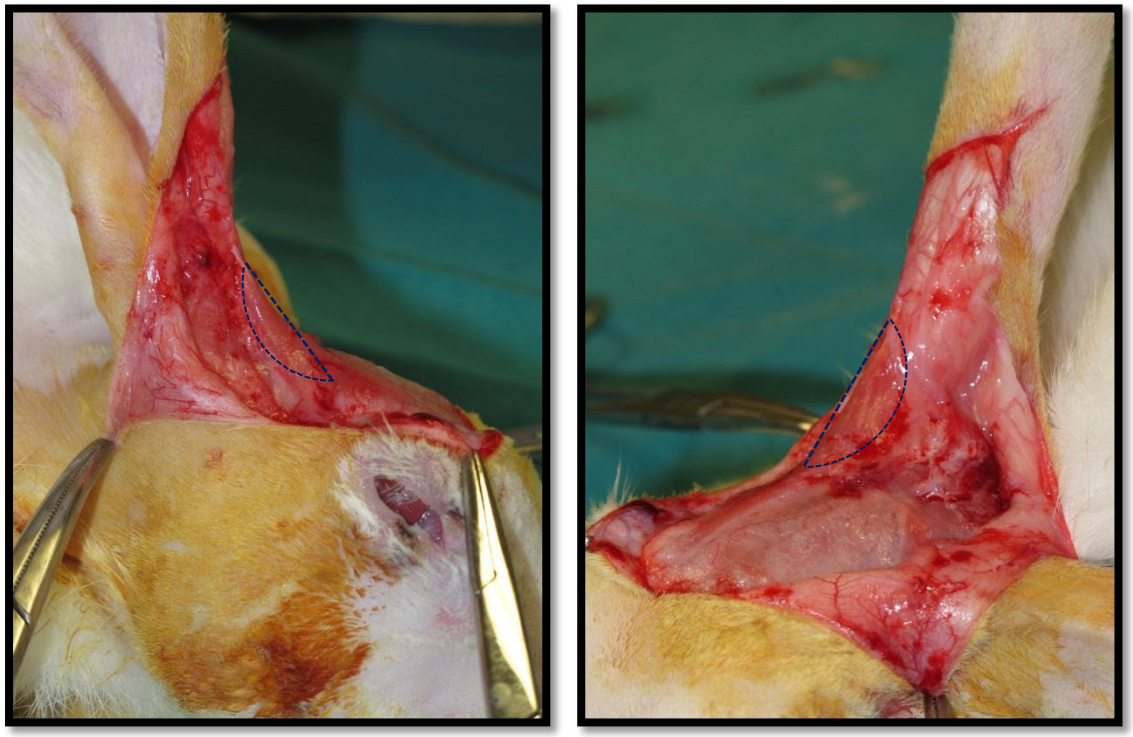


Şekil 8: Tavşan fasiyal sinir dalları. n. facialis (1), n. auriculopalpebralis (2), rami auriculares rostarales (4) (A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals. PeterPopesko, Viera Ratjova, Jindrich Horak, Wolfe Publishing Ltd. 1990. Sayfa 22).

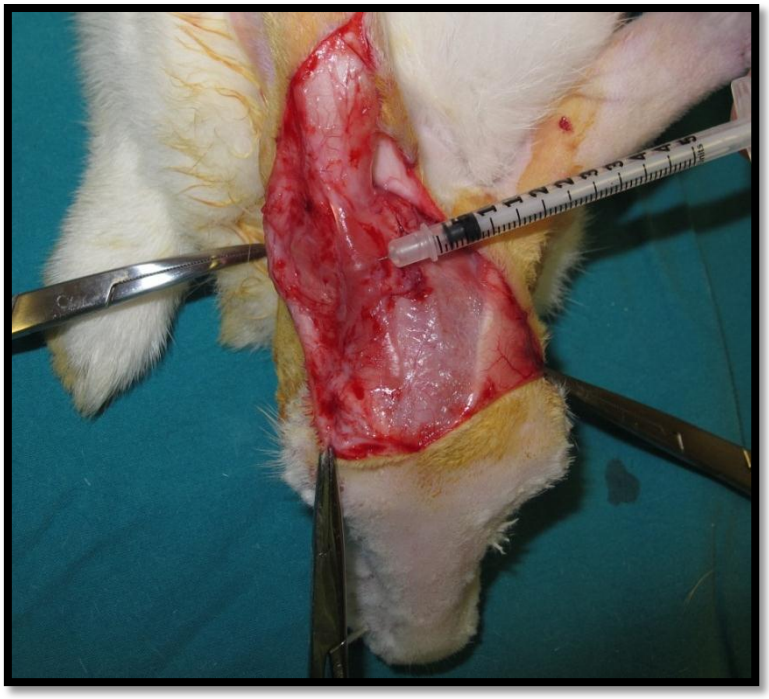
Çalışma öncesi işlem uygulanacak anterior auricular kas anatomisi kadavrada kas disseksiyonu ile ortaya konulmuştur (**Şekil 9**, **Şekil 10**, **Şekil 11**).



Şekil 9: Kadavra tavşan sağ kulak anterior auricular kas disseksiyonu (Anterior görüntüsü).



Şekil 10: Kadavra tavşan sağ kulak anterior auricular kas disseksiyonu (Sağ: Lateral görüntüsü, Sol: Medial görüntüsü).



Şekil 11: Deneyde kas içi enjeksiyonlarının yapılacağı anterior auricular kasın görünümü.

2.5 METALLOPROTEAZLAR VE METALLOPROTEAZ iNHİBİTÖRLERİ

Metalloproteazlar (MP) hücrelerin mikroçevrelerine verdiği yanıtlarda anahtar rol oynayan enzimlerdir. Proteolitik yıkıma neden olarak veya hücre yüzeyi ve ekstrasellüler matriks proteinlerini aktive ederek hücreler arası veya hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimini düzenlerler. Hücre diferansiyasyonu, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve hücre sağkalımı süreçlerinde görev alırlar. Serbest ya da hücre zarına bağlı bulunurlar. Matriks Metalloproteinazları (MMPs), adamolisin-benzeri proteazlar (ADAMs) ve ostosinler olarak 3 grupturlar. MP aktivitesinin düzenlenmesi transkripsiyonel kontrol mekanizmaları, membran bağlı formları sekresyon ve endositozunun kontrolü, latent proenzim formlarının aktivasyonu ve endojen inhibitörler ile sağlanır.

Doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMPs) ve α-2 makroglobulin en çok bilinen metalloproteinaz inhibitörleridir.[80] Serumda ise üç ana proteaz inhibitörü bulunmaktadır. Bunlar α-1 antitirpsin, α-2 makroglobulin ve Antitrombin III' tür. α-2 makroglobulin metalloproteazlar ve diğer tüm proteazlar (serin, treonin, sistein, aspartic) üzerinde inhibitör etki gösteren genel bir proteaz inhibitörüdür. α-2 makroglobulin aynı zamanda trombosit α-granülü içinde de bulunur ve trombosit aktivasyonu ile açığa çıkar.

Trombositten Zengin Plazmanın genel bir metalloproteinaz inhibitörü olan hem serumda olan hem de aktive trombositlerden salınan α-2 makroglobulinden zengin olabileceği düşünülebilir.

α-2 makroglobulinin bir metalloproteaz olan BTxA üzerine etkisi henüz gösterilmemişse de bazı çalışmalarda metalloproteaz yapıdaki başka zehirleri inhibe edebildiği gösterilmiştir. Miyoshi ve ark. tarafından 1991'de bir patojen (Vibrio vulnificus) tarafından üretilen MP'ın da α-2 makroglobulin ile inhibe edilebilecğini gösterilmiştir.[81] Saidi ve ark. tarafından 1999'da α-2 makroglobulinin metalloproteinaz yapıdaki Lebetase isimli yılan zehirini inhibe ettiğini saptamıştır.[82]

MP'lar ve MP inhibitörlerinin ve özellikle α-2 makroglobulinin etki mekanizmaları ve dahil oldukları biyolojik süreçler günümüzde halen anlaşılmaya çalışılmaktadır.[83-85]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 DENEY ÖNCESİ HAZIRLIKLAR

a. Pilot Çalışma

Trombositten Zengin Plazma (TZP) mezoterapisinin, Botulinum toksinin (BTxA) çizgili kaslar üzerindeki paralize edici etkisini değiştirip değiştiremeyeceğini ve deney modelinin işlevliğini test etmek amacıyla bir pilot çalışma yapılmıştır.

Deney gruplarının oluşturulması bölümünde daha sonra ayrıntılı olarak açıklanacağı üzere bir deneğin;

-Sağ ve sol kulak anterior auricular kaslarına BTxA enjeksiyonu (2,5U)

-Sol kulak anterior auricular kas üzerindeki alana otolog TZP mezoterapisi uygulanmıştır.

Tavşanın kulak pozisyonları 14 gün sonra değerlendirilmiştir (**Şekil 12**).



Şekil 12: Pilot çalışmada 14. günde deneğin kulak pozisyonlarının görüntüsü

Şekil 12'de görüldüğü gibi TZP uygulanan tarafta (sol) botulinum toksinin paralitik etkisinin daha az olduğu, kulak pozisyonunun daha dik olduğu görülmüştür. Bunun üzerine TZP'nin BTxA'nın çizgili kaslar üzerindeki paralize edici etkisini azaltabileceği düşünülmüştür. Tavşan anterior auricular kas modelinin çalışmaya uygun bir model olduğu saptanmıştır. Pilot çalışmadan elde ediler veriler ile esas çalışmanın planlaması yapılmıştır.

b. Deney Hazırlıkları

Çalışmaya T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 02.04.2012 tarih B.30.2.GÜN.0.05.06.00/43-6865 sayılı izin ile onay verilmiştir. Çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 01/2012-60) desteği alınarak Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Denekler Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'na bağlı Serum Üretim ve Deney Hayvanları Çiftliği'nden temin edilmiştir.

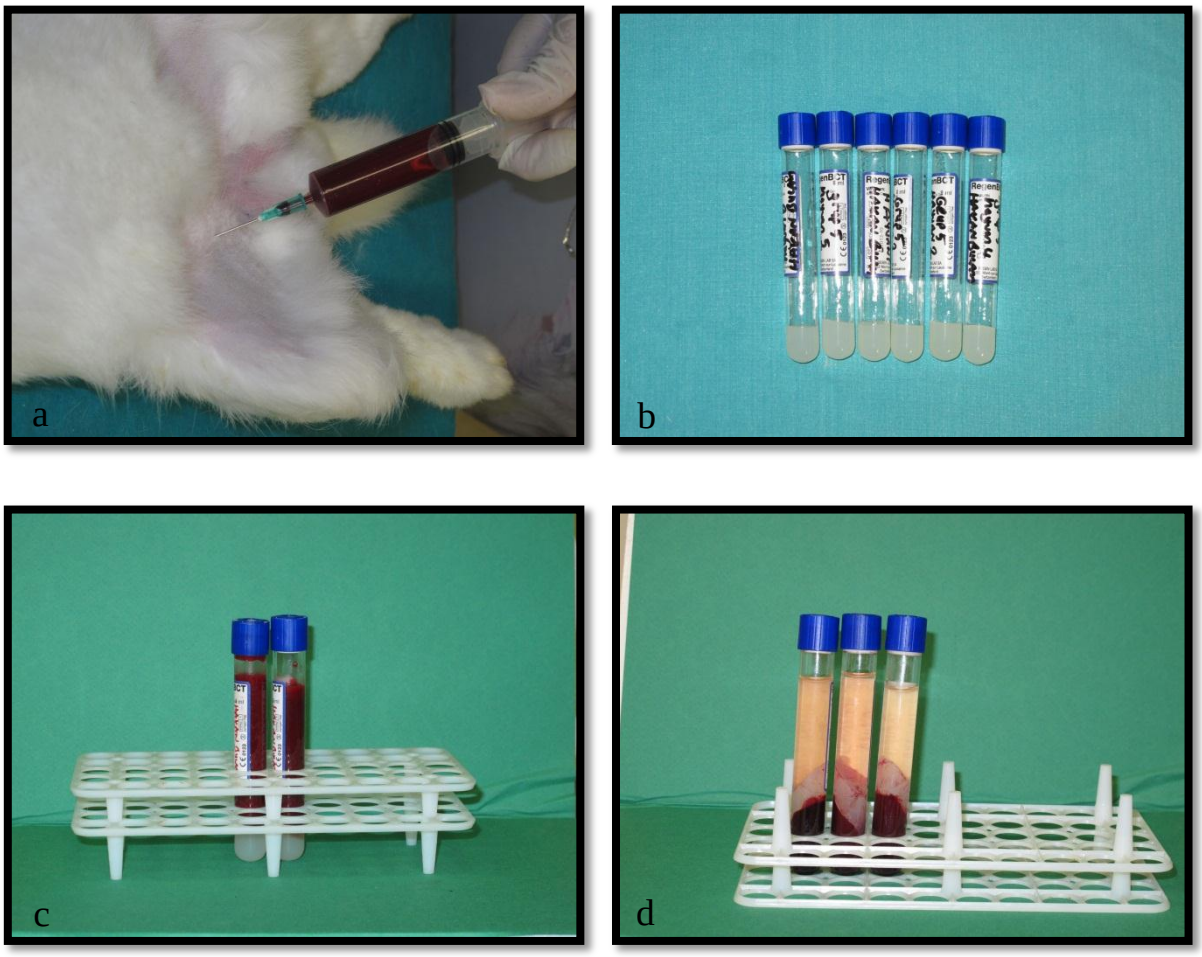
Çalışmada 2500-3000 gr arasında 24 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanılmıştır. Denekler 22±2°C sıcaklıkta, 12 saatlik aydınlık ve karanlık periyotları olan, hava akımı açısından uygun şartlarda ve uygun kafeslerde standart tavşan yemi ve su ile beslenerek barındırılmıştır. İkili gruplar halinde uzman veterinerler kontrolünde izlenmiştir. On gün karantina süresi beklenmiştir. Her hayvanın kulak, alın, yanak ve inguinal bölgeleri traşlanıp deneye hazırlanmıştır. Ayrıca hayvanları işaretlemek için vücutlarının farklı bölgeleri (ense, sağ yan, sol yan, kuyruk ve karın) de traşlanmıştır.

Anestezi için %10'luk ketamine HCl (50mg/kg-Alfamine®-im) ve %2'lik ksilazin HCl e (2,5mg/kg-Rompun®-im) kullanılmıştır.

Karantina süresi beklenirken bir hayvan kaybedilmiştir. Bu denek yerine yeni tavşan konularak grup ve denek sayısı korunmuştur.

3.2 TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN HAZIRLANMASI

Her hayvanın otolog TZP'sinin hazırlanması amaçlanmıştır. Her hayvanın inguinal arteri üzerinden girilip 8ml kan alınmıştır (**Şekil 13**). Trombositten Zengin Plazma hazırlamak için Regen ACR (Regenlab, İsviçre) TZP hazırlama kiti kullanılmıştır. Regen ACR kitleri 2 adet 8ml ± 10% vakumda 3gr ± 0,1 gr polyester jel ve 1ml ± 0,05ml 0,100M sodyum sitrat süpernatan solüsyonunu içereren mavi kapaklı özel tüplere sahiptir. Kan regenkit tüpüne aktarılmıştır ve 8 dk. 3100rmp'de JK-LC-802C (Jingke, China) santrifüj cihazı ile santrifüj edilmiştir (**Şekil 14**). Kırmızı hücreler polyester jel içinde tutulmuştur. Serum ve TZP tüpün üst kısmında kalmıştır. Daha sonra setin geniş uçlu enjektörü kullanılarak sıvının tabanından 1ml TZP 27-gauge enjektörün içine çekilmiştir. Her denekte kendi kanından hazırlanan TZP kullanılmak üzere ayrılmıştır.



Şekil 13: Trombositten zengin plazmanın hazırlanması. a. Deneklerden otolog TZP hazırlanması için 8 cc kan alınması. b. Regen ACR TZP hazırlama kiti tüpleri c. Alınan kan bu tüplere aktarılması. d. Santrifüj edilerek kullanıma hazırlanmış otolog TZP.



Şekil 14 : JK-LC-802C (Jingke, China) santrifüj cihazı

Kontrol grubunda kullanılmak üzere bir Regen ACR mavi kapaklı tüpüne 8ml serum fizyolojik konularak aynı süre ve hızda santrifüj edilmiştir ve kontrol gruplarında kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Mezoterapi bölgesi sağ anterior auricular kas üzerindeki 2x1 cm'lik alan olarak belirlendi. Planlanan gruplardaki deneklerin bu bölgesine 1cc mezoterapi uygulandı. Karşı taraf kasın etkilenmemesi için en az 4 cm uzaklık korundu.

3.3 BOTULİNUM TOKSİN TİP-A'NIN HAZIRLANMASI

BOTOX 100 U (Allergan,USA) flakon 2ml serum fizyolojik ile sulandırılmıştır ve 0,01ml' de 0,5 Ünite olan BTxA hazırlanmıştır (**Şekil 15**). Literatürde 2,5 U BTxA/BOTOX anterior aurikuler kasta tam kas paralizisi yapan minimum güvenli doz olarak bildirilmiştir.[74] Çalışmamızda da anterior aurikuler kas paralizisi yapması amacıyla 2,5 U BTxA/BOTOX (0,05ml) intramuskuler yolla kullanılmıştır. Her deneğin BTxA enjeksiyonu için ayrı bir 30-gauge enjektör kullanılmıştır.



Şekil 15: Botulinum toksin tip-A preperatlarından BOTOX® kullanılmıştır.

3.4 ÇALIŞMA GRUPLARI

24 denekler her grupta 6 denek olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. 24 denekte 48 anterior auricular kasa ve kas üstündeki deriye aşağıdaki işlemler yapılmıştır (**Tablo 4**).

- **Grup 1 (Klinik Uygulama Çalışma Grubu) (n=6):** Sağ ve sol kulak anterior auriküler kaslarına 2,5 U BTxA intramusküler enjeksiyonla uygulanmıştır. Sağ tarafta anterior auricular kas üzerindeki alana 1cc otolog Trombositten Zengin Plazma mezoterapi-napaj yöntemiyle uygulanmıştır.
- **Grup 2 (Klinik Uygulama Kontrol Grubu) (n=6):** Sağ ve sol kulak anterior auriküler kaslarına 2,5 U BTxA intramusküler enjeksiyonla uygulanmıştır. Sağ tarafta anterior auricular kas üzerindeki alana TZP hazırlama kiti içinde santrifüj edilen serum fizyolojik napaj yöntemiyle uygulanmıştır.
- **Grup 3 (İn-vitro Çalışma Grubu) (n=6):** Sağ anterior auricular kasına 2,5 U BTxA (0,05cc) ile 0,05cc Trombositten Zengin Plazma enjektör içinde karıştırılarak ve sol kulak anterior auricular kaslarına 2,5 U BTxA (0,05cc) ile 0,05cc Serum Fizyolojik ile karıştırılarak intramusküler enjeksiyonla uygulanmıştır.
- **Grup 4 (İn-vitro Kontrol Grubu) (n=6):** Sağ anterior auricular kasına 2,5 U BTxA(0,05cc) ile 0,05cc TZP hazırlama kiti içinde santrifüj edilen serum fizyolojik ve sol kulak anterior auricular kaslarına 2,5 U BTxA (0,05cc) ile 0,05cc serum fizyolojik ile karıştırılarak intramusküler enjeksiyonla uygulanmıştır.

Napaj tekniği ile mezoterapi uygulanırken 27-gauge enjektör, intramuskuler enjeksiyonlar 30-gauge enjektörler ile uygulanmıştır.

Gruplar	Sağ		Sol	
	Anterior Auricular Kas	Anterior Auricular Kas Üzerindeki Deri Alanı	Anterior Auricular Kas	Anterior Auricular Kas Üzerindeki Deri Alanı
1	**2,5 U BTxA (0,05cc)**	**1,0 cc TZP**	**2,5 U BTxA (0,05cc)**	-
2	**2,5 U BTxA (0,05cc)**	**1,0 cc SFR**	**2,5 U BTxA (0,05cc)**	-
3	**2,5 U BTxA + 0,05cc TZP**	-	**0,05 BTxA + 0,05 SF**	-
4	**2,5 U BTxA + 0,05cc SFR**	-	**0,05 BTxA + 0,05 SF**	-

Tablo 4: Deney gruplarını oluşturulması (BTxA: Botulinum toksin tip-A, TZP: Trombositten zengin plazma, SFR: TZP hazırlama kiti içinde santrifüj edilen serum fizyolojik, SF: Serum Fizyolojik).

3.5 DENEY İÇİN GEREKLİ ARAÇ-GEREÇLER

Botulinum Toksin Tip-A için BOTOX (Allergan, USA), Trombositten Zengin Plazma hazırlamak için Regen ACR (Regenlab, İsviçre) TZP hazırlama kiti, kit içindeki tüplere konulan kanın santrifüjü için Jingke JK-LC-802C (Jingke, Çin) santrifüj cihazı kullanılmıştır. Elektronöromyelografi (ENMG) çalışması VIA SYS – SYNERGY 12.3 MEDELEC cihazı ve 3 yüzey disk elektrotu kullanılmıştır. SNAP25 geni mRNA ölçümleri, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) 480 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Cerrahi aşamada portegü, klemp, Adson penset, diseksiyon makası, 15 no'lu bistüri ve bistüri sapı, steril gazlı bez, steril cerrahi eldiven, serum fizyolojik, 4/0 U.S.P. keskin iğneli ipek dikiş ipi, 27-gauge ve 30-gauge enjektör, denekten kan almak için 10ml'lik enjektör kullanılmıştır. Cerrahi set otoklav ile sterilize edilmiştir.

3.6 DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

3.6.1 GÖRSEL DEĞERLENDİRME VE FOTOĞRAFİK KAYIT

BTxA' nın kas paralizi edici etkisi nedeniyle kulaklardaki düşme ve pozisyon değişiklikleri değerlendirilmiştir. Tüm hayvanların kulaklarının deneyin 0. günü sağlıklı ve dik konumda olduğu tespit edilmiştir. Deneyin 14. günlerinde her hayvanın sol kulağı kontrol tarafı kabul edilerek sağ kulağın sol kulağa göre konumu kör çalışan bir araştırıcı tarafından değerlendirilmiştir ve görsel skorlama yapılmıştır (**Şekil 16**). 3 dereceli skorlama sistemi kullanılmıştır.

- Derece 1. Kulakların konumunda farklılık yok, simetrik, ikisi de paralitik kaslara bağlı düşük.
- Derece 2. Minimal-orta kulak pozisyonu asimetrisi: Sağ kulak ve sol kulak simetrik değil. Sağ kulağı 60°'ye kadar kaldırabiliyor. Sol kulak paralitik.
- Derece 3. Minimal-orta kulak pozisyonu asimetrisi: Sağ kulak ve sol kulak simetrik değil. Sağ kulağı 60° ve daha fazla kadar kaldırabiliyor. Sol kulak paralitik.



Şekil 16: Kulak pozisyonlarının görsel değerlendirme ile derecelendirilmesi. Çizim ve derecelendirme "Jabor MA, Kaushik R, Shayani P, Ruiz-Razura A, Smith BK, Morimoto KW, Cohen BE. Efficacy of reconstituted and stored botulinum toxin type A: an electrophysiologic and visual study in the auricular muscle of the rabbit. Plast Reconstr Surg. 2003;111(7):2419-26" isimli çalışmadan modifiye edilmiştir.

Görsel değerlendirme yöntemi Jabor ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları taze ve bekletilmiş botulinum toksinin etkinliğini değerlendiren çalışmadaki yöntem modifiye edilerek hazırlanmıştır. Jabor ve ark. sol kulak kontrol kulağı olarak değerlendirilmiş ve hiç uygulama yapılmamıştır. Bu nedenle sağ kulaktaki düşüşün miktarı sol kulağa göre değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise her iki kulak anterior auricular kasına da BTxA enjeksiyonu yapıldığı için başka herhangi bir işlem yapılmadığında tüm deneklerin her iki kulağının paralitik (Derece 1) olması beklenmektedir. Ancak bazı deneklerde kulak pozisyonları derece 2 ve derece 3'teki gibi BTxA'nın paralize edici etkisinden daha az etkilenmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farktan ötürü Jabor ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem modifiye edilerek çalışmamızda kullanılmıştır.

3.6.2 ELEKTRONÖROMYOGRAFİ (ENMG)

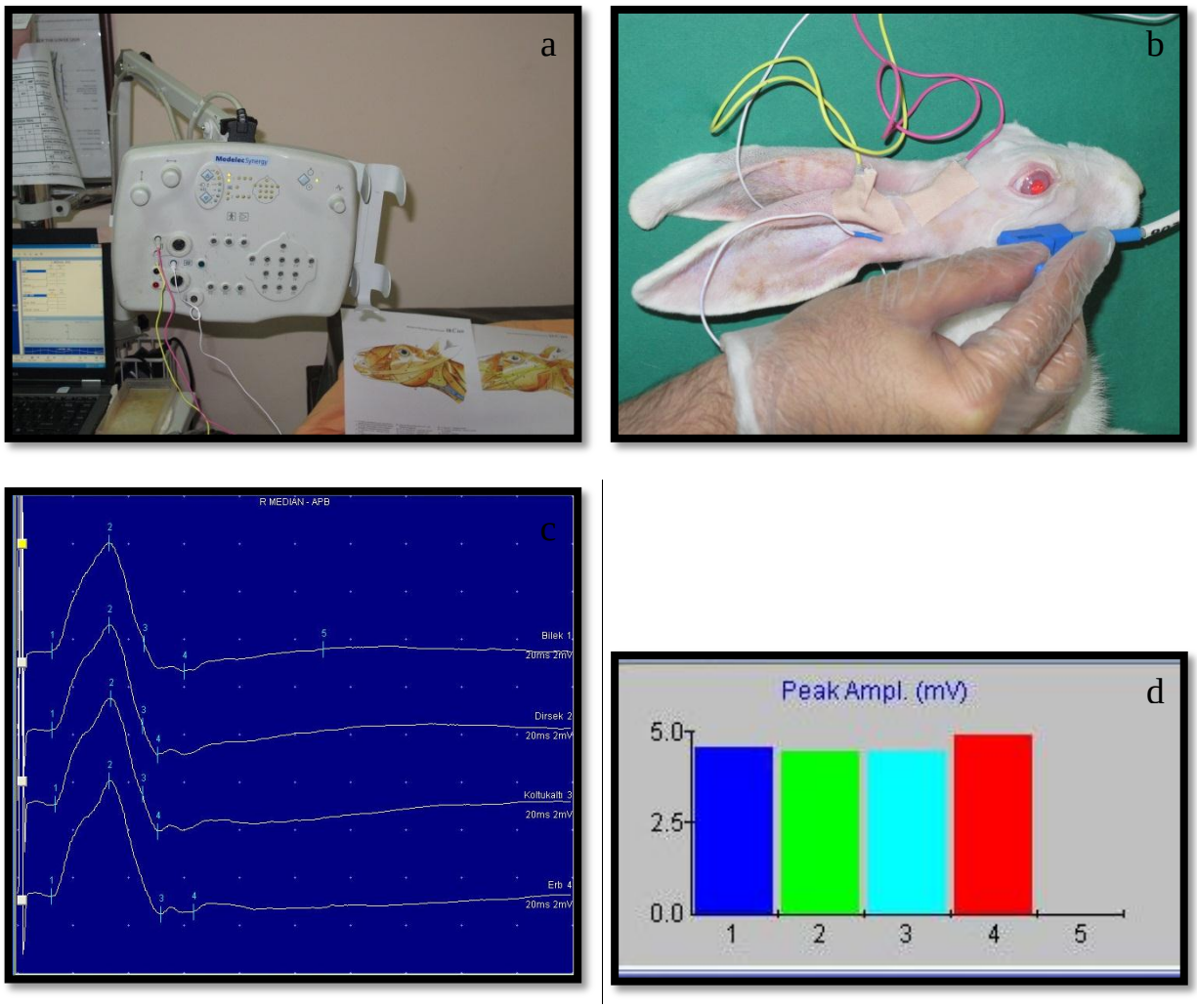
Anestezi altında tüm hayvanların frontal, temporal ve mandibular bölgesi traşlanmıştır. Anterior auricular kas kütlesinin ortası işaretlenmiştir. Fasyal sinir trasesi ve uyarı uygulanacak alan işaretlenmiştir. Kaydedici aktif kayıt elektrotu anterior auricular kas orta noktasına (kas göbeğine), referans elektrot anterior auricular kasın insersiyosuna yapıştırılmıştır, toprak iğne elektrot kulağın posterolateraline yerleştirilmiştir. VIA SYS – SYNERGY 12.3 MEDELEC® cihazı kullanılarak mandibula angulus hizasında fasyal sinir supramaksimal uyarımı yapılarak elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyellerinin (BKAP) amplitütleri tepeden tepeye ölçüm yöntemi esas alınarak ölçülmüştür. Her ölçüm 4 kez tekrarlanmıştır ve bunların ortalama değeri kaydedilmiştir (**Şekil 17**).

Elektrot noktaları uygulamalar öncesi (0. gün) yapılan ölçümlerden sonra işaretlenmiştir ve ENMG çalışmaları uygulamalardan sonra 14. günde aynı noktalar kullanılarak tekrar yapılmıştır.

Çalışmanın 0. ve 14. gün yapılan kas aksiyon potansiyeli amplitüt değerlerindeki (KAPAD) değişim

$$\left(\frac{\text{0. gün KAPAD} - \text{14. gün KAPAD}}{\text{0. gün KAPAD}} \right)$$

formülü ile hesaplanmıştır.



Şekil 17: Elektronöromyografi. a. VIA SYS – SYNERGY 12.3 MEDELEC® cihazı b. Kaydedici aktif kayıt elektrotu anterior auricular kas orta noktasına (kas göbeğine), referans elektrot anterior auricular kasın insersiyosuna yapıştırılması ve toprak iğne elektrot kulağın posterolateraline yerleştirilmesi. c. Bileşik kas aksiyon potansiyellerinin (BKAP) amplitütleri tepeden tepeye ölçüm yöntemi esas alınarak ölçülmesi. d. Her ölçümün 4 kez tekrarlanması ve bunların ortalama değeri kaydedilmesi.

3.6.3 GENETİK DEĞERLENDİRME

Botulinum toksin tip A'nın sinir terminalindeki etkisini metalloproteaz aktivitesi ile SNAP-25 proteinini kırarak oluşturduğu bilinmektedir. Kırılmamış SNAP-25 proteinine ait m-RNA'nın kas dokusundaki miktarını göstererek Botulinum toksin tip A'nın sinir terminalindeki etkinliğini ölçmek planlanmıştır. Değerlendirmede BTxA etkinliği ne kadar inhibe edilmişse kırılmamış SNAP-25 proteinine ait m-RNA'nın o kadar yüksek bulunabilceği düşünülmüştür. Temel gen (housekeeping gene) olarak (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) geni seçilmiştir. Temel gen (HPRT) m-RNA düzeyleri ile hedef gen (SNAP-25) ifade düzeyleri normalize edilmiştir. 14. gün 24 deneğin sağ ve sol kulaklarından toplam 48 kas biyopsisi alınarak aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

I. RNA İzolasyonu

Tavşan kas dokusundan RNA eldesi Roche Tripure Reagent (Roche, Almanya; Kat. No: 11667157001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği ve aşağıdaki açıklanan protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

A. Dokunun hazırlanması aşaması

1. 50-100 mg doku örneği buz üzerinde steril petri kapları içerisinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı.
2. Parçalanan dokular 1.5ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine aktarıldı.
3. Doku örneklerinin üzerine 1 ml TriPure Isolation Reagent ilave edildi ve homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. 10 mg'dan küçük dokular için 800 µl TriPure Isolation Reagent ile birlikte 5-10 µg Glikojen (Roche, Almanya; Kat No:10997920) kullanıldı.

B. Faz ayrımı aşaması

4. Nükleoprotein kompleksinin ayrımından emin olmak için tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler üzerine her bir 1 ml TriPure Isolation Reagent için 200 µl kloroform eklendikten sonra tüpler 15 saniye kuvvetlice vorteks yapıldı.
6. Tüpler oda ısısında 10 dakika inkübe edildi ve faz ayrımı için $+4^0$C'de 12,000Xg'de 15 dakika santrifüj edildi.

7. Santrifüjden sonra üç ayrı faza ayrılan solüsyondan RNA örneği içeren üstteki renksiz sıvı faz 1.5ml'lik RNase free steril tüplere aktarıldı.

C. RNA izolasyonu

8. Örnekler üzerine her bir 1 ml TriPure Isolation Reagent için 500 µl izopropanol eklendi.

9. Tüplerin sıkıca kapatılıp ve ters çevrilerek birkaç defa iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

10. Tüpler $+4^0$C'de 12,000Xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatan uzaklaştırıldı.

11. DNA kontaminasyonu önlemek için; 300 µl DNase I reaction buffer, 400 µl DEPC-treated H_2O ve 60 µl DNase I eklendikten sonra 37^0C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 300 µl 25mM EDTA eklenip 65^0C'de 10 dakika beklendi.

12. Örnekler üzerine 1 ml %75'lik etanol eklendi ve tüpler $+4^0$C'de 7,500Xg'de 5 dakika santrifüj edildi.

13. Süpernatan uzaklaştırıldıktan sonra RNA peleti vakum aleti kullanılarak kurutuldu.

14. RNA peleti 50 µl DEPC-treated H_2O ile 60^0C'de 15 dakika inkübe edilerek çözüldü.

15. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılana kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

II. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche Almanya; Kat. No: 0508995001) ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları **Tablo 5**'te verilmiştir.

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H_2O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu (5x)	1x (8mM $MgCl_2$)	4,00
dNTP	1mM	2,00
Random hekzamer primeri	60µM	2,00
RNaz inhibitörü	20 ünite	0,50
DTT	5 mM	1
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	1,1
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

Tablo 5: cDNA RT-PCR tepkime karışımı.

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0,2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi. aşağıda belirtilen protokole uygun olarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.

1. Son konsantrasyon 100 ng/ml olacak şekilde RNA, 2 µl Hekzamer primer ve total hacim 11,4 µl olacak şekilde steril H_2O-PCR grade eklendi.
2. Otomatik ısı döngüsü cihazında 65^0C'de 10 dakika inkübasyon edildikten sonra örnekler buz üzerine alındı.
3. 8,6 µl master karışım (5x Tampon, 1mM dNTP, 20U RNaz inhibitörü, 5mM DTT ve 10U Transkriptor Ters Transkriptaz enzimi) buz üzerinde bekletilen örneklere eklendi.
4. Thermal Cycler cihazına yerleştirilen örnekler sırasıyla;

- 29^0C'de 10 dakika
- 48^0C'de 60 dakika
- 85^0C'de 5 dakika inkübe edildi.

5. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20^0C'lik derin dondurucuda saklandı.

III. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

SNAP25 genin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) 480 cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde ;

cDNA, bölgeye özgü primerler ve UPL TaqMan probu (**Tablo 6**), LightCycler TaqMan Master karışımı (Roche, Almanya; Kat. No:0470749400) ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi (**Tablo 7**). SNAP25 gen ifadelenmesini normalize etmek için *HPRT* mRNA düzeyi referans olarak alındı.

		DİZİ (5'→3')
SNAP25	F	AAA AAG CCT GGG GCA ATA AT
	R	CTT TCG TCC ACC ACA CGA G
	P	# 58 (Roche, Almanya, Kat No: 04688554001)
HPRT	F	GCT TTC CTT GGT CAA GCA GT
	R	CAC TTC GAG GGG TCC TTT TC
	P	# 40 (Roche, Almanya, Kat No: 04687990001)

Tablo 6. Real-time PCR, primer, prob dizileri

	Son Konsantrasyon	**Hacim**
dH_2O	-	4.1µL
$MgCI_2$ (25mM)	4mM	1.2µL
Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.5µL
Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.5µL
TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.2µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	2.5µL

Tablo 7: SNAP25 ve HPRT Real-Time PCR tepkime karışımı

Light Cycler (LC) 480 Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96'lık çok kuyucuklu plakalara dağıtıldı ve üzerine cDNA' lar eklendi. Üzeri şeffaf kapatıcı ile kapatıldı ve cihaza yerleştirildikten sonra **Tablo 8**'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. SNAP25 ve HPRT genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda, SNAP25 ve HPRT genlerin mRNA düzeylerini gösteren Crossing point (cP) değerleri belirlendi. SNAP25 ifade düzeyi HPRT ifade düzeyine göre normalize edildi.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)			
Program Verisi		**Değer**	
Döngüler		1	
Analiz Modu		-	
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)		95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		4.40	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)			
Program Verisi		**Değer**	
Döngüler		50	
Analiz Modu		Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	**Kısım 1**	**Kısım 2**	**Kısım3**
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn	1
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	4.40	2.20	4.40
Program 3. Soğutma			
Program Verisi		**Değer**	
Döngüler		1	
Analiz Modu		-	
Sıcaklık Hedefleri		**Kısım 1**	
Hedef Sıcaklık (°C)		40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		2.20	

Tablo 8: *SNAP25* ve *HPRT* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak "Pfaffl" matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir (**Şekil 18**).

$$R = \frac{E\,(\text{hedef})^{\Delta Ct\,(\text{kontrol-örnek})}}{E\,(\text{referans})^{\Delta Ct\,(\text{kontrol-örnek})}}$$

Şekil 18: Referans değere göre hedef değeri hesaplayan Pfaffl eşitliği

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir. İfade oranı (R) istatistiksel karşılaştırmada kullanıldı.

3.7 VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

1. Görsel Değerlendirmelerin İstatatistiksel Analiz Yöntemi

Çalışmanın 0. ve 14. gündeki kulak pozisyonlarının skorlaması "SPSS 15.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneklerin 14. günde kulak pozisyonlarındaki değişimler değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki fark Çok gözlü ki-kare testi ile değerlendirilmiştir ve 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

2. Elektronöromiyografi Sonuçlarının İstatatistiksel Analiz Yöntemi

Çalışmanın 0. ve 14. gün ölçülen kas aksiyon potansiyeli amplitüt değerlerindeki değişim "SPSS 15.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Kruskal Wallis testi ve Wilcoxon işaret testi kullanıldı. 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

3. Genetik İncelemelerin İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza ve zamana bağlı olarak değişen, SNAP25 ve HPRT mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı. Veriler "SPSS 15.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Mann-Whitney testi kullanıldı. 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Çalışmanın öncesinde deneklerin karantina süresi içinde ölen bir denek yerine yeni denek konulmuştur. Deney süresince anesteziye, kan alma ve enjeksiyon uygulamalarına veya cerrahi işleme bağlı bir komplikasyon görülmemiştir. Göz kapağı enfeksiyonu geçiren bir deneğin tedavisi veteriner hekimler tarafından yapılmıştır.

4.2 GÖRSEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Uygulamalardan önce tüm denekleri kulakları aynı pozisyonda, dik ve sağlıklı olarak kaydedilmiştir. Uygulamalardan sonra 14. günde kör bir araştırmacı tarafından yapılan kulakların birbirine göre konumunun değerlendirildiği görsel değerlendirme sonuçları analiz edilmiştir (**Tablo 9**). Her iki kulakta tam paralizi oluşması Derece 1 olarak işaretlenmiştir. Sağ kulağın daha az etkilendiği pozisyonlar kulağın açısına göre Derece 2 ve Derece 3 olarak değerlendirilmiştir (**Şekil 20, 21, 22, 23)**. Grup I'de sağ kulağı daha az paralize olmuş, daha dik pozisyondaki denek sayısı daha fazla bulunmuştur. Bu farkın oranı çok gözlü ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. Grup I'de %83, Grup II'de %17, Grup III'te %33 ve Grup IV'te %17'lik bir değişim olduğu saptanmıştır ve Grup I'deki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,048) (Çok gözlü ki-kare testi) (**Şekil 19**). Diğer gruplardaki değişim yüzdeleri anlamlı bulunmamıştır.

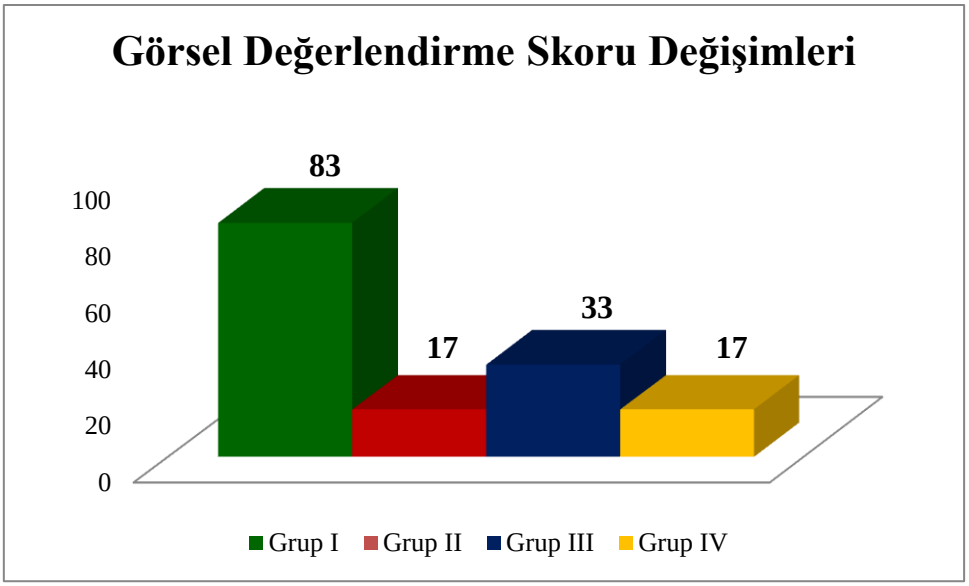
Gruplar	Denekler	Görsel Derecelendirme
Grup I	N1	1
	N2	2
	N3	2
	N4	3
	N5	3
	N6	2
Grup II	N1	1
	N2	1
	N3	2
	N4	1
	N5	1
	N6	1
Grup III	N1	1
	N2	1
	N3	1
	N4	2
	N5	1
	N6	2
Grup IV	N1	1
	N2	1
	N3	1
	N4	1
	N5	1
	N6	2

Tablo 9: Görsel Değerlendirme Sonuçları.

1.Her iki kulak paralitik.

2. Sağ kulağı 60°'ye kadar kaldırabiliyor ve sol kulak paralitik.

3. Sağ kulağı ≥60° kaldırabiliyor ve sol kulak paralitik.



Şekil 19: Görsel değerlendirme sonuçları değişimleri (%). Grup I'deki %83'lük değişim oranı anlamlıdır (p=0,048).

DENEKLERİN GÖRSEL DEĞERLENDİRME ÖRNEKLERİ



Şekil 20: Görsel değerlendirme örneği. Derece 1 kulak pozisyonları (Grup 2-N1).



Şekil 21: Görsel değerlendirme örneği. Derece 2 kulak pozisyonları (Grup 3-N4).



Şekil 22: Görsel değerlendirme örneği. Derece 3 kulak pozisyonları (Grup 1-N4).



Şekil 22: Görsel değerlendirme örneği. Derece 3 kulak pozisyonları (Grup 1-N5).

4.3 ELEKTRONÖROMYOGRAFİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Aksiyon Potansiyeli Amplitüdü Değerlendirme Bulguları

Uygulamalardan önce (0. gün) ve uygulamalar sonrası 14. günde yapılan elektronöromyografi çalışmalarında elde edilen kas aksiyon potansiyelleri amplitüt ölçümleri (mV) değerlendirilmiştir. Bu ölçümlere göre deneklerin kas kas aksiyon potansiyelleri amplitüt ölçümleri (mV) **Tablo 10**'da görülmektedir.

Gruplar	Denekler	(0. gün)		(14. gün)	
		SAĞ	SOL	SAĞ	SOL
Grup 1	N1	19.9	15.7	5.6	1.3
	N2	15.6	12.5	7.9	4.6
	N3	7.24	13.4	4.3	0.23
	N4	19.0	14.3	5.7	1.1
	N5	12.2	19.1	4.8	4.0
	N6	8.9	14.4	3.0	0.9
Grup 2	N1	10.3	11.8	0.6	1.2
	N2	12.2	11.3	1.1	1.2
	N3	9.0	16.6	1.2	1.0
	N4	9.0	10.4	0.9	0.8
	N5	12.9	9.6	1.0	0.8
	N6	9.3	11.5	1.5	1.5
Grup 3	N1	9.1	9.5	2.5	1.2
	N2	13.8	14.6	1.4	0.8
	N3	12.9	14.7	0.2	0.1
	N4	11.8	11.9	0.3	0.3
	N5	9.6	8.8	1.2	0.7
	N6	8.8	11.3	1.4	0.5
Grup 4	N1	11.7	11.9	0.9	0.8
	N2	13.6	13.5	2.2	2.1
	N3	12.5	12.2	0.3	0.3
	N4	7.4	5.6	1.2	0.4
	N5	9.7	12.7	0.4	0.8
	N6	6.6	8.7	0.5	1.2

Tablo 10: Deneklerin sağ ve sol kulak anterior auricular kas aksiyon potansiyelleri (mV).

Gruplar homojen dağılmadığı için her grupta sağ ve sol kulaktan elde edilen verilerin median ve çeyrek değerler genişliği (interquartile range:IR) değerleri hesaplanmıştır.

Gruplar	SAĞ		SOL	
	0. gün	**14. gün**	**0. gün**	**14. gün**
Grup 1	13,9 (10,7)	5,2 (2,3)	14,4 (3,4)	1,2 (3,4)
Grup 2	9,8 (3,4)	1,1 (0,5)	11,4 (2,8)	1,1 (0,5)
Grup 3	10,7 (4,1)	1,3 (1,4)	11,6 (5,3)	0,6 (0,7)
Grup 4	10,7 (5,6)	0,7 (1,1)	12,1 (5)	0,8 (1,1)

Tablo 11: Deneklerin sağ ve sol kulak anterior auricular kas aksiyon potansiyellerinin median ve çeyrek değerler genişliği (interquartile range:IR) değerleri (mV).

Kas aksiyon potansiyeli amplitüt değerlerindeki (KAPAD) değişim;

$$\left(\frac{\text{0. gün KAPAD} - \text{14. gün KAPAD}}{\text{0. gün KAPAD}} \right)$$

formülü ile hesaplanmışır. Bu değerlere göre değişim değerleri ve değişim değerlerinin median değerleri **Tablo 12** ve **Tablo 13**'te görülmektedir.

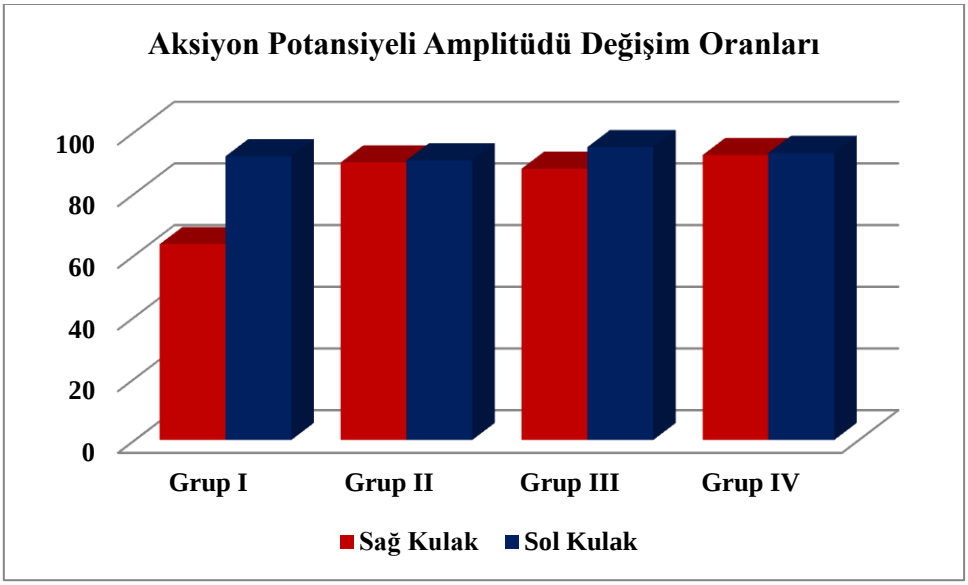
Gruplar	Denekler	Değişimler	
		SAĞ	SOL
Grup 1	N1	71.9	91.7
	N2	49.4	63.2
	N3	40.6	98.3
	N4	70	92.3
	N5	60.7	79.1
	N6	66.3	93.8
Grup 2	N1	94.2	89.8
	N2	91	89.4
	N3	86.7	93.1
	N4	90	92.3
	N5	92.3	91.7
	N6	83.9	87
Grup 3	N1	72.5	87.4
	N2	89.9	94.5
	N3	98.5	99.3
	N4	97.5	97.5
	N5	87.5	92.1
	N6	84.1	95.6
Grup 4	N1	92.3	93.3
	N2	83.8	84.5
	N3	97.6	97.5
	N4	83.8	92.9
	N5	95.9	93.7
	N6	92.4	86.2

Tablo 12: Deneklerin kas aksiyon potansiyeli değişimlerinin değerleri.

Gruplar	Değişim Oranı Değerleri	
	Sağ Kulak	Sol Kulak
Grup 1	63,5	92
Grup 2	90	90,7
Grup 3	88	95
Grup 4	92,4	93,1

Tablo 13: Deneklerin kas aksiyon potansiyeli değişimlerinin median değerleri.

Aksiyon potansiyeli amplitütlerinin 0. ve 14. Günler arasındaki değişim oranları değerlendirildiğinde Grup I'de sağ kulaktaki değişim oranının (BTxA + TZP mezoterapisi) sol kulaktaki (yalnız BTxA) değişim oranına göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p=0,028) (Wilcoxon işaret testi) (**Şekil 24**). Botulinum toksinin kas paralizisi etkisinin TZP mezoterapisi uygulanan grupta daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.



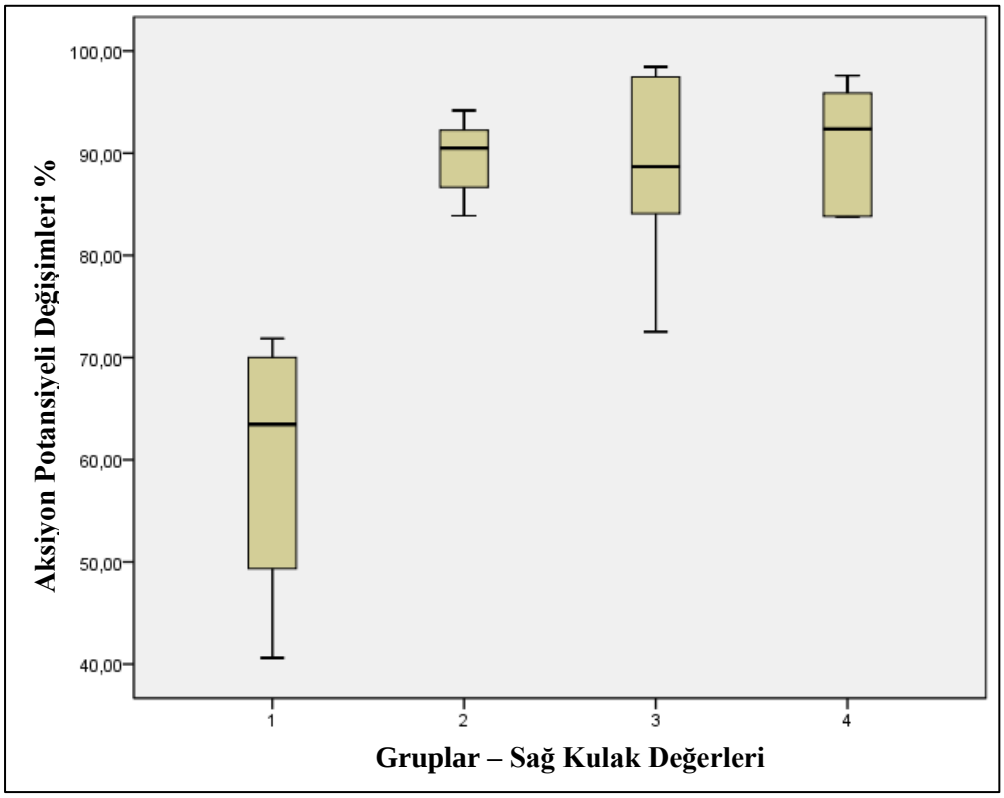
Şekil 24: Aksiyon potansiyeli amplitütlerinin 0. ve 14. Günler arasındaki değişim oranları.

Grup II'de sağ kulaktaki değişim oranının (BTxA + SF mezoterapisi) sol kulaktaki (yalnız BTxA) değişim oranına göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (p=0,60) (Wilcoxon işaret testi).

Grup III'de sağ kulaktaki değişim oranının (BTxA + TZP im. enjeksiyonu) sol kulaktaki (BTxA + SF im. enjeksiyonu) değişim oranına göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,038) (Wilcoxon işaret testi). Botulinum toksinin kas paralizisi etkisinin TZP ile aynı enjektörde karıştırılıp verildiğinde azaldığı sonucuna varılmıştır.

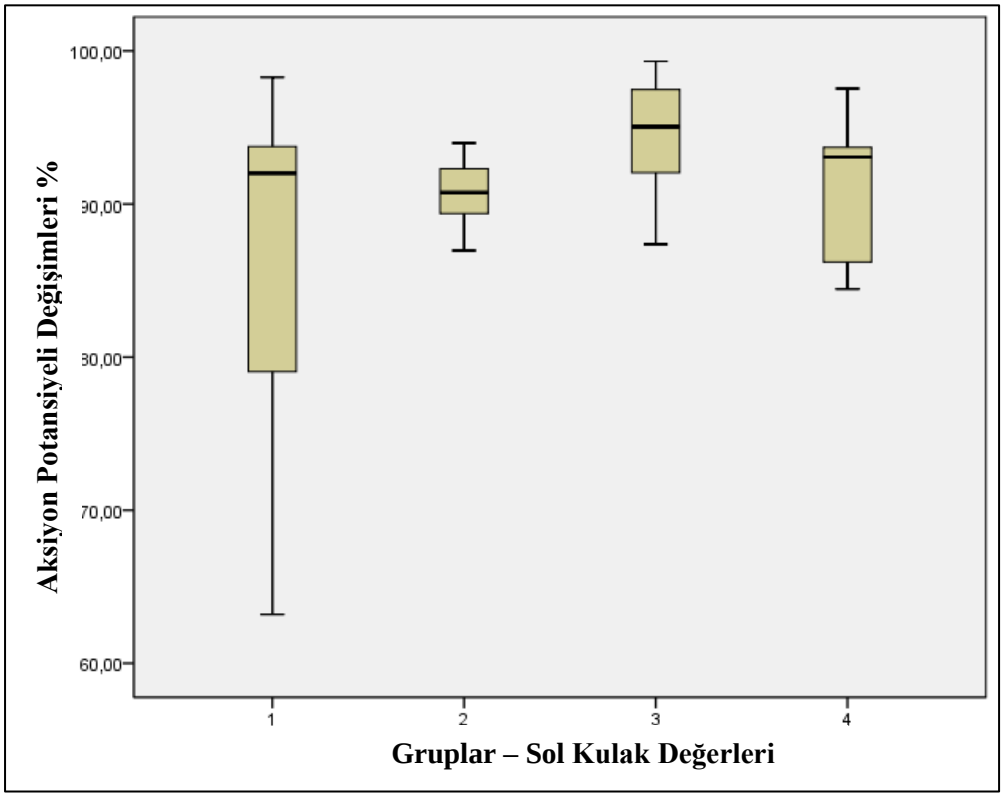
Grup IV'te ise sağ kulaktaki değişim oranları daha düşük olduğu ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (p=0,91) (Wilcoxon işaret testi).

Tüm grupların sağ kulaklarındaki aksiyon potansiyeli değişimleri karşılaştırıldığında Grup I'de (BTxA + TZP mezoterapisi) sağ kulaktaki değişim oranının Grup II (BTxA + SF mezoterapisi), Grup III (BTxA + TZP invitro karışımı) ve Grup IV (BTxA + SF invitro karışımı)'e göre daha düşük olduğu saptanmıştır (**Şekil 25**). Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,004) (Kruskal Wallis testi).



Şekil 25: Deneklerin sağ kulaklarına yapılan uygulamalar sonucunda kas aksiyon potansiyelindeki değişimlerin kutu grafiği.

Tüm grupların sol kulaklarındaki aksiyon potansiyeli değişimleri karşılaştırıldığında ise grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (**Şekil 26**) (p=0,34) (Kruskal Wallis testi).



Şekil 26: Deneklerin sol kulaklarına yapılan uygulamalar sonucunda kas aksiyon potansiyelindeki değişimlerin kutu grafiği.

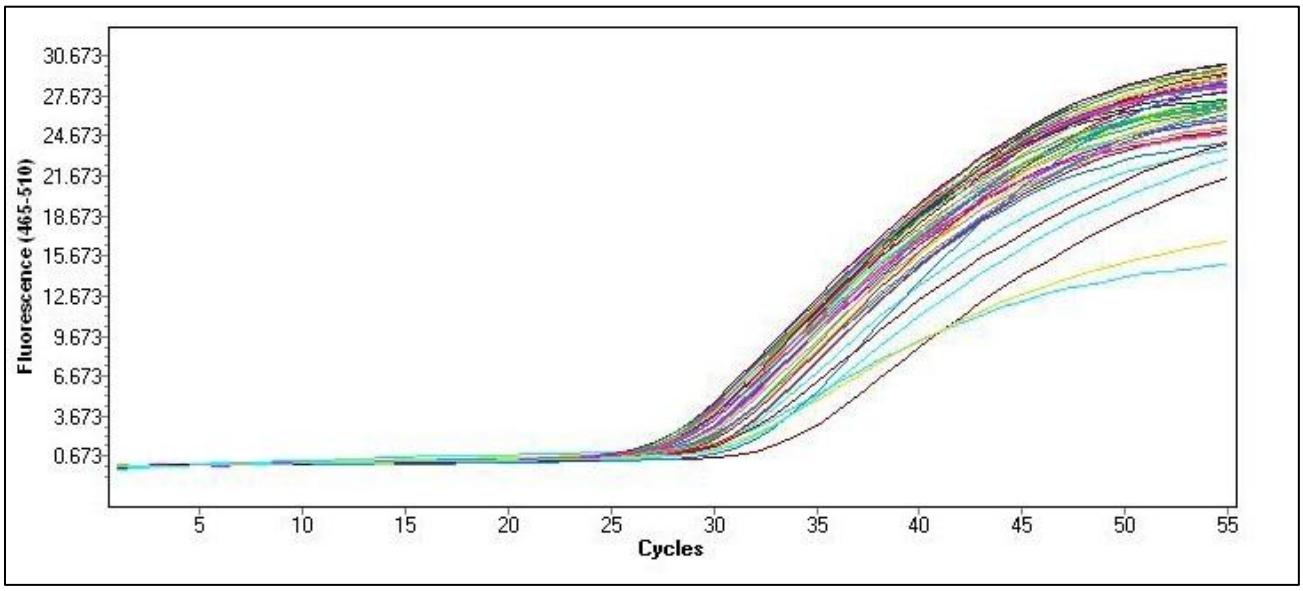
4.4 GENETİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi

SNAP25 geninin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanılmıştır. Tavşan kulak kas dokusundan elde edilen cDNA'larda SNAP25 geninin normalizasyonu için seçilen HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) (housekeeping) genine özgül primerler ve UPL LNA probları kullanılarak çalışılmıştır.

Yapılan genetik çalışmalar sonucu SNAP-25 proteinine ait genlerin m-RNA düzeyinde tüm kas biyopsilerinde ifade edildiği görülmüştür (**Şekil 27**). Tüm deneklerde SNAP-25 Ct değerinin elde edilmesi çalışmada doğru m-RNA dizisine bakıldığını ve aldığımız biyopsilerinde SNAP-25 proteini varlığını doğrulamıştır.

SNAP25 ve HPRT genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **Şekil 27**'te gösterilmektedir.



Şekil 27: Deneklerden aldığımız kas biyopsilerinde SNAP25 ve HPRT genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. SNAP25 ve HPRT geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresan sinyal izlenmektedir.

Gruplar içinde deneklerin sağ ve sol kulak kas biyopsilerinden elde edilen değerler karşılaştırıldığında Grup I, Grup II, Grup III ve Grup IV'te istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (**Tablo 14**).

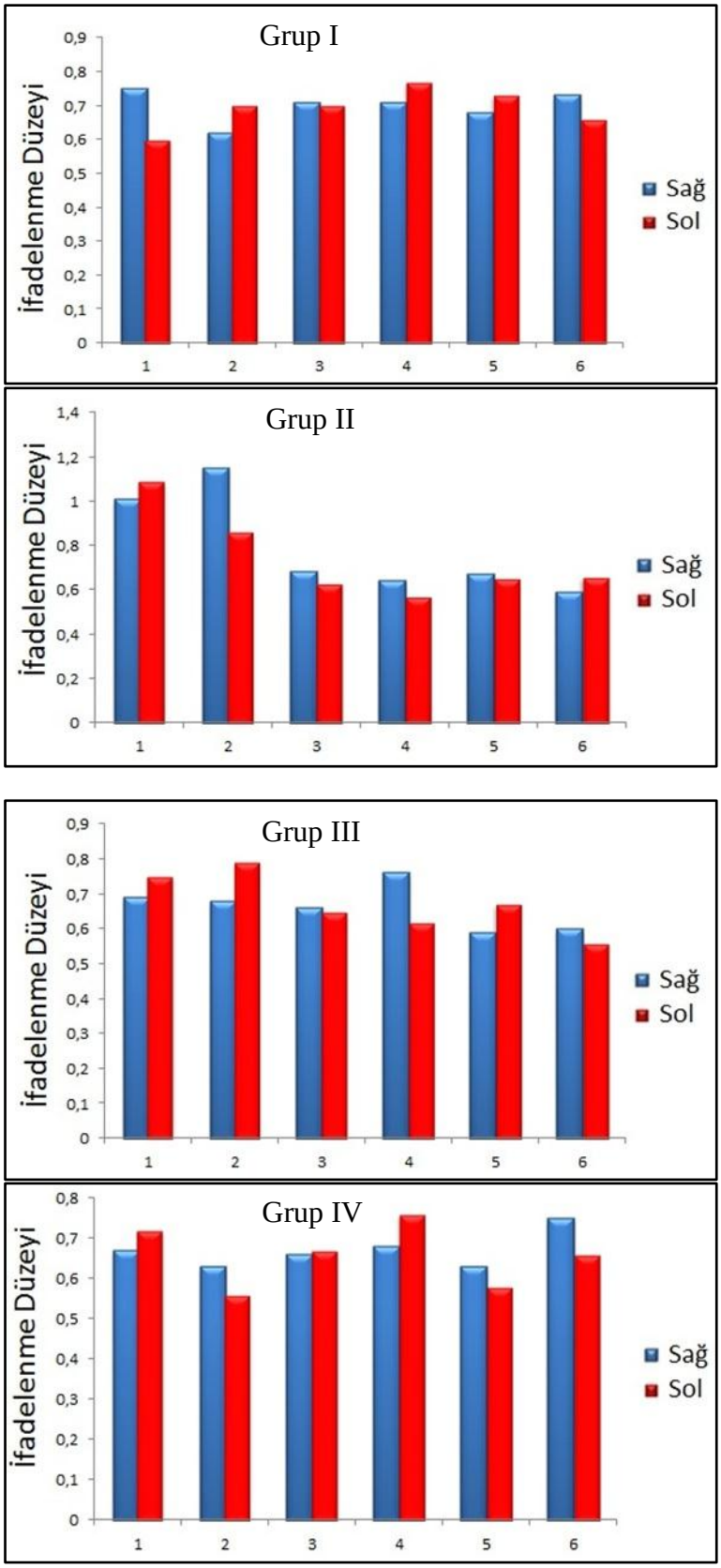
Gruplar	**SNAP-25 m-RNA ekspresyonu**		**p***
	Sağ Kulak	**Sol Kulak**	
Grup 1	43,6	38,5	0,47
Grup 2	41,5	41,4	0,9
Grup 3	43,2	42,8	0,35
Grup 4	45,4	50	0,6

Tablo 14: Deney gruplarında sağ ve sol kulak anterior auricular kaslarda SNAP-25 proteini m-RNA ekspresyonu ortanca değerleri ve sağ ve sol kulakta elde edilen değerlerin istatistiksel karşılaştırılması (*Kruskal Wallis testi).

Grup I (BTxA + TZP mezoterapisi) ve Grup II (BTxA + SF mezoterapisi) sağ kulak değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,7) (Wilcoxon işaret testi).

Grup III (BTxA + TZP in vitro karışımı) ve Grup IV (BTxA + SF in vitro karışımı) sağ kulak değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,36) (Wilcoxon işaret testi).

Sonuç olarak Grup I, Grup II ve Grup III' te SNAP25 mRNA ifadelenme düzeyinin azalmasına karşın bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05).



Şekil 28: Sağ ve sol kulak anterior auricular kaslarında SNAP-25 geni m-RNA düzeyleri. Hedef genin ifade düzeyleri HPRT mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi. Tüm gruplarda $p>0,05$.

Genetik değerlendirme yöntemlerinde elde edilen bulgulara göre sonuç olarak sağ ve sol kulak anterior auricular kaslarından alınan biyopsilerde SNAP-25 proteini m-RNA ekspresyonu açısından fark bulunmamıştır. Ancak fonksiyonel, kırılmamış SNAP-25 proteini gösterecek genetik değerlendirmeye tavşan için uygun kit bulunamaması nedeniyle devam edilmemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Botulinum toksin-Tip A (BTxA)'nın yüz kırışıklıklarının tedavisinde kullanımında bazı yan etkiler görülebilmektedir. Hayatı tehdit eden ciddi yan etkiler bildirilmemiş olsa da ortaya çıkan bazı komplikasyonların tedavisi güç olabilmektedir.[88] Enjeksiyon bölgesinde ağrı, ödem, eritem ve ekimoz en sık karşılaşılan yakınmalardır. Bunlar genellikle enjeksiyonun kendisinden kaynaklanan ve BTxA ile ilgili olmayan, kendini sınırlayan ve kısa zaman içinde kendiliğinden kaybolan yan etkilerdir. Ancak kaş ve göz kapağı pitozu (glabellar uygulamalarda % 0-5,4), dudak pitozu (periorbital uygulamalarda % 0-10) gibi daha ciddi ve rahatsız edici komplikasyonlar da görülebilmektedir.[89] BTxA'nın uygun teknikle saklanması, dilüsyonu ve enjeksiyonu ile komplikasyon oranları düşürülebilir.

BTxA uygulamalarının komplikasyonlarının ve yan etkilerinin tedavisinde elimizde çok fazla seçenek yoktur. Eritem ve ekimoz işlem bölgesi soğutularak azaltılabilir. Asimetri durumunda kontralateral tarafa BTxA uygulamaları yapılabilir. Göz kapağı pitozunda α-2 adrenerjik etkiyle Müller kası kontraksiyonuna neden olan ve 1-3 mm göz kapağı yükselmesi sağlayan aproklonidin göz damlaları kullanılabilir.[90] Asetilkolinesteraz (pyridostigmine) kullanımı ile olumlu sonuçlar bildirilmiştir.[91] BTxA uygulamaları sonrası oluşan göz kapağı pitozunun tedavisinde Scott tarafından human botulinum immunglobulin kullanılmış olsa da immunglobulinin BTxA enjeksiyonundan sonra 4 saat içinde kullanılması gerektiğinden klinik kullanımı yaygınlaşmamıştır.[92]

BTxA etkisinin azaltılması veya inhibe edilmesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi dışında başta Mikrobiyoloji, Enfeksiyon Hastalıkları, Biyokimya ve Genetik bilim dalları olmak üzere birçok bölümün üzerinde çalıştığı bir konudur. 2000'li yıllara kadar botulizm tedavilerinin tümü antikor tabanlı tedavilerdi. Bu tedavilerin etkinlikleri sınırlıydı çünkü toksin hücre içindeki hedefine ulaştığında etkileri geri döndürülemiyordu. 2000'li yıllarda çeşitli yeni kimyasalların bulunması ve biyomühendisliğin gelişmesi ile özellikle "BTxA hafif zincir metalloproteinazı" inhibe eden bazı kimyasallar (NSC 240898, JTH-NB72-39) keşfedilmiştir.[68,93]

Son 10 yıldır botulinum toksin inhibitörü çalışmalarında özellikle SNARE proteinlerini hedef alan hafif zincir çinko metalloproteazı inhibe etmek amaçlanmaktadır. Birçok peptid, organik madde, peptidomimetik bu amaçla denenmiş, bazılarında da başarılı

olunmuştur. Örneğin bis(5-amidino-2benzimidazolil) BTxB'nin aktif bölgesindeki çinkoyu çıkaran ve aktif bölgeyi yeniden şekillendiren bir yapıdadır.[68] İlk irreversibl inhibitör ise 2010 yılında Capkova ve arkadaşları tarafından benziliden siklopentenedion yapıda aktif bölgeye kovalent modifikasyon yapan bir madde olarak tanımlanmıştır.[70] Bilgisayarlı biyokimyasal yöntemler ile tanımlanan maddelerin hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde yapılan toksisite çalışmalarında bunlardan birçoğunun etkisiz veya kendisinin de sitotoksik olduğu görülebilmektedir. Özellikle BTxA'ya maruziyet sonrası kullanılabilecek ve onun etkilerini geri döndürebilecek, kullanımı kolay, çevre koşullarına dayanıklı bir ilaç arayışı tüm dünyada devam etmektedir. Günümüzde botulinum intoksikasyonunda hayat kurtarıcı tek çözüm mekanik ventilasyondur.

Adekar ve arkadaşları 2008 yılında kimyasal ilaçların yanı sıra insan kanında doğal halde bulunabilen IgM yapısındaki bazı antikorların da BTxA letal dozlarını tamamen nötralize edebileceğini ve insanlardaki doğal antikor havuzunun bu biyolojik toksine karşı koyabileceğini rapor etmiştir.[94]

Botulinum toksin uygulamalarından sonra %4-10 oranında bir tedavi yetersizliği görülebilir.[95,96] Uygun doz ve teknik uygulansa bile BTxA etkisi görülmeyebilir. Bu durumdan BTxA nötralize edici antikorlar suçlanmıştır. Ancak vakaların çoğunda nötralize edici antikorların varlığı laboratuvar testleri ile ortaya konulmamıştır. Yani bu vakalarda BTxA' nın etki göstermesini engelleyen veya etkisini azaltan başka faktörler de olabilir.

Mezoterapi her ne kadar ilaç ve yardımcı madde (bitki özleri, vitaminler, eser elementler vb.) karışımlarının çok sayıda ve küçük hacimde enjeksiyonlarla intradermal veya subkutan olarak uygulanması anlamına gelse de bu tedavide hedef organ her zaman deri ve deri ekleri değildir. Fibromyalji, başağrısı, bel ağrısı, tendinit, bursit tedavisi için piroksikam, ketorolak, baklofen, diazepam karışımları bu yöntemle kullanılmıştır.[76,78] Buflomidil ve pentoksifilinin lokal doku mikrosirkülasyonunu arttırarak etkili olduğu düşünülmüştür. Enjeksiyon lipoliz amacıyla fosfatidil kolin, L-Karnitin, hyalurinidaz, kollajenaz, glikolik asit, retinoik asit , multivitaminler (ADEK), eser elementler (Çinko, bakır, selenyum, krom, mangenez), lidokain, tiroid hormonları, aminofilin, isoproterenol kullanılmaktadır.

Mezoterapi etkinliğinin mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da bu yöntemle bölgesel yararlılık sağlanması, mezoterapi yöntemi ile uygulanan ilaçların bölgesel mikro dolaşıma geçtiği ve lokal etki gösterdiğini düşündürmektedir.[78]

Özellikle Fransa, İtalya ve İspanya' da mezoterapi mekanizması, etkinliği ve güvenliği üzerine yayınlar daha fazladır. Literatürde mezoterapi uygulamaları ile memnun edici sonuçlar alındığına dair yayınlar kadar mezoterapi uygulamalarını sorgulayan ve etkinliğinin olmadığını savunan yayınlar da mevcuttur. Örneğin Iorizzo mezoterapiyi yüz, el ve boyun gençleştirmesi amacıyla etkin olarak kullandığını belirtmiştir.[97] Ancak Amin ve arkadaşları 2006'da mezoterapinin yüz gençleştirmede etkin bir yöntem olmadığını klinik ve histolojik değerlendirmelerle sunmuştur.[98] Park ve arkadaşları 2008'de mezoterapinin vücut şekillendirmede etkin bir yöntem olmadığını bildirmişlerdir.[99]

Trombositten Zengin Plazma (TZP) mezoterapisini konu alan Kim ve arkadaşlarının 2011'de yayınladığı çalışmada TZP'nin fibroblast kültürleri üzerinde proliferatif etkisi olduğu ve hücrelerdeki tip-1 kollajen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.[11] Nakamura ve arkadaşları ise 2010 yılında TZP'nin yağ grefti kalıcılığına etkisini araştırmıştır.[61] TZP'nin yağ grefti hacminin korunmasında ve yağ grefti sağkalımında etkin olduğu saptanmıştır. Cervelli ve arkadaşları da 2009'da yüze uygulanan yağ grefti ve TZP karışımı ile olumlu klinik sonuçlarını bildirmiştir.[15]

Sonuç olarak mezoterapi ve TZP mezoterapisi etkinliği ve güvenliği üzerine çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde seçilmiş olgularda uygulanabilecek minimal-invazif yüz gençleştirme prosedürlerinden biridir.

Trombositten Zengin Plazma'nın hem serum hem de aktive trombositlere sahip olmasıyla serumda ve trombositlerin α-granülü içinde bulunan α-2 makroglobulinden zengin olabileceği düşünülebilir. α-2 makroglobulin metalloproteazlar ve diğer tüm proteazlar (serin, treonin, sistein, aspartic) üzerinde inhibitör etki gösteren genel bir proteaz inhibitörüdür. Sadece endojen kaynaklı metalloproteazlara (Matriks Metalloproteinazları (MMPs), adamolisin-benzeri proteazlar (ADAMs) ve ostosinler) değil aynı zamanda patojenler tarafından üretilen veya bazı yılan zehirlerinde bulunan metalloproteinazlara karşı da etkin olduğu bilinmektedir.

Miyoshi ve arkadaşları tarafından 1991'de bir patojen (Vibrio vulnificus) tarafından üretilen MP'ın da α-2 makroglobulin ile inhibe edilebileceğini gösterilmiştir.[81] Saidi ve arkadaşları tarafından 1999'da α-2 makroglobulinin metalloproteinaz yapıdaki Lebetase isimli yılan zehirini inhibe ettiğini saptamıştır.[82]

Botulinum toksinin hafif zincir metalloproteinazı SNAP-25 proteinini kırarak etkisini gösterir. Asetilkolinin sinaptik aralığa ekzositozu gerçekleşemez. Bir metalloproteinaz

yapısında olan botulinum toksinin de bir oranda α-2 makroglobulin ile inhibe olabileceği düşünülmüştür. Trombositten Zengin Plazma'nın bu yolla botulinum toksin aktivitesinde bir azalmaya neden olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın amacı TZP'nin BTxA aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmaktır. TZP mezoterapisi ve glabellar, frontal ve lateral orbital kırışıklıkların tedavisi için BTxA uygulamalarının aynı seansta yapıldığı bazı hastalarda BTxA aktivitesinin ortaya çıkmadığını veya yetersiz olduğunu gözlemlememiz bu çalışmanın klinik temelini oluşturmuştur.

Deney modeli olarak 2003 yılında Jabor ve arkadaşlarının tanımladığı tavşan anterior auricular kas modeli seçilmiştir.[74] Bu modelde anterior auricular kas paralizisi yapan botulinum toksin etkin dozu belirlenmiştir. Çalışmamızda da aynı BTxA dozları kullanılmıştır. Bu model Görgü ve arkadaşları tarafından 2006'da işlem bölgesine ağrı kontrolü için uygulanan lokal anestezikler ile botulinum toksin etkileşimini gösterilmesinde[75], Elmas ve arkadaşları tarafından da 2007'de taze ve bekletilmiş BTxA etkinlik farklarının gösterilmesinde kullanılmış bir modeldir.[73] Model hem kulak pozisyonlarındaki değişimler ile görsel değerlendirmeye, hem kas aksiyon potansiyeli ölçümleri ile elektronöromyografik çalışmaya hem de alınacak kas biyopsileri ile histolojik veya çalışmamızda yaptığımız gibi genetik çalışmalara izin vermektedir. Aynı zamanda alerjik reaksiyon riskini dışlamak için tüm hayvanlardan otolog TZP hazırladığımızdan güvenli olarak 8ml kan alınabilecek ve alındıktan sonra hayvanın yaşatabileceği en küçük denek tavşan olması bu modeli seçmemizde etkili olmuştur.

Gruplar oluşturulurken Grup I birinci çalışma grubu, Grup II ise Grup I'in kontrol grubu olarak planlanmıştır. Aynı şekilde Grup III ikinci çalışma grubu, Grup IV ise Grup III'ün kontrol grubu olarak tasarlanmıştır. Bu modelin kullanıldığı çalışmalarda hem aynı denekte kulakların birbirine göre konumu ve ölçüm değerleri hem de gruplar arasındaki genel farklar önem taşımaktadır. Mezoterapinin özünde çoklu intradermal uygulama olduğundan el becerisi önem taşımaktadır. Tavşan derisi her ne kadar uygulamalar öncesinde traşlanmış olsa dahi insan derisinden farklıdır. Derinin uygulama alanından kayması ve iğne batırma kuvvetinin ayarlanması öncelikle uygulama alıştırması yapılması gerekmektedir. Mezoterapi sonrası deri üzerinde kalan TZP klinik kullanımda deri üzerine yayılır ve 12 saat burada kalması önerilir. Klinik uygulamaya benzer bir şekilde deneğe uygulanan mezoterapi sıvılarından deri üzerinde kalan miktar yine deri üzerine yayılarak bırakılmıştır.

TZP mezoterapisinin uygulanacağı alan anterior auricular kas üzerindeki derinin 2x1 cm'lik alanı olarak tespit edilmiştir. Sağ taraftaki mezoterapi uygulama alanının kontralateral anterior auricular kası etkilememesi için mezoterapi alanı ile kontralateral kas arasında en az 4 cm'lik bir uzaklık korunmuştur.

ENGM çalışmalarında çalışmanın yapıldığı noktaların işaretlenmesi ve tekrarlanacak ölçümlerde hep bu noktaların kullanılması önem taşımaktadır. Çünkü farklı noktalardan yapılacak ölçümler elde edilecek sonucu değişecektir. Çalışmamızda Jabor ve arkadaşlarının tanımladığı modeli temel alarak ve kendi yaptığımız anatomik pilot çalışmanın da sonuçlarını göz önünde tutarak anterior auricular kas tam orta noktası işaretlenmiştir. Aksiyon potansiyeli ölçümleri uygulamalardan önce ve sonra bu noktadan yapılmıştır.

Değerlendirme deneklerin kulak pozisyonlarındaki 0. ve 14. gündeki görsel değişimlerin gruplar arasında karşılaştırılması, deneklerin 0. ve 14. gündeki anterior auricular kas aksiyon potansiyeli değişimlerinin karşılaştırılması ve 14. günde deneklerden alınan anterior auricular kas biyopsilerinde BTxA'nın kas paralizisi etkisini sağlayan metalloproteinaz aktivitesinin hedefi olan SNAP-25 proteininin geninin kantitatif olarak değerlendirilmesi ve gruplar arasında karşılaştırılması ile yapılmıştır.

Uygulamalar öncesi (0.gün) yapılan görsel değerlendirmelerde deneklerin hiç birinde kulak pozisyonlarında fark görülmemiştir ve hepsinin dik pozisyonda olduğu kaydedilmiştir. Deneklerin temin edilmesi sırasında kulaklarının sağlıklı olmasına özellikle dikkat edilmiştir ve karantina süresince de kulak pozisyonlarında farklılık gelişmemiştir.

Uygulamalar sonrası 14. günde sağ tarafa TZP mezoterapisi uygulanan grupta (Grup I) ve sağ tarafa botulinum toksinin kas içine verilmeden önce TZP ile karıştırılarak verildiği grupta (Grup III) deneklerin sol kulaklarındaki düşüklüğün sağ kulağa göre daha fazla olduğu görülmüştür. Grup I'de bu farkın anlamlı olarak daha fazla olduğu saptanmıştır. Ancak Grup III için fark anlamlı bulunmamıştır. Grup II ve Grup IV'te de kulak pozisyonları açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

Elektronöromiyelografik değerlendirmede ise 0. ve 14. günlerde yapılan aksiyon potansiyeli amplitüdü ölçümlerinin farkları değerlendirilmiştir. Sıfır ve 14. günler arasında sağ kulak anterior auricular kas aksiyon potansiyeli değişim oranı ve sol kulak anterior auricular kas aksiyon potansiyeli değişim oranı arasındaki fark değerlendirilmiştir. Grup I ve Grup III'te anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Yani bu gruplarda deneklerin sağ

kulaklarına uygulanan işlemler onların BTxA'dan daha az etkilenmesine neden olmuştur. Grup II ve Grup IV'te ise anlamlı fark bulunmamıştır.

Tüm deneklerde sağ kulak anterior auricular kasta elde edilen aksiyon potansiyeli amplitüt değişimleri karşılaştırıldığında ise Grup I'in anlamlı olarak daha az değiştiği görülmüştür. Deneklerin sol kulakları arasında gruplara göre bir farklılık bulunmamıştır.

Ondördüncü günde kulak önünden bitemporal kesi yapılarak sağ ve sol anterior auricular kasları disseke edilip çıkarılmıştır. Bu örneklerden SNAP-25 proteinine ait gen kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Sağ ve sol kulakta SNAP-25 kantitatif değerlendirme sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak Grup I, Grup II ve Grup III' te SNAP25 mRNA ifadelenme düzeyinin azalmasına karşın bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grup IV' te ise mRNA ifadelenme düzeyinde artış görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak diğer değerlendirme yöntemleri ile tespit ettiğimiz değişiklikleri uyguladığımız bu genetik değerlendirme yöntemi ile gösterilememiştir.

Genetik çalışmalar sonucunda yapılan uygulamaların SNAP-25 proteine etkisi m-RNA düzeyinde olmayabileceği ve posttranslasyonel modifikasyonlar üzerinde etkisinin olup olmadığının anlaşılabilmesi için SNAP-25 mRNA ifadelenme düzeyinin belirlenmesinin yanında SNAP-25 proteinine yönelik direk çalışmaların yapılması gerektiği görülmüştür. Tavşan için bu çalışmaları yapılabileceği kit temin edilemediğinden genetik değerlendirme ancak m-RNA ifadelenme düzeyinin belirlenmesi ile yapılabilmiştir. Daha sonraki tavşan çalışmalarında değerlendirme yöntemi olarak histolojik elektron mikroskobik değerlendirme ve immünhistokimyasal değerlendirme yapılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada TZP'nin botulinum toksin aktivitesini azaltan bir etkisi olduğu saptanmıştır. Bu etkisini hem botulinum toksin enjeksiyonu yapılan kas üzerindeki alana intradermal olarak uygulandığında (mezoterapi), hem botulinum toksin kas içine uygulanmadan önce TZP ile karıştırıldığında gözlenmiştir.

TZP'den salınan büyüme faktörlerinin sinir rejenerasyonuna etkisine bakıldığında PDGF, TGF-β ve IGF-II'nin sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) sinir rejenerasyonu üzerindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, tam ayrılma veya ezilme tarzı yaralanmalardan sonra proksimal sinir segmentinde PDGF miktarının arttığı ve Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etkisi olduğu gösterilmiştir.[46] Wells ve arkadaşları 1997'de periferik sinir modelinde uyguladıkları

PDGF ve IGF-1 kombine tedavisinin aksonal rejenerasyonu önemli derecede arttırdığını saptamışlardır.[100] Oya ve arkadaşları ise PDGF'in sinir rejenersyonu üzerindeki olumlu etkilerini aksonlar ve Schwann hücreleri arasındaki ilişkiyi sağlamasına bağlamışlardır.[101] TGF-β da sinir iyileşmesinde Schwann hücreler üzerinde etkili bir büyüme faktörüdür. Sulaiman ve arkadaşları TGF-β ile inkübe edilen Schwann hücrelerinin sinir onarım alanına uygulanması sonucunda rejenere akson sayısının kontrol grubuna oranla 2 kat arttığını göstermişlerdir.[102] Trombosit α- granülü içindeki bir diğer büyüme faktörü olan IGF-II'nin sinir rejenerasyonu üzerindeki etkileri Ishii ve arkadaşları tarafından araştırılmış ve bu faktörün duyu ve motor sinir iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.[103] Sarıguney ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı çalışmada TZP'nin sinir iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.[59]

TZP'nin sinir rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri mevcuttur ancak bizim çalışmamızdaki 14 günlük sürede botulinum toksin etkisindeki sinir terminallerinden aksonal filizlenme yoluyla yeni kas-sinir kavşağı oluşturup fonksiyonu geri döndürebilmesi güçtür.

BTxA aktivitesini daha oluşmadan tamamen inhibe edebilecek ve güvenlik-toksisite deneyleri tamamlanmış bir madde henüz yoktur. Ancak BTxA'nın etkisini özellikle belirli oranlarda azaltan bazı kimyasallar bulunmuştur.[68] BTxA bir Zn-metalloproteinazdır. α-2 makroglobulin ise hem serumda hem de trombosit α-granülünde bulunan genel bir proteaz inhibitörüdür. Serin, sistein, treonin ve aspartic proteazlara karşı inhibitör etki gösterdiği gibi metalloproteazlara karşı da inhibitör etki göstermektedir. α-2 makroglobulinin BTxA ile etkileşimine ait yeterli bilgi yoktur ancak α-2 makroglobulinin patojen metalloproteazlarına ve bazı yılan zehiri metalloproteazlarına inhibitör etki gösterdiği bilinmektedir. Miyoshi ve arkadaşları bir patojen (Vibrio vulnificus) tarafından üretilen metalloproteazın da α-2 makroglobulin ile inhibe edilebileceğini gösterilmiştir.[81] Saidi ve arkadaşları ise α-2 makroglobulinin metalloproteinaz yapıdaki Lebetase isimli yılan zehirini inhibe ettiğini saptamıştır.[82]

Çalışmamızda kontrol gruplarından elde edilen veriler ile (Grup II ve Grup IV) mezoterapi tekniğinin kendisinden veya tüp içindeki sodyum sitrattan kaynaklanan bir nedenle botulinum toksin aktivitesinin etkilenmediği saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada Trombositten Zengin Plazma'nın Botulinum toksin tip-A'nın kas paralizi edici özelliğini azalttığını saptanmıştır. Bunun serumda ve trombosit α-

granülü içinde bulunan bir metalloproteinaz inhibitörü olan α-2 makroglobuline bağlı olabileceğini düşünülmüştür ve bu yönde yeni çalışmalar planlanmıştır.

İki yaygın yüz gençleştirme yöntemi olan TZP mezoterapisin ve BTxA uygulamalarının birlikte aynı yapıldığında BTxA'nın kas paralize edici aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre TZP mezoterapisi ve BTxA uygulamalarının birlikte yapılmaması tarafımızca önerilmektedir.

BTxA uygulamalarında yüzeyel venlerin hasar görmemesi ve hematom oluşmaması için için özen gösterilmektedir. Ancak buna rağmen enjeksiyon bölgelerinde hematom oluşabilmektedir. Hematom oluşan hastalarda BTxA etkinliğinin değiştiğine dair bir bilimsel kanıt bulunamamıştır. Çalışmamızın bulgularıyla enjeksiyon bölgesindeki lokalize küçük hematomların BTxA'nın etkinliğini düşürebileceği düşünülmüştür ve bu konuda da bir çalışma planlanmıştır.

Botulinum toksin inhibisyonu, etkisinin azaltılması ve botulizm tedavisi tüm dünyada bilimin uğraş verdiği bir konudur. Bu çalışmanın aynı zamanda botulizm tedavisine ve önlenmesine de katkıda bulunabileceğini düşünülmüştür.

.

6. ÖZET

Trombositten Zengin Plazma Mezoterapisinin Botulinum Toksin Tip-A ile oluşturulan Çizgili Kas Paralizisine İnhibitör Etkisi

Trombositten Zengin Plazma (TZP) otolog kanın santrifüj edilmesiyle oluşturulan trombosit konsantresidir. Günümüzde yara iyileşmesine üzerine olumlu etkileri ve hücre proliferasyonuna neden olması nedeniyle bir çok alanda kullanılmaktadır. Bu etkilerini α-granülleri içindeki büyüme faktörleri ile sağlamaktadır. Bu granüller aynı zamanda pıhtılaşma faktörleri, proteinler ve bazı enzimler içemektedir. Botulinum toksin tip-A (BTxA) metalloproteinaz aktivitesi olan bir nörotoksindir. Kas-sinir terminalinde SNAP-25 proteinini kırarak asetil kolin salınımını önler ve kas paralizisi oluşturur. Bu çalışmanın amacı TZP'nin BTxA ile oluşan çizgili kas paralizisine etkisini araştırmaktır.

Bu çalışmada 24 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşan Anterior Auricular kas (AAK) modelinde çalışıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı ve sağ ve sol kulak AAK ve kas üzerindeki deriye enjeksiyonlar yapıldı. ACR Regenkit® kullanılarak her denekten otolog TZP hazırlandı. BTxA için Botox® kullanıldı. Grup I'de (n=6) deneklerin sağ ve sol kulak AAK'larına 2,5 U BTxA ve sağ kulak AAK üzerindeki deriye TZP mezoterapi yoluyla (intradermal) uygulandı. Grup II (n=6) bu grubun kontrolü grubu olarak tasarlandı ve deneklerin sağ ve sol kulak AAK'larına 2,5 U BTxA ve sağ kulak AAK üzerindeki deriye TZP yerine serum fizyolojik ile santrifüj edilmiş ACR Regenkit AAK üzerindeki deriye mezoterapi yoluyla uygulandı. Grup III (n=6) in-vitro karşılaşma grubu olarak tasarlandı. Grup III sağ kulak AAK'ya TZP ile birebir karıştırılmış 2,5 U (0,05cc) BTxA, sol kulak AAK'ya serum fizyolojik ile bir daha bire bir dilue edilmiş BTxA uygulandı. Grup IV (n=6) bu grubun kontrol grubu olarak tasarlandı ve sağ AAK'ya serum fizyolojik ile santrifüj edilmiş ACR Regenkit sıvısı ile BTxA karıştırılıp yapıldı. Sol kulak AAK'ya Serum fizyolojik ile bir daha bire bir dilue edilmiş BTxA uygulandı

Uygulamalar öncesinde tüm deneklerin bilateral AAK Aksiyon potansiyeli ölçümleri için elektronöromyografi yapıldı. Uygulamalar sonrası 14. günde deneklerin kulak pozisyonlarındeki değişim fotoğrafik olarak kaydedildi ve derecelendirildi. Kas aksiyon potansiyeli ölçümleri 14. günde tekrarlandı. Daha sonra AAK biyopsileri alındı ve SNAP-25 m-RNA kantitatif PCR yöntemi ile belirlendi.

Görsel ve elektronöromyografik bulgular incelendiğinde TZP mezoterapisi uygulanan grupta (Grup I) sağ taraftaki kulağın (TZP mezoterapisi uygulanan taraf) pozisyonu daha dik ve kas aksiyon potansiyeli amplitüdü daha yüksek olduğu saptandı. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.

Grup II'de sağ ve sol kulakların değerlendirme yöntemleri bulguları açısında anlamlı fark bulunamadı.

Grup III'te (TZP ve BTxA'nın in vitro karıştırıldığı grup) görsel bulgularda fark saptanmadı ancak sağ taraftaki kulağın (TZP ve BTxA'nın in vitro karıştırıldığı taraf) kas aksiyon potansiyeli amplitüdünün daha yüksek olduğu saptandı. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.

Grup IV'te sağ ve sol kulakların değerlendirme yöntemleri bulguları açısında anlamlı fark bulunamadı.

SNAP-25 proteinin m-RNA kantitatif PCR ile değerlendirlmesi sonucunda SNAP-25 proteinine ait genlerin m-RNA düzeyinde tüm kas biyopsilerinde ifade edildiği görüldü. Sağ ve sol kulak anterior auricular kaslarından alınan biyopsilerde SNAP-25 proteini m-RNA ekspresyonu açısından fark bulunmadı. Ancak posttransyasyonel modifikasyonlar seviyesinde fark bulunabileceği düşünüldü. Botulinum toksinin metalloproteaz aktivitesindeki azalmayı belirleyebilecek olan kırılmamış SNAP-25 proteini miktarının gösterilmesi gerektiği düşünüldü.

Elde edilen veriler ile TZP'nin BTxA'nın kas paralize edici etkisini azalttığı saptandı. Bu etkileşimi hem kas üzerinde mezoterapi yoluyla uyguladığımızda hem de tüp içinde karıştırıldığında yarattığı tespit edildi. TZP'nin bu etkisinin hem trombosit α-granülü içinde hem de serumda bulunan bir genel proteaz inhibitörü olan α-2 makroglobulinden kaynaklanabileceği tartışıldı ve moleküler düzeyde bu etkileşimi kanıtlayabilecek başka çalışmaların önü açıldı ve planlandı.

7. İNGİLİZCE ÖZET

The Inhibitory Effect of Platelet Rich Plasma Mesotheraphy on Botulinum Toxin Type-A induced Skeletal Muscle Paralysis

Platelet Rich Plasma (PRP) is a platelet concentrate that is produced from autologous blood by centrifugation. PRP is used in various areas of medicine because of its wound healing and cell proliferation effects. These effects depend on growth factors in α granules of platelets. They also have various coagulation factors, proteins and enzymes. Botulinum toxin type-A (BTxA) is a neurotoxin which have a metalloproteinase activity. BTxA causes muscle paralysis as it breaks SNAP-25 perotein in nerve terminal and prevents acetyl-choline release to neuromuscular juction. Aim of this study is to investigate the effect of PRP on BTxA induced skeletal muscle paralysis.

Anterior auricular muscle (AAM) model was used in twenty-four New Zeland Rabbit which had been studied in 4 groups. Right and left AAM and skin over the AAM's were used for injection procedures. Autologous PRP was prepared with ACR Regenkit® for all rabbits. BOTOX was used for botulinum toxin type-A injections. 2,5U BTxA was injected to bilateral AAM intramuscularly and 1cc autologous PRP intradermally (PRP mesotheraphy) in Group I (n=6). Group II (n=6) was designed as control group of group I and 2,5U BTxA was injected to bilateral AAM intramuscularly and 1cc %0.9 NaCl that was centrifuged in ACR Regenkit was injected intradermally. Group III (n=6) was designed as in-vitro mixture group. 2,5 U BTxA (0,05ml) and 0,05ml PRP was mixed in laboratory tube and then was given intramuscularly to right AAM of rabbits. 2,5 UBTxA (0,05ml) and equal volume %0.9 NaCl was mixed and injected to left AAM. Same procedure was done in Group IV (n=6) except 2,5 U BTxA and 0,05ml %0.9 NaCl that was centrifuged in ACR Regenkit was mixed and used on right side.

Electroneuromyolographic (ENMG) study was done before all procedures. Right and left AAM action potantial amplitude was noted. Fourteen days after the procedures visual study according to position of rabbits was done. Then ENGM study was repeated. Also genetical evaluation was done in muscle samples on 14th day. for SNAP-25 protein m-RNA was evaluated with Quantitative Real-Time PCR.

In visual and ENGM studies it is observed that there was less BTxA activity on right side muscles of Group I (PRP mesotherapy group). These differences were statistically significant. No significant differences were found in Group II.

When the findings of Group III (PRP in-vitro mixture group) were evaluated it was seen that the reduction rate of action potential amplitude of right AAM was significantly lower than left side. There was no significant differences in Group IV.

SNAP-25 mRNA expression was observed in all muscle samples. No significant difference was found between groups and right/left side AAM's of rabbits. It is tought that maybe there was a difference in posttranslational modification level. But we could not use the technique that unbroken SNAP-25 proteins could be detected.

In the light of these findings we found that PRP have an inhibitory effect on BTxA activity. We observed this effect after PRP mesotheraphy and also in-vitro PRP/BTxA mixture. We could not explain the exact mechanism underlying this interaction but we assumed that the α-2 macroglobuline in platelet's α-granüle and serum may have some inhibitory effect on BTxA because α-2 macroglobuline had a general protease inhibitör activity. New studies are designed to investigate this interaction between PRP and BTxA.

8. KAYNAKLAR

1) Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. Plast Reconstr Surg. 2001;107(1):229-37.
2) Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, Orlandi A. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. Tissue Eng Part C Methods. 2009;15(4):625-34.
3) Batista MA, Leivas TP, Rodrigues CJ, Arenas GC, Belitardo DR, Guarniero R.Comparison between the effects of platelet-rich plasma and bone marrow concentrate on defect consolidation in the rabbit tibia. Clinics (Sao Paulo). 2011;66(10):1787-92.
4) Javed F, Al-Askar M, Al-Rasheed A, Al-Hezaimi K. Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. Arch Oral Biol. 2011;56(12):1476-84.
5) Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. J Surg Res. 2012;173(2):258-66.6.
6) Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. Ophthalmology. 2007;114(7):1286-1293.
7) Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. Blood Rev 1993; 7: 52-62.
8) Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. Int J Oral Maxillofac Surg 2002; 31: 615-9.
9) 9.Okuda K, Kawase T, Momose M, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. J Periodontol 2003; 74: 849-57.
10) Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. Eplasty. 2011;11:e38.
11) Kim DH, Je YJ, Kim CD, Lee YH, Seo YJ, Lee JH, Lee Y. Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. Ann Dermatol. 2011;23(4):424-31.
12) Cho JM, Lee YH, Baek RM, Lee SW. Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2011;64(2):e31-9.

13) Sclafani AP. Applications of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. Facial Plast Surg. 2009;25(4):270-6.
14) Lee JW, Kim BJ, Kim MN, Mun SK. The efficacy of autologous platelet rich plasma combined with ablative carbon dioxide fractional resurfacing for acne scars: a simultaneous split-face trial. Dermatol Surg. 2011;37(7):931-8.
15) Cervelli V, Palla L, Pascali M, De Angelis B, Curcio BC, Gentile P. Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. Aesthetic Plast Surg. 2009;33(5):716-21.
16) Kakudo N, Kushida S, Minakata T, Suzuki K, Kusumoto K. Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. Med Mol Morphol. 2011;44(4):233-6.
17) Welsh WJ. Autologous platelet gel: clinical function and usage in plastic surgery. Cosmetic Derm 2000;11:13e9.
18) Cesare Montecucco, Giampietro Schiavo. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. Molecular Microbiology. 1994;13(1):1- 8.
19) Frank J. Lebeda , Regina Z. Cer , Uma Mudunuri , Robert Stephens , Bal Ram Singh, Michael Adler. The Zinc-Dependent Protease Activity of the Botulinum Neurotoxins. Toxins 2010;2: 978-997.
20) Eubanks, L.M.; Hixon, M.S.; Jin, W.; Hong, S.; Clancy, C.M.; Tepp, W.H.; Baldwin, M.R.; Malizio, C.J.; Goodnough, M.C.; Barbieri, J.T.; Johnson, E.A.; Boger, D.L.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. An in vitro and in vivo disconnect uncovered through high-throughput identification of botulinum neurotoxin A antagonists. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007;104:2602–2607.
21) Rendu GL, Fitzgerland ML, Polgar J: Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. Blood 2000;96(10):3334-3342.
22) Daimon T, Mizuhira V, Takahashi I, Uchida K. The surface connected canalicular system of carp (Cyprinus carpio) thrombocytes: its fine structure and three-dimensional architecture. Cell Tissue Res. 1979;203(3):355-65.
23) White JG, Rao GH. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. Am J Pathol. 1998;152(2):597-609.

24) Carroll C, Carroll SM, Schuschke DA, Barker JH: Augmentation of skeletal muscle flap survival using Platelet Derived Growth Factor. Plast Reconstr Surg. 1998;102(2):407-415.

25) Colville-Nash PR, Willoughby DA: Growth factors in angiogenesis:current interest and therapeutic potential. Mol Med Today. 1997;3:14-23.

26) Lorente-Pérez-Sierra A, Ortega-Aranegui R, Martín-Ares M, López-Quiles-Martínez J, Martínez-González JM. Quantification of growth factors by using a new system for obtaining platelet-rich plasma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16(4):e614-8.

27) Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost. 2004;91:4-15.

28) Brissett AE, Hom DB: The effects of tissue sealants, platelet gels and growt factors on wound healing. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;11:245-250.

29) Green DM, Klink B: Platelet gel as an intraoperatively produced platelet-based alternative to fibrin glue. Plast Reconstr Surg. 1998;101(4):1161-1162.

30) Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK: Stimulation of granulation tissue formation by Platelet-derived Growth Factor in normal and diabetic rats. J Clin Invest. 1985;76:2323-2329.

31) Hsu C, Alto P, Chang J: Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. J Hand Surg. 2004;29A(4): 551-563.

32) Knighton DR, Fiegel VD, Austin LL, Ciresi KF, Butler EL: Classification and treatment of chronic non healing wounds: Successful treatment with autologous Platelet-derived wound healing factors (PDWHF). Ann Surg. 1986;204(3): 332-330.

33) Park SI, Lee HR, Kim S, Ahn MW, Do SH. Time-sequential modulation in expression of growth factors from platelet-rich plasma (PRP) on the chondrocytecultures. Mol Cell Biochem. 2012;361(1-2):9-17

34) Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. Curr Pharm Biotechnol. 2012;13(7):1207-30.

35) Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. Curr Pharm Biotechnol. 2012;13(7):1231-56.

36) Jiang ZQ, Liu HY, Zhang LP, Wu ZQ, Shang DZ. Repair of calvarial defects in rabbits with platelet-rich plasma as the scaffold for carrying bone marrow stromal cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012;113(3):327-33.

37) Linkart TA, Mohan S, Baylink DJ: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. Bone. 1996;19(1 Suppl):1-12.

38) Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A: Platelet gel for healing cutaneous chronic wounda. Transfus Apher Sci. 2004;30:145-151.

39) Currie LJ, Sharpe JR, Martin R: The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements. A Review. Plast Reconstr Surg. 2001;108(6):1713-1726.

40) Marukawa E, Oshina H, Iino G, Morita K, Omura K. Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft. J Craniomaxillofac Surg. 2011;39(4):278-83.

41) Findikcioglu K, Findikcioglu F, Yavuzer R, Elmas C, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma and fibrin glue on healing of critical-size calvarial bone defects. J Craniofac Surg. 2009;20(1):34-40.

42) Steed DL: Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for treatment of lower extremity diabetic ulcers. J Vasc Surg. 1995;21: 71-81.

43) Nagai MK, Embil JM. Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. Expert Opin Biol Ther. 2002;2(2):211-8.

44) McGee GS, Broadley KN, Buckley A, Aquino A, Woodward SC, Demetriou AA, Davidson JM: Recombinant Transforming Growth Fctor Beta accelerates incisional wound healing. Curr Surg. 1989;46:103-106.

45) Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, Nguyen T, Karla A. Transforming Growth Factor-β1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1996;122(2):171-177.

46) Kanazawa S, Fujiwara T, Matsuzaki S, Shingaki K, Taniguchi M, Miyata S, Tohyama M, Sakai Y, Yano K, Hosokawa K, Kubo T. bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. PLoS One. 2010;5(8):122-28.

47) Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16(5):635-41.

48) Nagato H, Umebayashi Y, Wako M, Tabata Y, Manabe M. Collagen-poly glycolic acid hybrid matrix with basic fibroblast growth factor accelerated angiogenesis and granulation tissue formation in diabetic mice. J Dermatol. 2006;33(10):670-5.

49) Nakamizo S, Egawa G, Doi H, Natsuaki Y, Miyachi Y, Kabashima K. Topical Treatment with Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Wound Healing and Barrier Recovery Induced by Skin Abrasion. Skin Pharmacol Physiol. 2012;26(1):22-29.

50) Emel E, Ergün SS, Kotan D, Gürsoy EB, Parman Y, Zengin A, Nurten A. Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model. J Neurosurg. 2011;114(2):522-8.

51) .Lyras DN, Kazakos K, Georgiadis G, Mazis G, Middleton R, Richards S, O'Connor D, Agrogiannis G. Does a single application of PRP alter the expression of IGF-I in the early phase of tendon healing? J Foot Ankle Surg. 2011;50(3):276-82.

52) Hu Z, Peel SA, Ho SK, Sándor GK, Clokie CM. Platelet-rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(1):43-8.

53) Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plast Reconstr Surg. 2004;114(6):1502-8.

54) Bertrand-Duchesne MP, Grenier D, Gagnon G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. J Periodontal Res. 2010;45(1):87-93.

55) Kaux JF, Le Goff C, Seidel L, Péters P, Gothot A, Albert A, Crielaard JM. Comparative study of five techniques of preparation of platelet-rich plasma. Pathol Biol (Paris). 2011;59(3):157-60.

56) Altmeppen J, Hansen E, Bonnländer GL, Horch RE, Jeschke MG. Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. J Surg Res. 2004;117(2):202-7.

57) Ogundipe OK, Ugboko VI, Owotade FJ, Paul-Odo B, Afariogun AB. Preparation of platelet-rich plasma from small volume of whole blood - A simplified approach.Niger Postgrad Med J. 2012;19(3):133-6.

58) Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg. 1997;55(11):1294-9.

59) Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(6):638-46.

60) Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C, Yenicesu I, Bolay H, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. J Reconstr Microsurg. 2008;24(3):159-67.

61) Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. Acta Orthop Scand. 2004;75(1):93-9.

62) Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M, Murakami K, Kishimoto S, Nakamura S,Yanagibayashi S, Kubo S, Yamamoto N, Kiyosawa T. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. Ann Plast Surg. 2010;65(1):101-6

63) Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. Invest Ophthalmol. 1973;12(12):924-7.

64) Carruthers JD, Carruthers JA. Treatment of glabellar frown lines with C. botulinum-A exotoxin. J Dermatol Surg Oncol. 1992;18(1):17-21.

65) Cartee TV, Monheit GD. An overview of botulinum toxins: past, present, and future. Clin Plast Surg. 2011;38(3):409-26

66) The American Society for Aesthetic Plastic Surgery, 15th Cosmetic Surgery National Data Bank Statistics. 2011.

67) Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. J Am Acad Dermatol. 2000;43:249-259.

68) Dickerson JT, Janda KD. The Use of Small Molecules to Investigate Molecular Mechanism and Therapeutic Targets for Treatment of Botulinum Neurotoxin A Intoxication. ACS Chem Biol. 2006;1(6):359-359.

69) Lebeda FJ, Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R, Singh BR, Adler M. The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins. Toxins (Basel). 2010;2(5):978-97.

70) Caccin P, Rossetto O, Rigoni M, Johnson E, Schiavo G, Montecucco C. VAMP/synaptobrevin cleavage by tetanus and botulinum neurotoxins is strongly enhanced by acidic liposomes. FEBS Lett. 2003;542(1-3):132-6.

71) Capková K, Hixon MS, Pellett S, Barbieri JT, Johnson EA, Janda KD. Benzylidene cyclopentenediones: First irreversible inhibitors against botulinum neurotoxin A's zinc endopeptidase. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20(1):206-8.

72) Aoki KR, Smith LA, Atassi MZ. Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. Crit Rev Immunol. 2010;30(2):167-87.

73) Dressler D. Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. Mov Disord. 2004;19 Suppl 8:92-100.
74) Elmas C, Ayhan S, Tuncer S, Erdogan D, Calguner E, Basterzï Y, Gozil R, Bahcelioglu M. Effect of fresh and stored botulinum toxin a on muscle and nerve ultrastructure: an electron microscopic study. Ann Plast Surg. 2007;59(3):316-22.
75) Jabor MA, Kaushik R, Shayani P, Ruiz-Razura A, Smith BK, Morimoto KW, Cohen BE. Efficacy of reconstituted and stored botulinum toxin type A: an electrophysiologic and visual study in the auricular muscle of the rabbit. Plast Reconstr Surg. 2003;111(7):2419-26.
76) Gorgu M, Silistreli O, Karantinaci B, Ayhan M, Ozdemirkıran T, Celebisoy M. Interaction of Botulinum Toxin Type A with Local Anesthesic Agents: An Experimental Study in Rabbits. Aesth Plast Surg. 2006;30:59-64.
77) Herreros FO, Moraes AM, Velho PE. Mesotherapy: a bibliographical review. An Bras Dermatol. 2011;86(1):96-101.
78) Mysore V. Mesotherapy in Management of Hairloss - Is it of Any Use? Int J Trichology. 2010;2(1):45-6.
79) Sarkar R, Garg VK, Mysore V. Position paper on mesotherapy. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2011;77(2):232-7.
80) Marco-Bonnet J, Beylot-Barry M, Texier-Maugein J, Barucq JP, Supply P, Doutre MS, Beylot C. [Mycobacterial bovis BCG cutaneous infections following mesotherapy: 2 cases]. Ann Dermatol Venereol. 2002;129(5 Pt 1):728-31.
81) Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci. 2002;115(19):3719-27.
82) Miyoshi S, Shinoda S. Alpha-macroglobulin-like plasma inactivator for Vibrio vulnificus metalloprotease. J Biochem. 1991;110(4):548-52.
83) Saidi N, Samel M, Siigur J, Jensen PE. Lebetase, an alpha(beta)-fibrin(ogen)olytic metalloproteinase of Vipera lebetina snake venom, is inhibited by human alpha-macroglobulins. Biochim Biophys Acta. 1999;1434(1):94-102.
84) Chang Y, Ge G, Greenspan DS. Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of alpha2-macroglobulin. J Biol Chem. 2006;281(51):39096-104.
85) Birkedal-Hansen H, Yamada S, Windsor J, Poulsen AH, Lyons G, Stetler-Stevenson W, Birkedal-Hansen B. Matrix metalloproteinases. Curr Protoc Cell Biol. 2003;Chapter 10:Unit 10.8.

86) Luan Y, Kong L, Howell DR, Ilalov K, Fajardo M, Bai XH, Di Cesare PE, Goldring MB, Abramson SB, Liu CJ. Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. Osteoarthritis Cartilage. 2008;16(11):1413-20.

87) Bedi A, Kovacevic D, Hettrich C, Gulotta LV, Ehteshami JR, Warren RF, Rodeo SA. The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. J Shoulder Elbow Surg. 2010;19(3):384-91.

88) Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, Fok K, Wittwer AJ, Liu RQ, Malfait AM. Alpha2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes. J Biol Chem. 2004;279(17):17554-61.

89) Vartanian AJ, Dayan SH. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. Facial Plast Surg Clin North Am. 2005;13(1):1-10.

90) Ferreira MC, Salles AG, Gimenez R, Soares MF. Complications with the use of botulinum toxin type a in facial rejuvenation: report of 8 cases. Aesthetic Plast Surg. 2004;28(6):441-4.

91) Scheinfeld N. The use of apraclonidine eyedrops to treat ptosis after the administration of botulinum toxin to the upper face. Dermatol Online J. 2005;11(1):9.

92) Karami M, Taheri A, Mansoori P. Treatment of botulinum toxin-induced eyelid ptosis with anticholinesterases. Dermatol Surg. 2007;33(11):1392-4

93) Scott AB. Preventing ptosis after botulinum treatment. Ophthal Plast Reconstr Surg. 1997;13(2):81-3.

94) Burnett JC, Ruthel G, Stegmann CM, Panchal RG, Nguyen TL, Hermone AR, Stafford RG, Lane DJ, Kenny TA, McGrath CF, Wipf P, Stahl AM, Schmidt JJ, Gussio R, Brunger AT, Bavari S. Inhibition of metalloprotease botulinum serotype A from a pseudo-peptide binding mode to a small molecule that is active in primary neurons. J Biol Chem. 2007;282(7):5004-14.

95) Adekar SP, Al-Saleem FH, Elias MD, Rybinski KA, Simpson LL, Dessain SK. A natural human IgM antibody that neutralizes botulinum neurotoxin in vivo. Hybridoma (Larchmt). 2008;27(2):65-9.

96) Jankovic J, Schwartz K. Response and immunoresistance to botulinum toxin injections. Neurology. 1995;45(9):1743-1746.

97) Dressler D. Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. Mov Disord. 2004;19 Suppl 8:92-100.

98) Iorizzo M, De Padova MP, Tosti A. Biorejuvenation: theory and practice. Clin Dermatol. 2008;26(2):177-81.

99) Amin SP, Phelps RG, Goldberg DJ. Mesotherapy for facial skin rejuvenation: a clinical, histologic, and electron microscopic evaluation. Dermatol Surg. 2006;32(12):1467-72.

100) Park SH, Kim DW, Lee MA, Yoo SC, Rhee SC, Koo SH, Seol GH, Cho EY. Effectiveness of mesotherapy on body contouring. Plast Reconstr Surg. 2008;121(4):179-85.

101) Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniades HN, Hansson HA. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. Exp Neurol. 1997;146(2):395-402.

102) Oya T, Zhao YL, Takagawa K, Kawaguchi M, Shirakawa K, Yamauchi T, Sasahara M. Platelet-derived growth factor-b expression induced after rat peripheral nerve injuries. Glia. 2002;38(4):303-12.

103) Sulaiman OA, Gordon T. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. Glia. 2002;37(3):206-18.

104) Ishii DN, Glazner GW, Pu SF. Role of insulin-like growth factors in peripheral nerve regeneration. Pharmacol Ther. 1994;62(1-2):125-44.