



BEZMİÂLEM
VAKIF ÜNİVERSİTESİ

T.C.

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

**BOTULİNUM TOKSİNİNİN KAS HACMİ ÜZERİNE
ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA EKREM GÜLEŞ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ETHEM GÜNEREN

İSTANBUL, 2018



BEZMİÂLEM
VAKIF ÜNİVERSİTESİ

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

**BOTULİNUM TOKSİNİNİN KAS HACMİ ÜZERİNE
ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. MUSTAFA EKREM GÜLEŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ETHEM GÜNEREN

İSTANBUL, 2018

TEŞEKKÜR

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi kliniğinde yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince hem cerrahi birikimini hem hayat tecrübelerini benimle paylaşan, yurt içi ve yurt dışı toplantılara katılmamız konusunda desteğini esirgemeyen, bitmeyen enerjisi ile her zaman yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Ethem GÜNEREN'e,

Zor günlerde her zaman yanımda olan, ne zaman kapısını çalsam zamanın nasıl geçtiğini anlamadan gerek bilimsel gerek gündemle alakalı konularda kendisini dinlemekten büyük keyif aldığım, iyi bir hekim olmaktan önce iyi bir insan olmayı öğütleyen, akademik olarak her zaman arkamda duran değerli hocam Prof. Dr. Selma SÖNMEZ ERGÜN'e,

Asistanlık hayatımın ilk yıllarında çalışabildiğim, “keşke daha fazla çalışma imkanı bulsaydım” dediğim, plastik cerrahide yeni ufuklar açan değerli ağabeyim Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN'a,

Asistanlığım boyunca hem teorik bilgisini hem cerrahi deneyimlerini benimle paylaşan değerli ağabeyim Doç. Dr. Kemalettin YILDIZ'a,

Asistanlığımın 2. yılından sonra tanıdığım bilimsel ve cerrahi olarak bilgilerini esirgemeyen değerli ağabeyim Doç. Dr. Osman KELAHMETOĞLU'na,

Bu çalışmaya olan bilimsel katkılarından dolayı Radyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşe ARALAŞMAK'a,

Klinikteki ilk yılımda çalışma fırsatı bulduğum ve kısa sürede tecrübelerinden faydalandığım başta değerli ağabeyim Op. Dr. Emre Gönenç BAYGÖL olmak üzere ağabeylerim Op. Dr. Mustafa Aykut ÖZPÜR, Op. Dr. Çetin DUYGU ve Op. Dr. Hacı Ömer SAĞIR'a,

Asistanlığımın ilk gününden beri yol gösteren, her konuda örnek olan, çalıştığımız süre boyunca ne zaman ihtiyacım olsa bir telefon uzaklıkta olan, cerrahi konusunda çok şey borçlu olduğum, örnek insan, değerli ağabeyim Op. Dr. Reşit Burak KAYAN'a,

Asistanlığa başladığım günden beri benden desteklerini esirgemeyen, ilk pansumanı yaptığım, ilk ameliyata girdiğim, tüm bildiklerini bana da öğreten değerli ağabeylerim Op. Dr. Onur AKMAN ve Op. Dr. İsmail Melih KUZU'ya,

Asistanlığımda beraber gülüp beraber üzüldüğüm, özverili çalışmasıyla başarılı bir cerrah olacağına inandığım değerli kardeşim Dr. Mustafa ÜNAL'a,

Asistanlığımın son dönemlerinde tanıma fırsatı bulduğum çalışma arkadaşlarım Dr. Tuğba DÜLGEROĞLU, Dr. Turan MEHDİZADE, Dr. Ufuk DURGUN, Dr. Ali YENİOCAK ve Dr. Ahmet KİRAZOĞLU'na,

Radyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Abdusselim Adil PEKER'e,

Asistanlık boyunca serviste, poliklinikte, acilde ve ameliyathanede beraber çalıştığım değerli hemşire, sekreter ve personelimize,

Tezimin hazırlanması süresinde bana yardımcı olan başta Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN olmak üzere tüm Bezmialem Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Tezimin hazırlanması süresinde yardımcı olan tüm Bezmialem Radyoloji çalışanlarına,

Bana en büyük desteği veren çalışmayı, vazgeçmemeyi kendisinden öğrendiğim, kendisini her zaman örnek aldığım babam Hasan Kürşat GüLEş, iyi bir insan olmayı bana öğretmiş, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, ne zaman ihtiyaım olsa yanımda olan annem Figen GüLEş, yıllardır kahrımı çeken, her zaman yanımda olan, beraber gülüp beraber üzüldüğüm kardeşim Yusuf Mert GüLEş, beni büyüten üzerimde çok emeği olan babaannem Habibe GüLEş olmak üzere beni bugünlere getiren, maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mustafa Ekrem GüLEş

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	IX
ÖZET	X
SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET)	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botulinum Toksin	3
2.1.1. Tarihçesi	3
2.1.2. Yapısal Özellikleri	4
2.1.3. Etki Mekanizmaları	6
2.1.4. Preparatları ve Farmakolojik Özellikleri	10
2.1.5. Kullanım Alanları	11
2.1.6. Deneysel ve Klinik Çalışmalardaki Kullanımı	13
2.1.7. Yan Etkileri	14
2.2. Benign Masseter Kas Hipertrofisi	15
2.3. Sıçan Gastroknemius Kas Anatomisi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Deney Öncesi Hazırlıklar	18
3.1.1. Pilot Çalışma	18
3.1.2. Deney Hazırlıkları	19
3.1.3. Botulinum Toksin Tip A'nın Hazırlanması	21
3.2. Çalışma Grupları	22
3.3. Radyolojik Değerlendirme	32
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	33
4. BULGULAR	34
4.1. Radyolojik Bulgular	34
4.2. Radyolojik Bulguların İstatistiksel Analizi	43

5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	55
7. KAYNAKÇA	56



KISALTMALAR DİZİNİ

BTx-A: Botulinum Toksin Tip A

PREC: Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

kD: Kilodalton

SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor

FDA: Food and Drug Administration

ACh: Asetilkolin

C: Karbon

N: Azot

VAMP: Vezikül ile İlişkili Membran Proteini (Sinaptobrevin)

SNAP-25: 25kD Sinaptozom İlişkili Protein

U: Ünite

cm: Santimetre

LD: Lethal dose

BMH: Benign Masseter Kas Hipetrofisi

gr: Gram

kg: Kilogram

mg: Miligram

im: İntramuskuler

MR: Magnetic Resonance

SF: Serum Fizyolojik

ip: İntraperitoneal

EMG: Elektromyografi

TME: Temporomandibular Eklem

BT: Bilgisayarlı Tomografi

mm³: Milimetreküp

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Botulinum Toksininin Kimyasal Yapısı

Şekil 2: Botulinum Toksininin Moleküler Yapısı

Şekil 3: Botulinum Toksininin Serotipleri

Şekil 4: Botulinum Toksin Aktivitesinin Sonlanma Aşamaları

Şekil 5: Sıçanda Gastroknemius Kasının Lateral Görüntüsü

Şekil 6: Sıçanda Gastroknemius Kası

Şekil 7: Sıçanda Gastroknemius Kasına İntramusküler Enjeksiyon

Şekil 8: Taze Sıçan Kadavrasında Gastroknemius Kas Hacminin Su Taşıırma Yöntemi ile Hesaplanması

Şekil 9: Taze Sıçan Kadavrasında Gastroknemius Kas Hacminin Volumetrik MR ile Hesaplanması

Şekil 10: Çalışma Grupları ve Barındırma Koşulları

Şekil 11: Çalışmada Kullanılan Anestezikler

Şekil 12: Botulinum Toksin Tip-A

Şekil 13: Deneyde Kullanılan Cerrahi Aletler

Şekil 14: Operasyon Öncesi Sıçanların Ağırlık Ölçümü

Şekil 15: Sıçanların Sağ Alt Ekstremitelerinin Tıraş Edilmesi

Şekil 16: Diseksiyon ve Gastroknemius Kasının Gösterilmesi

Şekil 17: Gastroknemius Kasına BTx-A Enjeksiyonu

Şekil 18: İnsizyonun Kapatılması ve Postoperatif Povidon İyot Uygulanması

Şekil 19: Sıçanlara Volumetrik MR Çekilmesi

Şekil 20: 6. Grup 6. Sıçan 0. Gün Gastroknemius Kas Hacmi Ölçümü

Şekil 21: 6. Grup 6. Sıçan 36. Gün Gastroknemius Kas Hacmi Ölçümü

Şekil 22: 6. Grup 6. Sıçan 60. Gün Gastroknemius Kas Hacmi Ölçümü

Şekil 23: 6. Grup 6. Sıçan 96. Gün Gastroknemius Kas Hacmi Ölçümü

Şekil 24: 6. Grup 6. Sıçan 120. Gün Gastroknemius Kas Hacmi Ölçümü

Şekil 25: Tek Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişim Grafiği

Şekil 26: İki Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişim Grafiği

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Botulinum Toksininin Serotipleri ve Etkileşimi Olan SNARE Proteinleri

Tablo 2: Grupların Dağılım Şeması

Tablo 3: Botulinum Toksininin Kullanım Alanları

Tablo 4: 1. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 5: 2. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 6: 3. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 7: 4. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 8: 5. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 9: 6. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 10: 7. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 11: 8. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm^3)

Tablo 12: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişimleri

Tablo 13: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişimlerinin p Değerleri

Tablo 14: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacim Yüzdelерinin Değişimleri

Tablo 15: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacim Yüzdelерinin Değişimlerinin p Değerleri

ÖZET

Estetik cerrahide kırışıklıkları düzeltmek için kullanılan Botulinum Toksin A (BTx-A)'nın klinik uygulamalarda tekrarlayan dozlarda kullanıldığında kas hacmini azalttığı bilinir. Bu etki masseter kas hipetrofisi olan hastalarda kası inaktive ederek kas hacmini azaltmak ve kontur deformitesini düzeltmek amacıyla da kullanılmıştır. Ancak etkisi geçtikten sonra kaybolan hacim geri kazanılmaktadır. Her ne kadar klinik olarak yoğun kullanılan bir tedavi modalitesi olsa da literatürde artan ve tekrarlayan dozlarda BTx-A uygulanmasının kas hacmi üzerine etkisini volumetrik (kantitatif) olarak gösteren bir çalışma bulunamadı. Sıçanlarda gastroknemius kası BTx-A araştırmaları için iyi bir modeldir. Bu çalışmada da gastroknemius kasına yapılan artan ve tekrarlayan dozlardaki BTx-A enjeksiyonu uygulamasının volumetrik MR yardımı ile kas hacmi üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada ağırlıkları 300-350 gr arasındaki 48 adet erkek Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6'şar adetlik 8 gruba ayrıldı. BTx-A enjeksiyonundan önce ve öngörülen zaman aralıklarında gastroknemius kas hacmini değerlendirmek için volumetrik MR çekimleri yapıldı. Tüm gruplarda sıçanlarda sağ alt ekstremitede vertikal insizyonu takiben diseksiyonla gastroknemius kasına ulaşıldı. 1. ve 5. gruplarda serum fizyolojik (SF), diğer gruplarda BTx-A enjeksiyonu kas içine enjekte edildi. Kas hacimleri BTx-A uygulamasının yapıldığı 0. günde (uygulamadan önce), BTx-A etkinliğinin maksimum olduğu 36. günde, BTx-A etkisinin sonlandığı 60. günde, tekrar doz yapılan grupların ikinci dozunun etkinliğinin maksimum olduğu 96. günde ve ikinci doz etkisinin sonlandığı 120. günde olmak üzere tüm gruplarda toplam 5 kez MR çekilerek değerlendirildi.

Yapılan incelemeler sonucunda tek doz enjeksiyon yapılan gruplara bakıldığında 0. gün-36. gün kas hacimlerinin ortalama değerlerindeki azalma 2., 3. ve 4. gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 0. gün-120. gün kas hacimlerindeki ortalama değişimler karşılaştırıldığında, 2. grupta 120. gün sonunda kas hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlenmediği halde, 3. ve 4. grupta 120. gün sonunda 0. gündeki kas hacmine göre gastroknemius kasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesini incelediğimizde; Grup 6'dan Grup 8'e gidildikçe; 2., 3. ve 4. gruplarda olduğu gibi doz artırıldıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü. Grup 6 ile Grup 8 kıyaslandığında ise doz arttıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olması istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. 6., 7. ve 8. gruplar, 60. gün tekrar dozları yapıldıktan sonra incelendiğinde ise 96. gündeki kas hacmi yüzdesinin 60. güne göre tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha fazla azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Bu grupların kendileri arasındaki ilişkilerine baktığımız zaman ise Grup 6'dan Grup 8'e gidildikçe doz artırıldıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü. Grup 7 ile Grup 8 ve Grup 6 ile Grup 8 kıyaslandığında ise doz arttıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

SUMMARY

Botulinum Toxin A (BTx-A) has been used in clinical cosmetic practise worldwide, especially for improving facial rhytids. Earlier studies demonstrated that the repeated doses of BTx-A cause muscle atrophy. The development of muscle atrophy following chronic exposure serves to treat masseter hypertrophy. Reduction in masseter size is apparent only after continued inhibition of muscular contraction. The injected muscle displays a reduction in volume temporarily. Despite its widespread use, there is no volumetric (quantitative) study focusing on the muscle volume alterations following the repeated injections of BTx-A with gradually increased doses. The gastrocnemius muscle has been found to be an ideal site for assessing the BTx-A effects on rats. We evaluated the effects of BTx-A injection in the right posterior gastrocnemius muscle of rats and aimed to determine the volume alterations in gastrocnemius muscle after repeated and gradually increased BTx-A injections followed by MRI assessment.

Forty-eight male Sprague–Dawley rats with ranging weights of 300 to 350 grams have been used for the study. The rats were divided into 8 experimental groups. For 6 animals per group, the alterations in gastrocnemius volume were evaluated at regular intervals before and after the BTx-A injections using MRI. A vertical incision was made in the right posterior leg of all rats for access to the gastrocnemius muscle. Groups 1 and 5 were injected sterile saline while the other groups were injected BTx-A into the muscular plane. The muscle volumes have been evaluated by MRI scanning for 5 times; on day 0 before the injection, on day 36 when the BTx-A has the maximum affect, on day 60 when the effect ends, on day 96 when the second injection has the maximum effect (on those injected) and on day 120 when the duration response of the second BTx-A injection ends.

The 2nd, 3rd and 4th groups had statistically significant mean volume loss rates on day 36 compared to the day 0 values. When comparing the mean alterations of muscle volume preoperatively and on day 120 postoperatively, there was no statistically significant loss of muscle volume of the 2nd group, while groups 3 and 4 demonstrated statistically significant loss in gastrocnemius muscle volume on day 120.

The percent amount of muscle volume changes were evaluated in groups 6,7 and 8 before (Day 0) and 36 days after the first injection. The percent amount of volume decrease was highest in group 8 and lowest in group 6, which demonstrated a similar pattern to the groups 2,3 and 4. The decrease in the percent amount of muscle volume was compared among groups 6 and 8 which demonstrated a statistically significant effect of the dose. We administered the second injection 60 days after the first injection and assessed the percent amount of muscle volume change on the 96th day; the reductions were significantly more substantial in groups 6,7 and 8 than saline controls. The associated reductions in percent amount of muscle volume were significantly more substantial when BTx-A was administered at higher doses. The reduction rate in percent amount of muscle was higher in group 8 compared to group 7, and also higher in group 7 compared to group 6. Comparing group 7 to group 8 and group 6 to group 8 respectively demonstrated an incremental decrease in percent amount of muscle at higher doses of injection which was statistically significant.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Botulinum Toksin A (BTx-A); *Clostridium Botulinum* bakterisinden elde edilen, nöromuskuler bileşkede asetilkolin salımını inhibe ederek paralitik etki gösteren güçlü bir nörotoksindir. Bu etki mimik kaslarının aktivitesine bağlı oluşan yüz kırışıklıklarının tedavisinin yanında, hiperhidrozis, tortikollis, kas denervasyonu ve flep cerrahisinde etkin olarak, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi (PREC), Göz Hastalıkları, Nöroloji, Ortopedi, Dermatoloji, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, Genel Cerrahi ve Üroloji bölümleri tarafından da kullanılmaktadır.

BTx-A ağır ve hafif zinciri olan, 150 kilodalton (kD) büyüklüğünde, metalloproteaz aktivitesi olan polipeptid bir yapıdadır. Motor-son plakta kolinerjik sinir uçlarına endositoz yoluyla alınır. Sinir uyarımı sonrası asetilkolinin sinir terminaline ekzositozunda görev alan Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor (SNARE) proteinlerine bağlanarak bu proteinlerde kırılma oluşturur. Sonuç olarak kas fibrillerinde aksiyon potansiyeli oluşamaz. [1]

BTx-A enjeksiyonu klinikte yoğun kullanılan, kalıcı olmayan, hedef kasta iyatrojenik paralizi oluşturan bir tedavi modalitesidir. Elde edilen paralizi kırışıklığın düzelmesini ve aynı zamanda kas hacminin azalmasını da sağlamaktadır [2]. Tedavinin geçici olmasının nedeni toksinin resorpsiyonu ve nörotransmitter sisteminin kendisini onarmasıdır. Bu fizyolojik iyileşme mekanizması BTx-A etkisinin kalıcı olmasının istendiği klinik durumlarda dezavantaj oluşturmaktadır. Konu ile ilgili deneysel çalışmalar için sıçan gastrocnemius kası uygun bir modeldir [3-6].

Nörotransmitter mekanizmasının kalıcı blokajını elde etmek başka ajanlarla mümkün olsada, çalışmamızda BTx-A tedavisinin geçici etkisi (reversible) nedeniyle tekrarlayan BTx-A tedavisi ile istenilen miktar ve süre ayarı yapmak ve kas hacmi azalmasını objektif (kantitatif) verilerle tespit etmek amaçlandı. Her ne kadar kliniklerde yoğun kullanılan bir tedavi modalitesi olsa da, literatürde artan ve

tekrarlayan dozlarda BTx-A uygulanmasının kas hacmi üzerine etkisini volumetrik olarak gösteren bir çalışma bulunamadı. Çalışmamızda sıçan gastroknemius kası üzerine yapılacak, artan ve tekrarlayan dozlardaki BTx-A enjeksiyonu uygulamasının, volumetrik MR yardımı ile kas hacmi üzerindeki etkisi incelendi.

Günümüzde giderek hızla yaygınlaşan minimal invaziv tedavi yöntemlerinden biri olan ve hekimlerce uygulanması gereken BTx-A tedavisinin, yetkisiz kişilerce yerli yersiz kullanımları, ampirik doz ayarlamaları ve rastgele tekrarlama aralıkları nedeniyle ciddi bir kontrolsüzlük mevcuttur. BTx-A uygulamalarını azaltmak hem de kalıcı kas hacim azalmasını tespit edebilmek amacıyla bu deneysel çalışma tasarlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botulinum Toksin

2.1.1. Tarihçesi

1817’de Justinus Kerner botulinum toksin zehirlenmesini tanımlamıştır [7].

Prof. Dr. Van Ermengen ise bu toksinin kaslarda felç yaparak ölüme yol açtığını bildirmiştir [8]. Toksin ilk başta “Bacillus botulinus” adını, daha sonra “Clostridium botulinum” adını almıştır. Klasik botulizme özellikle geleneksel konserve yiyeceklerdeki uygun ortamda toksin üreten *Clostridium botulinum* neden olmaktadır. Botulizmde gıdaların yenmesinden 12-36 saat sonra başlayan çift görme, pitozis, midriazis, ağız kuruluğu, yutma güçlüğü ve ses kısıklığı şikayetleri görülür. Botulizm solunum yetmezliği ile ölüme neden olabilir.

1920’de Dr. Herman Sommer Botulinum A toksinini izole etmiştir [9].

1949’da Burgen botulinum toksininin etki mekanizmasını tanımlamıştır [8].

BTx-A’nın kozmetik kullanımı ise ilk olarak Jean Carruthers ve Alastair Carruthers tarafından rapor edilmiştir [10, 11]. BTx-A’nın hikayesini anlattıkları bir söyleşide Dr. Carruthers araştırmalarıyla ilgili ilk bulgularını 1992 yılında American Society for Dermatological Surgery dergide yayınladıklarını ancak bekledikleri tepkiyi göremediklerinden ve hatta bazı meslektaşlarının bu çalışmaları için “hiçbir yere varmayacak çılgın bir fikir” olarak değerlendirdiklerinden bahsetmiştir. Bugün milyarlarca dolarlık bir pazara sahip olan BTx-A’nın kullanımı ile ilgili patent almadıkları için de ayrıca pişman olduklarından bahsetmiştir[12] .

Aslında BTx-A’yı oftalmoloji alanında ilk kullanan ve markalaştırarak üretimine başlayan kişi Dr. Carruthers’in kısa bir süre yanında çalıştığı Smith-Kettlewell Eye Research Institute’den Dr. Alan B. Scott’dır. Dr. Scott 1970’lerin başında özellikle şaşılık konusunda BTx-A denemeleri yapmış ve

BTx-A'yı Oculinum® adıyla diğer doktorlara vermeye başlamıştır. 1978 yılında kurduğu şirket aynı isimle devam etmiş ve 1989 yılında BTx-A hemifasyal spazm, strabismus ve bleferospazm tedavisi için Food and Drug Administration (FDA) onayı almıştır [13, 14].

Dr. Scott kurduğu Oculinum firmasını 1989 yılında toplam 9 milyon dolara Allergan firmasına satmıştır. Ardından Allergan BTx-A için Botox® markasını tescil ettirmiştir ve hala aynı isim altında üretimini yapmaktadır. 2013 yılı verilerine göre Allergan'ın Botox®'tan elde ettiği gelir yaklaşık 2 milyar dolar seviyelerindedir [14].

2002'de FDA botulinum toksin uygulamalarını glabellar kırışıklıklar için onaylamıştır [15].

Günümüzde oftalmatoloji ve kozmetik cerrahideki kullanımının yanı sıra miyofasiyal ağrı sendromu, spazmodik disfoni, oromandibular distoni, kranioservikal distoni, Frey sendromu, Hirschsprung hastalığı, tortikollis, hidradenitis suppuritiva, hiperhidrosis ve migrende de etkin olarak kullanılmaktadır [16-24].

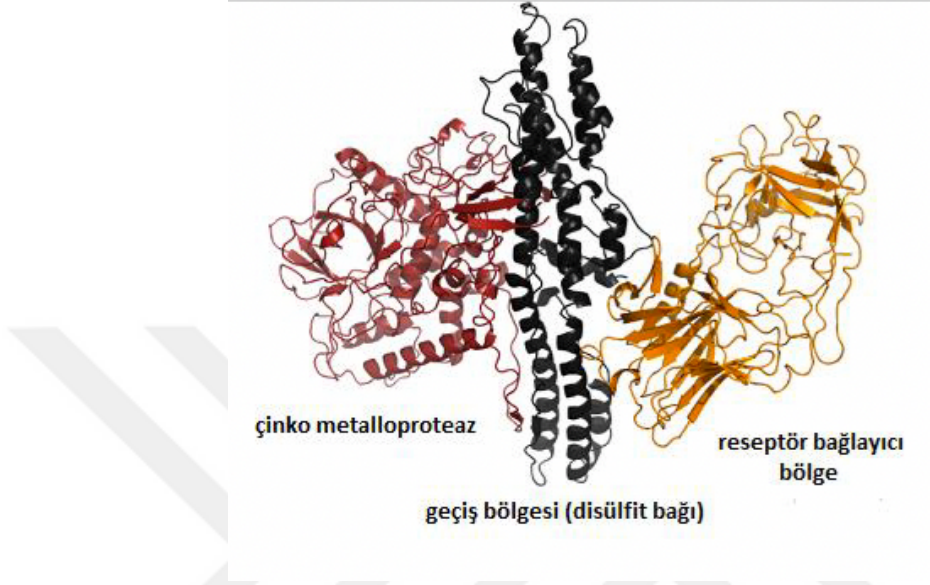
2.1.2. Yapısal Özellikleri

Clostridium ailesinin iki ana üyesi olan *Clostridium botulinum* ve *Clostridium tetani*'nin temel yapı ve fonksiyonel özellikleri benzerdir. *Clostridium botulinum* periferik sinir sistemine etki gösterirken *Clostridium tetani* ise merkezi sinir sistemi üzerinde etkilidir. Botulinum toksini, gram (+), sporlu, anaerob özelliklere sahip olan *Clostridium botulinum*'un ekzotoksini [25].

Botulinum toksininin A, B, C1, C2, D, E, F ve G olmak üzere sekiz farklı serotipi tanımlanmıştır. Bunlardan BTx-A tıbbi uygulamalarda en sık kullanılan serotiptir [26, 27]. Farklı serotipleri olmasına rağmen tüm serotiplerin etki mekanizması aynıdır. Periferik sinir sisteminde nöromusküler bileşkenin presinaptik aralığından asetilkolin (ACh) serbestlenmesini bloke ederek gevşek paralizi oluştururlar [25].

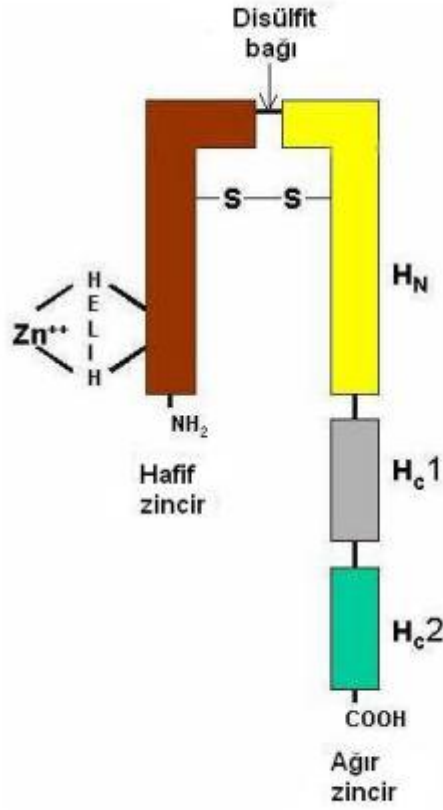
Toksinin toplam ağırlığı 150 kD olup 50 kD hafif ve 100 kD ağır zincirden

oluşur. Isıya duyarlı disülfid köprüleri ile birbirine bağlanmış, çinko bağlayıcı metalloendoproteaz içerir [28]. Bu proteaz ile toksin aktif formuna dönüştürülür (Şekil 1).



Şekil 1: Botulinum Toksininin Kimyasal Yapısı

Ağır zincirde C (karbon) ve N (azot) terminalleri bulunmaktadır. C terminali kolinerjik sistem terminaline affiniteden ve presinaptik reseptörlerin aracılık ettiği nörona bağlanmadan sorumludur. N terminali ise toksinin hücre içinde yer değiştirmesini ve hafif zincirin endozomal membrana geçişini sağlar. Hafif zincir ise intrasellüler etkili nörotoksin parçasını oluşturmaktadır. (Şekil 2). Bu parça endozom membranı ile presinaptik membranın birleşmesinden sorumlu SNARE proteinlerine bağlanır [29].



Şekil 2: Botulinum Toksininin Moleküler Yapısı

2.1.3. Etki Mekanizmaları

Normal fizyolojide, hücre sitoplazmasında yer alan bu proteinlerin bir bölümü endozom membranına, bir bölümü de bunlara karşılık olarak presinaptik hücre membranına yerleşir. Kalsiyum kanalı aracılığı ile hücre içerisine kalsiyum girişi ve sintagmin proteinin katkısıyla membranların füzyonu gerçekleşir. Böylece ACh sinaptik aralığa boşalır. Endozom, klatrin gibi kılıf proteinlerinin membranı çevreleyip çukurcuk oluşturarak ve tomurcuklanarak vezikül oluşturması ile meydana gelir. ACh içeren sinaptik veziküller endozomdan tomurcuklanarak oluşur ve ACh havuzuna katılır. Bu veziküller daha sonra ACh'nin sinaptik aralığa boşalması için birleşim ve füzyon aşamalarından geçer [30, 31].

Botulinum toksininin yol açtığı paralizi 3 adımda gerçekleşir:

1. Bağlanma: Presinaptik kolinerjik reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanır. Bu aşamada ağır zincirin C terminali görev alır.

2. Hücre içine giriş: Nörotoksin reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine girdikten sonra ağır ve hafif zinciri bağlayan disülfid bağları kırılır. Daha sonra ağır zincirin N terminali toksinin hücre içinde yer değiştirmesini ve hafif zincirin endozomal membrana geçişini sağlar.

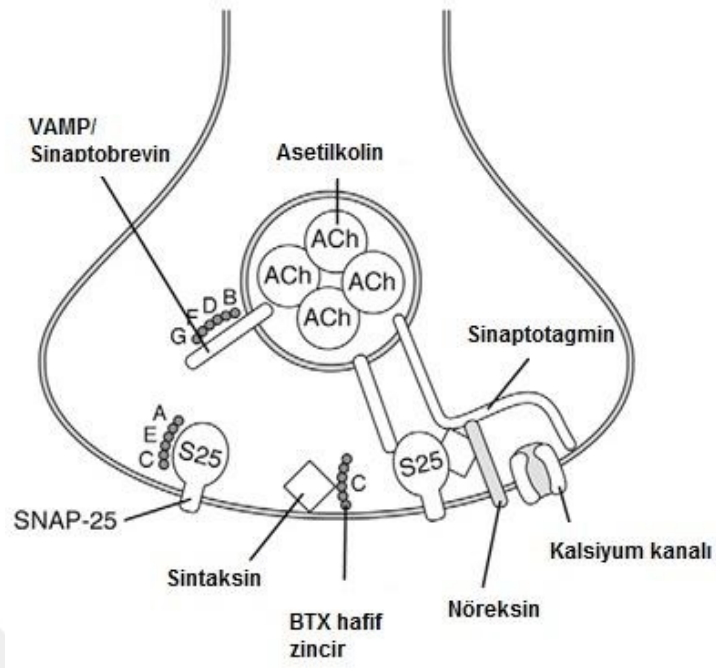
3. Nörotransmitter salınımının inhibisyonu: ACh taşıyan veziküllerin hücre zarı ile birleşerek, içerdiği ACh'yi nöromusküler kavşağa veya ekrin bezlerin otonomik boşluklarına bırakması için hücre içinde aktif SNARE kompleksinin bulunması gereklidir. BTx-A'nın hafif zinciri, intrasellüler etkili nörotoksin parçasını oluşturmaktadır. Bu parça endozom membranı ile presinaptik membranın birleşmesinden sorumlu SNARE proteinlerine bağlanır [29]. Daha sonra çinko bağımlı endopeptidaz aktivitesi ile birkaçını parçalayarak, kalsiyum kanalı aracılığı ile olan membran füzyonunu önler ve böylece ACh salınımı engellenmiş olur [32].

SNARE protein kompleksi üç temel yapıdan meydana gelmektedir. Bunlar; sinaptobrevin (VAMP= Vesicle-associated membrane protein), SNAP-25 (25kD sinaptozom ilişkili protein) ve sintaksin'dir. Botulinum toksinin her bir serotipi farklı proteini ayırır [33] (Şekil 3).

Serotip A, C ve E: nörotransmitter taşıyan veziküllerin presinaptik membrana bağlanmasını sağlayan SNAP-25'i,

Serotip B, D, F ve G: Sinaptobrevin olarak da bilinen VAMP'nin yapısını bozarak etkisini gösterir.

Serotip C: SNAP-25'e ek olarak hedef bir membran proteini olan Sintaksin üzerinden de etkili olur (Tablo 1).



Şekil 3: Botulinum Toksininin Serotipleri

Serotip	Hedef SNARE Proteinini
Serotip A	SNAP-25
Serotip B	VAMP
Serotip C	Sintaksin/SNAP-25
Serotip D	VAMP
Serotip E	SNAP-25
Serotip F	VAMP
Serotip G	VAMP

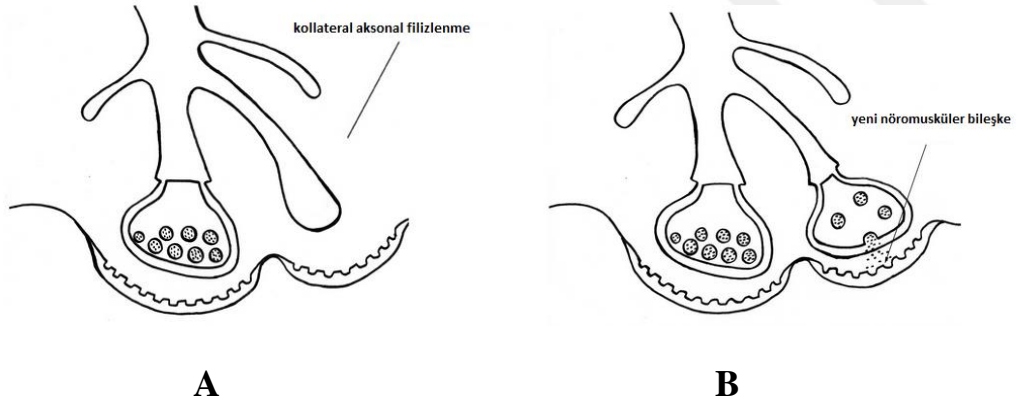
Tablo 1: Botulinum Toksininin Serotipleri ve Etkileşimi Olan SNARE Proteinleri

Lokal olarak yapılan küçük miktarda BTx-A, enjeksiyon yerinde kolinerjik motor sinir uçları tarafından tutulur ve nöromusküler aşırım bloğuna neden olur. Böylece toksin sistemik etki yapmadan lokalize paralizi yapar. Yeni motor sinir dallarının gelişmesi sonucu toksinin etkileri ortadan kalkar [34].

Asetilkolin salınımını SNARE reseptör kompleksinin farklı elemanlarını bloke ederek engeller. Bu olay 2 aşamada gerçekleşir:

1. Başlangıçta nonkollateral aksonal filizlenme oluşur. Bu sinir terminalleri motor son plak bölgesinin ekspansiyonuna yol açıp yeni bir nöromusküler bileşkenin inşa edilmesini sağlar. Bu yeni kollateral aksonlar 28 günde iyileşir ve bütün nöronal iletim, yeni filizlenen aksonlar aracılığı ile olur (Şekil 4).

2. Orjinal ana terminaller nöronal geçişi yeniden kazanır. Yeni oluşan aksonal filizlenmelerin sinaptik fonksiyonlarının kaybı ve eliminasyonları gözlenir. Bu yaklaşık 91 gün sonra tamamlanır, bu da BTx-A aktivitesinin klinik kaybı ile bağlantılıdır [35].



A: Aksonal filizlenme

B: Sinir terminallerinin yeni fonksiyonel nöromusküler bileşkeyi oluşturması

Şekil 4: Botulinum Toksin Aktivitesinin Sonlanma Aşamaları

2.1.4. Preparatları ve Farmakolojik Özellikleri

Tedavide kullanılan BTx-A, *Clostridium botulinum*'un çok miktarda toksin üreten suşlarından kültür yapılarak elde edilir. Elde edilen toksin ayrılır, çökeltilir, saflaştırılır ve amonyum sülfatla kristalize edilir. Saflaştırılmış toz halindeki nörotoksin kompleksi 100 Ünite (100 U) BTx-A içeren flakonlar halinde ambalajlanmıştır.

En sık kullanılan BTx-A preparatlarından Botox® -5°C, Dysport® +2-8°C'de saklanmaktadır. Serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra her ikisi de +2-8°C'de aseptik şartlarda korunmalıdır.

Botox®, sulandırılırken çalkalanıp köpürdüğünde denatüre hale geçtiğinden, oldukça dikkatli ve nazikçe serum fizyolojik solüsyonu flakon iç duvarına doğru verilmelidir. Sulandırılmış bir flakon Botox® 100 U içerir ve bir kişiye uygulama için yeterli gelir.

Botox®, 1-10 ml serum fizyolojik ile seyreltilerek kullanılır. Buna göre 2 ml serum fizyolojik ile seyreltilen Botox®, 0,1 ml'de 5 U toksin içermektedir. +4°C'de saklanan sulandırılmış Botox® preparatlarının aktivitesi 1. günün sonunda %90-100, 3. gün %70-80, 7. gün %40-50, 14. günde minimal olarak bulunmuştur. Sulandırıldıktan sonra buzdolabında 24 saatten fazla tutulmaması ve dondurucuda hiç saklanmaması önerilmektedir [36].

BTx-A, enjeksiyon bölgesinin 3 cm kadar etrafına yayılabilir. Geniş alana yapılacak uygulamalarda örneğin hiperhidrozis tedavisinde 1 cm aralıklarla "elek düzeni" şeklinde uygulama yapılmalıdır. BTx-A'nın uygulandıktan sonra, çizgili kaslarda etkisinin başlaması 3-5 gün arasında olmaktadır. Çizgili kaslardaki maksimum etkisi ise yaklaşık 30. günde olur. Tek noktaya en fazla 50 U Botox® yapılabilir. Uygulamalar 3 aydan önce tekrarlanmamalıdır [37].

BTx-A'nın sıçanlardaki etkin dozu 4 U/kg, yüksek dozu ise 16 U/kg'dır [38].

Kemirgenlerde yapılan bir çalışmada BTx-A enjeksiyonu sonrası etkinin 24 saat içinde başladığı ve 4-8 hafta etkinin devam ettiği belirtilmiştir [39].

2.1.5. Kullanım Alanları

BTx-A son yıllarda çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Blefarospazm, spazmodik tortikollis, hemifasyal spazm, fokal distoniler, akalazya, spazmodik disfoni, anal fissür, parkinson tremoru, oddi sfinkter spazmı, sinkinezi, hiperhidrozis, migren tipi baş ağrısı, tetanoz tedavilerinin yanında; ortopedi, nöroloji, fizik tedavi ve rehabilitasyon bölümlerince erişkin ve çocuklarda üst motor nöron sendromuna bağlı gelişen spastisite tedavisinde (serebral palsi, stroke, spinal kord yaralanması, travmatik kafa yaralanması, multipl skleroz, nörodejeneratif hastalıklar) sıklıkla kullanılmaktadır. Nistagmus, bruksizm, kekemelik, spastik mesane, hiperaktif çiğneyici kaslar (özellikle masseter hipertrofisi), aşırı idrar kesesi aktivitesi, perioperatif ve postoperatif ağrı kontrolü, hipersalivasyon, mandibulanın öne alındığı ortognatik cerrahi operasyonlarda nüksü önlemek için elektromyografi (EMG) kontrollü geniohyoid kasın paralizisi, mandibular kondil fraktürlerinin kapalı redüksiyonla tedavisinde kullanılmaktadır [40-60]. Ayrıca son yıllarda çok yaygın olarak yüz kırışıklıkları, fasiyal asimetri tedavisinde de kullanılmaktadır [61-70].

BTx-A'nın vazospastik hastalıklarda kullanımı tesadüfen başlamıştır. 2003 yılında tanımlanamamış konnektif doku hastalığı olan bir hastaya palmar hiperhidrosis nedeni ile BTx-A enjeksiyonu yapılmış ve hastanın Raynaud fenomenine bağlı ağrılarında azalma, parmak ucundaki ülserde iyileşme olduğu görülmüştür [71, 72].

2007'de Van Beek, Raynaud fenomeni mevcut hastalarında yaptığı çalışma sonucu BTx-A'nın düz kas hücrelerinde nöromusküler blokaj yaparak vazodilatasyona neden olduğunu savunmuştur [73].

2001'de Morris, BTx-A'nın nöromusküler kavşakta norepinefrin veziküllerinin salınımını bloke ederek domuz uterus arterinin düz kas hücrelerinde sempatik vazokonstriksiyonu engellediğini ve kimyasal sempatektomi yaptığını göstermiştir [74].

BTx-A'nın son yıllarda popüler bir kullanım alanı da migren tipi baş ağrısıdır [75, 76]. Guyuron tarafından ilk defa ayrıntılı tariflenen bu etkisi, ilk önce diğer medikal tedavilere yetersiz cevap veren hastalarda kullanılmıştır. Ancak geçici olan bu etkisi nedeniyle, daha etkili olan ve yine Guyuron tarafından da çalışılmış olan

migren cerrahisinde, tetik noktaların belirlenmesinde ve uygun hasta seçiminde daha etkili olabileceği belirtilmiştir [77-79].

FOKAL KAS DİSTONİLERİ

- Blefarospazm (göz kapağı apraksisi)
- Oromandibular- fasiyal- lingual distoniler
- Servikal distoniler (tortikolis)
- Laryngeal distoniler (spazmodik disfoni)
- Mesleki distoniler – kramplar
- İdiopatik ve sekonder diğer distoniler

İSTEMSİZ HAREKETLER

- Ses, baş ve ekstremitte tremorları
- Hemifasiyal spazm
- Palatal myoklonus /kronik kas spazmı
- Tikler

UYGUNSUZ KONTRAKSİYONLAR

- Strabismus
- Nistagmus
- Bruksizm
- Ağrılı rijidite
- Myokymia- adele seçirmesi
- Kekemelik
- Migren
- Kas kontraksiyonuna bağlı baş ağrısı
- Lumbosakral yorgunluk ve sırt krampları
- Spastisite
- Spastik idrar kesesi
- Özefagal akalazi –özefagus genişlemesi
- Pelvirektal spazm (anismus, vaginismus)
- Diğer spastik hastalıklar

DİĞER KULLANIM ALANLARI

- Kozmetik (kırıksıklıklar ve fasiyal asimetri için)
- Hiperhidroz –Aşırı terleme
- Hipertrofik – hiperaktif çiğneyici kaslar (özellikle masster hipertrofisi)
- İdrar tutamama – aşırı idrar kesesi aktivitesi
- Myofasiyal ağrıda triger noktalara
- Perioperatif ve post operatif ağrı kontrolü
- Tükürük bezleri ile ilgili malfonksiyonlar (hipersalivasyon, Frey sendromu)
- Mandibulanın öne alındığı ortognatik cerrahi operasyonlarda relapsı önlemek için EMG kontrollü geniohyoid kasın paralizisi

Tablo 3: Botulinum Toksininin Kullanım Alanları

2.1.6. Deneysel ve Klinik Çalışmalardaki Kullanımı

2005’de O’Reilly, aksiller hidradenit tedavisinde BTx-A kullanımı sonrasında lezyonların gerilediğini ve takiplerde tekrarlama olmadığını belirtmiştir [17].

2006’da Çelik, sıçan pektoral kas flebinde yaptıkları çalışmada cerrahi denervasyon ve BTx-A ile yapılan kimyasal denervasyonun kas stabilizasyonu üzerine olan etkilerini araştırmış sonuçta iki yöntemin de kas stabilizasyonu sağladığını, denervasyon yapılan grupta daha fazla olmak üzere kaslarda atrofi görüldüğünü belirtmiştir [80].

2008’de Yıldırım, BTx-A ile random paternli sıçan deri flebine delay işlemi yapmış ve flep yaşayabilirliğinin arttığını göstermiştir ve BTx-A’nın klinikte kullanılabileceğini savunmuştur. Fakat bu etkisinin patofizyolojisinin ve mekanizmasının daha fazla çalışmalarla araştırılması gerektiğini vurgulamıştır [81].

2009’da Kim, random paternli deri fleplerinde BTx-A’nın sempatik nöronları baskılamasına bağlı vazodilatasyon yaptığını, böylece flep kan akımını ve yaşayabilirliğini arttırabileceğini savunmuştur [82].

2009’da Arnold, sıçan deri fleplerinde BTx-A uygulamasının flep sağ kalımını arttırdığını belirtmiştir. Ayrıca perivasküler uygulanan 5 U BTx-A sonrası 1.,14. ve 28. günlerde damar çaplarını ölçmüş ve tüm ölçümlerde arter ile ven çaplarının anlamlı şekilde arttığını, bu artışın 14. günde maksimum seviyede olduğunu bildirmiştir [83, 84].

2009’da Clemens, BTx-A’nın sıçan femoral damar çaplarına ve anastomozların başarısına etkisini araştırmıştır. Bu amaçla cerrahiden 5 gün önce perivasküler 10 U BTx-A uygulanan sıçanlarda, vazospazm ve trombozun azaldığını, ven ve arterlerde dilatasyon olduğunu, anastomozun daha kolay ve kısa sürede yapıldığını göstermiştir [85].

2009’da Chenwang, kas-deri flebi genişletilmesinde BTx-A uygulamasını araştırmış ve flepte direnci azalttığını, genişleyen alanı arttırdığını ve flebin kontraksiyonunu azalttığını bulmuştur [86].

2009'da De Aguiar'ın yaptığı çalışmada BTx-A, fleksör tendon onarımı yapılmış hastaların kas origolarına uygulanmış ve tendon rüptürü oranlarının azaldığı bildirilmiştir [87].

Subpektoral implant yerleştirilmesini takiben pektoral kas spazmını önlemek için BTx-A uygulanmış ve hastaların ameliyat sonrası dönemi ağrısız geçirmesi, kozmetik sonucun daha iyi olması, geri dönüşümlü bir denervasyona sebep olmasından dolayı bu yöntemin nörektomiye tercih edilebileceği ifade edilmiştir [88, 89]. Ayrıca BTx-A, pektoral adaledeki kasılmaların protez üzerine yaptığı çekintilerin önlenmesi amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır [90].

2.1.7. Yan Etkileri

Enjeksiyon sonrası enjeksiyon bölgesinde ağrı, ödem, ekimoz, kanama, enfeksiyon olabilir. Halsizlik, yorgunluk, baş ağrısı, grip benzeri semptomlar da bildirilmiştir. Kuru ağız hissi, deride kuruma, pullanma, geçici hiperestezi görülebilir. Yüz bölgesine yapılan uygulamalar sonucunda hayatı tehdit eden allerjik reaksiyonlar bildirilmemiştir. Nadiren erken dönemde enjeksiyon yapılan kaslarda güçsüzlük, blefarospazm ve hemifasiyal spazm tedavisi sonrasında ptozis, vertikal kayma, diplopi, epifora, kuru göz, lagoftalmi, nadiren entropiyon, ektropiyon, keratit, korneal perforasyon bildirilmiştir.

Frontal bölgeye enjeksiyon sonrası kaş ptozisi, kaş asimetrisi ve kaşa kontur bozuklukları görülebilir. Spazmodik tortikollis tedavisinde disfaji, lokal zayıflık ve semptomatik genel zayıflık bildirilmiştir. BTx-A, hedef dokudan atıldığında ya da yanlışlıkla kan damarına enjekte edildiğinde sistemik yan etkiler oluşabilir [91].

Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında immunolojik ve karsinojenik yan etkiler tespit edilmemiştir [92]. BTx-A'nın çocuklarda güvenilirlik ve etkinliği kanıtlanamadığından gebelik ve emzirme dönemlerinde kullanımı önerilmemektedir. Botulinum toksinlerin teratojenitesi hakkında kesin bir bilgi yoktur. Ancak C kategorisinde yer alan bir ajan olarak kabul edilmektedir [93].

BTx-A'nın toksik dozları, toksine hangi yöntem ile maruz kalındığına bağlı olarak değişir. 3500 U insan zehirlenmesine yol açarken 30000 U ağır zehirlenmeye

neden olur. Yapılan çalışmalarda insan LD50'sinin 30-40 U/kg olduğu gösterilmiştir [94].

2.2. Benign Masseter Kas Hipertrofisi

Benign masseter kas hipertrofisi (BMH) masseter kasının bilateral olarak ağrısız şişliği ile karakterizedir. İlk olarak 1880 yılında Legg tarafından tanımlanan BMH'nin etiyolojisinde başlıca organik ve nonorganik etkenler tanımlanmıştır.

1990'ların ortasında BTx-A, lateral kantal çizgilenmeler bölgesinde, orbikularis okuli enjeksiyonlarında, masseter kas ve temporomandibular eklem (TME) bozukluklarının tedavisinde kullanılmıştır. Masseter hipertrofisi tedavisinde BTx-A kullanımı ile iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir [95].

Organik etkenler arasında diş kaybına bağlı tek taraflı çiğneme, konjenital arteriovenöz fistül, TME disfonksiyonu ve lokal distoniler gösterilirken, nonorganik etkenler arasında devamlı sakız çiğneme, gece veya gündüz diş gıcırdatma, strese bağlı parafonksiyonel çene hareketleri sayılmaktadır. Olguların büyük çoğunluğunda özellikle geceleri diş gıcırdatma bulunduğunu gözleyen Gurney, bu alışkanlığın kasta aşırı kullanıma bağlı hipertrofi oluşturduğunu öne sürmüştür [96].

Masseter hipertrofisi konjenital olarak görülebilse de sıklıkla kazanılmış olarak görülür. Kazanılmış masseter hipertrofisi genellikle yaşamın 2-3-4. dekadında daha sık olmakla birlikte her yaşta görülebilir. Masseter hipertofisinde hipertrofik bölge angulusta konumlandığı için yüzün rektangüler şekli artar ve teşhisi kolaydır. Ancak klinik olarak teşhis edilemediği durumlarda BT ve MR tanıya yardımcıdır [95].

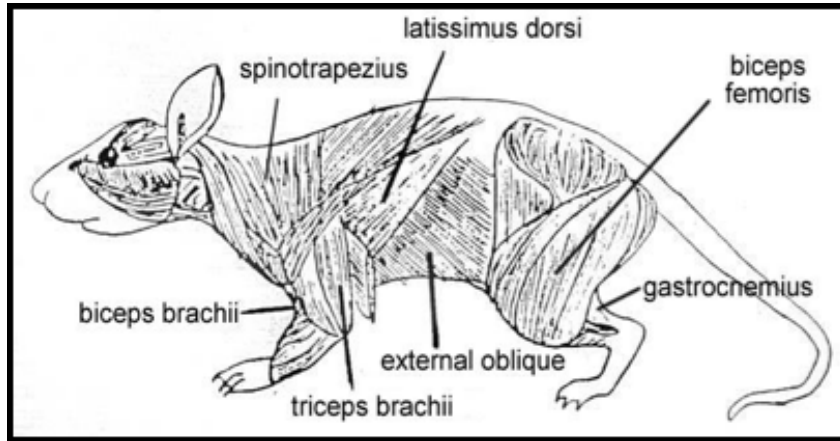
Hastaların temel şikayeti, hipertrofiye bağlı ortaya çıkan “kare yüz görüntüsü” gibi kozmetik şikayetlerdir.

Konservatif tedavisinde; kas gevşeticiler ve splint uygulamaları kullanılmaktadır. Cerrahi tedavisinde parsiyel kas eksizyonu, tuberositik masseter bölgesinin osteotomisi uygulanmaktadır. Cerrahi tedavide fasial sinir zedelenmesi, postoperatif hemoraji, ödem, enfeksiyon, hematoma, skar oluşumu gibi dezavantajlar göz önüne alındığında günümüzde BTx-A enjeksiyonu gibi daha az invaziv yöntem olan yaklaşımlar yaygın olarak kullanılmaktadır [95, 97].

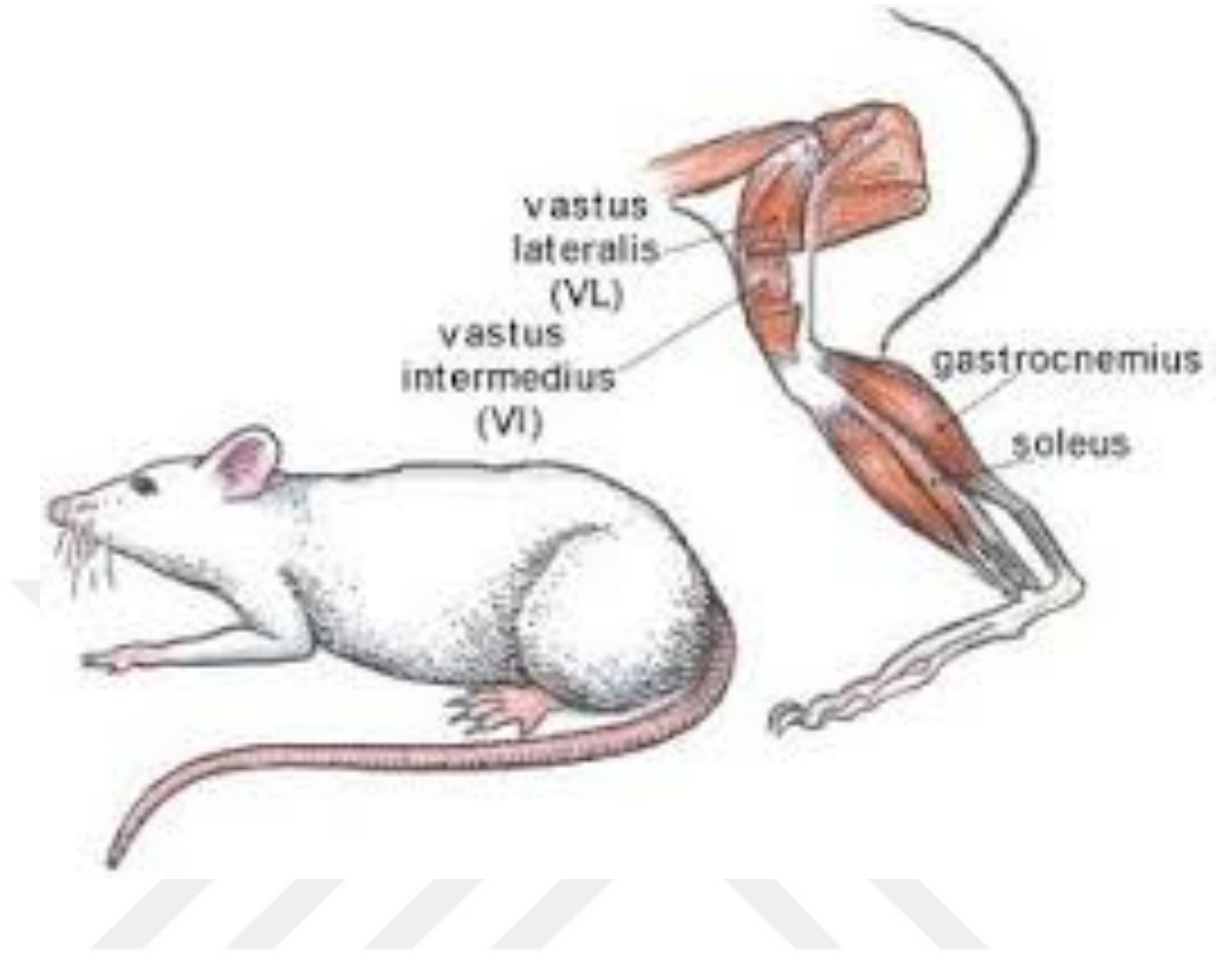
2.3. Sıçan Gastroknemius Kas Anatomisi

Sıçanların alt ekstremité kasları arasında BTx-A çalışmaları en çok tercih edilen kas gastroknemius kasıdır [1, 3-5].

Gastroknemius bacağın arka tarafında yer alan kalın bir kastır. Caput laterale ve caput mediale olmak üzere iki başı vardır. Femurun alt ucunun arka iki yanından başlar. İki başın kirişi tibia'nın ortası düzeyinde birbiriyle birleşerek tek bir tendon oluşturur. Bu tendon m. soleus'un kirişi ile birlikte tendo calcaneus communis'i şekillendirir ve tuber calcanei'ye yapışarak sonlanır. Tendo calcaneus communis'in oluşumuna m. biceps femoris'in, m. semitendinosus ve m. flexor digitorum superficialis'in aponörotik uzantıları da katılır (Şekil 5-6). Çalışmalarda sıçan gastroknemius kasına yapılacak enjeksiyonlar perkütan yolla girilip intramusküler uygulanabileceği gibi bizim çalışmamızda kas hacmi ölçümleri gastroknemius kasında yapıldığı için; gastroknemius kasının soleus kasına anatomik yakınlığı nedeniyle yapılan BTx-A dozlarının lokalizasyonunun standartizasyonunu olabildiğince sağlamak amacıyla tüm sıçanlarda sağ alt ekstremité posteriorundan yapılan insizyonu takiben diseksiyonla gastroknemius kasına ulaşılmış ve enjeksiyon sadece gastroknemius içerisine yapılmıştır (Şekil 7, Şekil 17).



Şekil 5: Sıçanda Gastroknemius Kasının Lateralinden Görüntüsü



Şekil 6: Sıçanda Gastrocnemius Kası



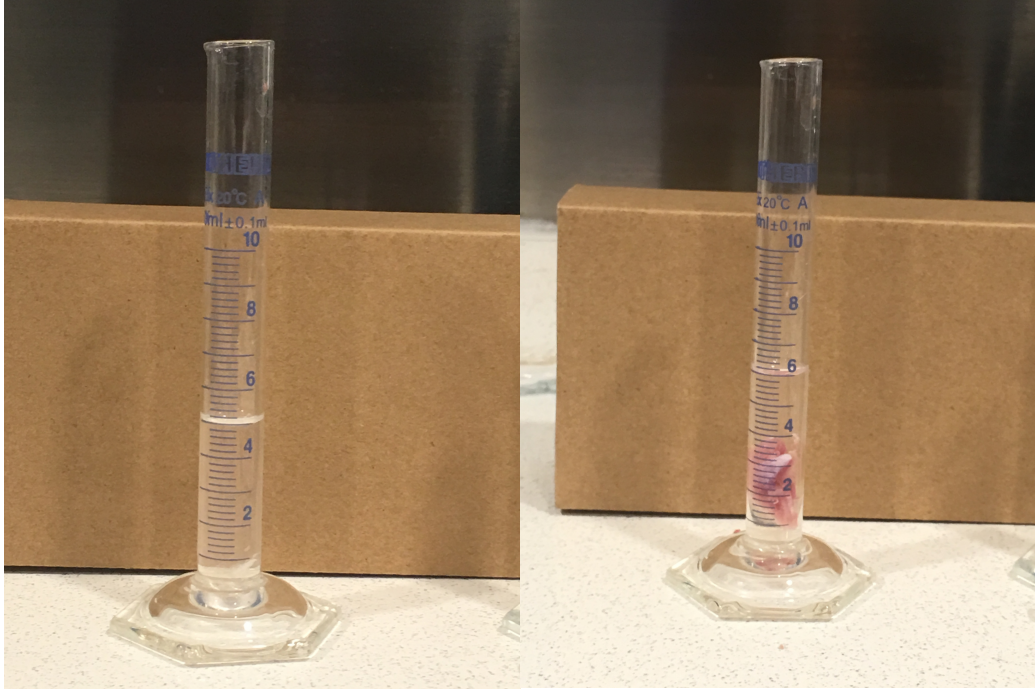
Şekil 7: Sıçanda Gastrocnemius Kasına İntramuskuler Enjeksiyon

3. GEREÇ VE YÖNTEM

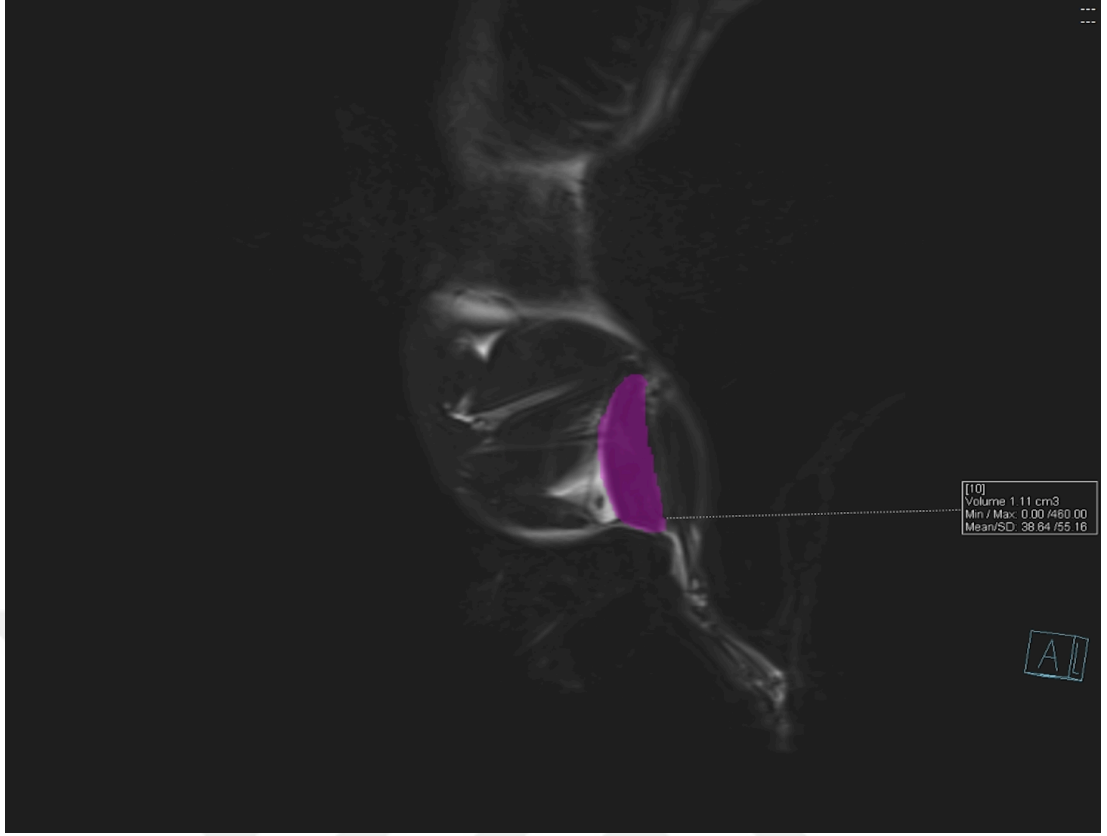
3.1. Deney Öncesi Hazırlıklar

3.1.1. Pilot Çalışma

Volumetrik MR ile ölçülen kas hacmini doğrulamak amacıyla taze sıçan kadavrasından alınan gastroknemius kası su taşıma yöntemi ile ölçülerek kas hacimlerinin karşılaştırıldığı bir pilot çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda su taşıma yöntemi ve volumetrik MR kıyaslandığında kas hacimlerinin benzer olduğu görülmüştür (1100 milimetreküp) (Şekil 8-9).



Şekil 8: Taze Sıçan Kadavrasında Gastroknemius Kas Hacminin Su Taşıma Yöntemi ile Hesaplanması



Şekil 9: Taze Sıçan Kadavrasında Gastrocnemius Kas Hacminin Volumetrik MR ile Hesaplanması

3.1.2. Deney Hazırlıkları

Çalışmaya T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 23.11.2017 tarih 2017/252 sayılı izin ile onay verilmiştir.

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 12.2017/6) desteği alınarak Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi Deneysel Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ağırlıkları 300-350 gr arasındaki 48 adet erkek Sprague Dawley sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saatlik aydınlık ve karanlık periyotları olan, hava akımı açısından uygun şartlarda ve uygun kafeslerde standart sıçan yemi ve su ile beslenerek barındırılmıştır. Altılı gruplar halinde uzman veterinerler kontrolünde izlenmiştir (Şekil 10).

Anestezi için Ketamin hidroklorür (50mg/kg ip) ve xylazine hidroklorür (5mg/kg ip) kullanılmıştır (Şekil 11).



Şekil 10: Çalışma Grupları ve Barındırma Koşulları



Şekil 11: Çalışmada Kullanılan Anestezikler

3.1.3. Botulinum Toksin Tip A'nın Hazırlanması

BOTOX 100 U (Allergan,USA) flakon 5ml serum fizyolojik ile sulandırılmıştır ve 0,1ml'de 2 U olan BTx-A hazırlanmıştır (Şekil 12). Çalışmamızda BTx-A enjeksiyonu için 26 gauge enjektör kullanılmıştır.



Şekil 12: Botulinum Toksin Tip-A

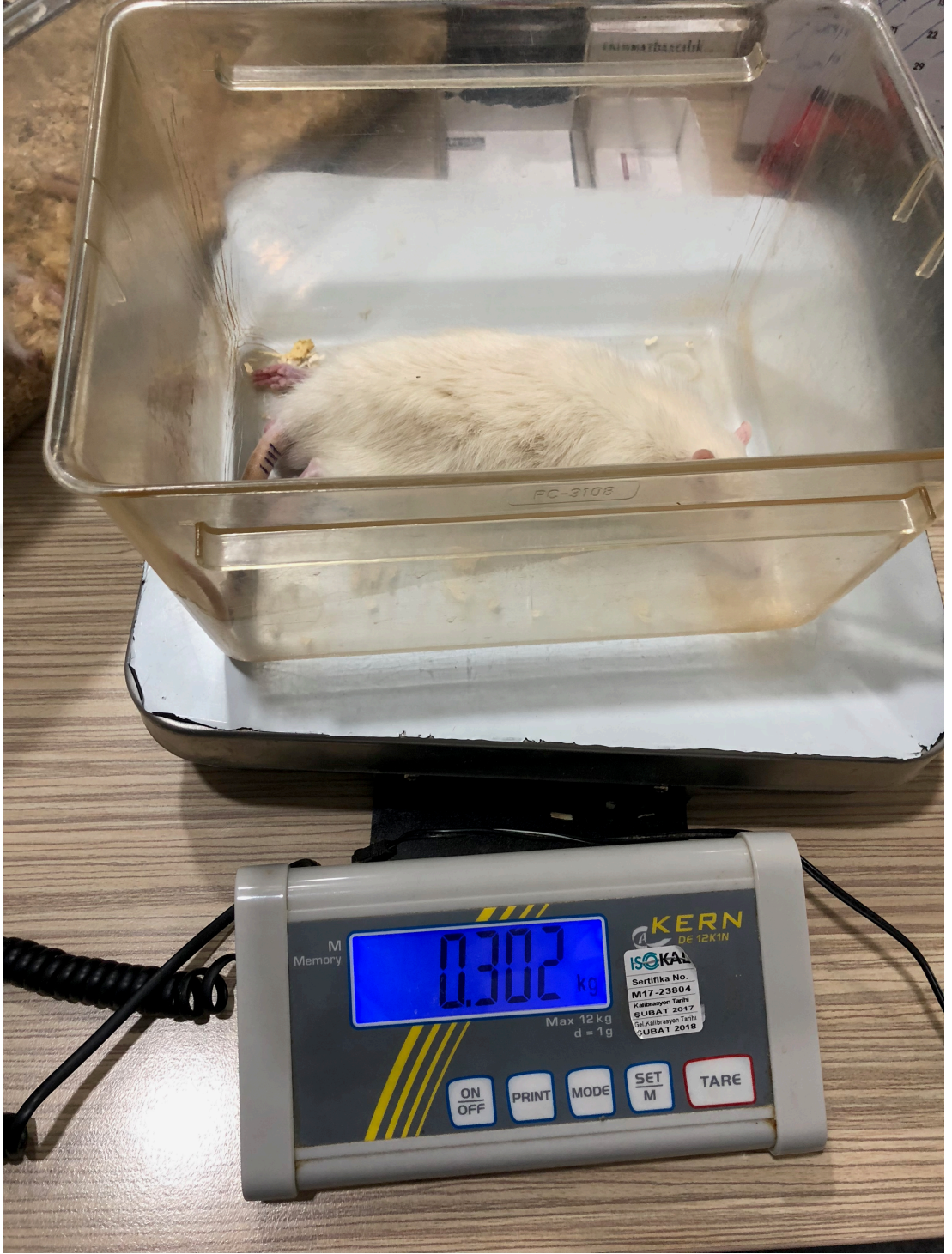
3.2. Çalışma Grupları

Tüm sıçanlarda operasyondan sağ alt ekstremité elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solüsyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik vertikal insizyonu takiben diseksiyon ile gastroknemius kasına ulaşıldı 1. ve 5. gruplarda serum fizyolojik (SF) diğer gruplarda farklı dozlarda BTx-A enjeksiyonu kas içine uygulandı. 3-0 emilebilen monofilaman suture ile sutureasyon sonrası povidon iyot solüsyonu ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı (Şekil 13-14-15-16-17-18).

Kas volüm değerlendirmesi sıçanlarda BTx-A uygulamasından önce 0. günde (uygulamadan önce) BTx-A etkinliğinin maksimum olduğu 36. günde BTx-A etkisinin sonlandığı 60. günde tekrar doz yapılan gruplarda (5-6-7-8. gruplar) ikinci dozun etkinliğinin maksimum olduğu 96. günde ve ikinci doz etkisinin sonlandığı 120. günde volumetrik MR ile kas hacmi ölçülerek yapıldı [39, 98, 99] (Tablo2). 120. günde yapılan volumetrik değerlendirmenin ardından yüksek doz anestezik ile 120. gün sonunda tüm hayvanlar sakrifiye edildi.



Şekil 13: Deneyde Kullanılan Cerrahi Aletler



Şekil 14: Operasyon Öncesi Sıçanların Ağırlık Ölçümü



Şekil 15: Sıçanların Sağ Alt Ekstremitelerinin Tıraş Edilmesi



Şekil 16: Diseksiyon ve Gastroknemius Kasının Gösterilmesi



Şekil 17: Gastroknemius Kasına BTx-A Enjeksiyonu



Şekil 18: İnsizyonun Kapatılması ve Postoperatif Povidon İyot Uygulanması

Grup	İşlem
1 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün 0,1 cc SF enjeksiyonu
2 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün 3U/kg BTx-A enjeksiyonu
3 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün 6U/kg BTx-A enjeksiyonu
4 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün 12U/kg BTx-A enjeksiyonu
5 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün ve 60. gün 0,1 cc SF enjeksiyonu
6 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün ve 60. gün 3U/kg BTx-A enjeksiyonu
7 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün ve 60. gün 6U/kg BTx-A enjeksiyonu
8 n:6	Gastroknemius kasına 0. Gün ve 60. gün 12U/kg BTx-A enjeksiyonu

Tablo 2: Grupların Dağılım Şeması

Grup 1 (n:6)

İşlem öncesi (0. gün) volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 0,1 cc SF enjeksiyonu uygulandı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman sütür ile sütüre edildi. Sütürasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İşlemden sonra 36.-60.-96-120. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 2 (n:6)

İşlem öncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 3U/kg BTx-A enjeksiyonu uygulandı. Sütürasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman sütür ile sütüre edildi. İşlemden sonra 36.-60.-96-120. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 3 (n:6)

İşlem öncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 6U/kg BTx-A enjeksiyonu uygulandı. Sütürasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman sütür ile sütüre edildi. İşlemden sonra 36.-60.-96-120. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 4 (n:6)

İşlem öncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 12U/kg BTx-A enjeksiyonu uygulandı. Sütürasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman sütür ile sütüre edildi. İşlemden sonra 36.-60.-96-120. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 5 (n:6)

İşlem öncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 0,1 cc SF enjeksiyonu uygulandı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman suture ile suture edildi. Sutureasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İşlem sonrası 36. ve 60. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı. 60. günde 0,1 cc SF enjeksiyonu tekrar uygulandı. İşlemden sonra 36. ve 60. günlerde (ilk uygulamadan sonra 36.-60.-96.-120. günlerde) kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 6 (n:6)

İşlem öncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 3U/kg BTx-A enjeksiyonu uygulandı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman suture ile suture edildi. Sutureasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İşlem sonrası 36. ve 60. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı. 60. günde 3U/kg BTx-A enjeksiyonu tekrar uygulandı. İşlemden sonra 36. ve 60. günlerde (ilk uygulamadan sonra 36.-60.-96.-120. günlerde) kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 7 (n:6)

İşlem öncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremitte elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve

6U/kg BTx-A uygulandı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman sütür ile sütüre edildi. Sütürasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İşlem sonrası 36. ve 60. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı. 60. günde 6U/kg BTx-A enjeksiyonu tekrar uygulandı. İşlemden sonra 36. ve 60. günlerde (ilk uygulamadan sonra 36.-60.-96.-120. günlerde) kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

Grup 8 (n:6)

İşlem   ncesi volumetrik MR çekilerek sağ gastroknemius kas hacminin hesaplanmasını takiben aynı gün operasyondan önce sağ alt ekstremit   elektrikli tıraş makinesiyle tıraş edildi. Operasyon sahaları povidon iyot solusyonu ile cerrahi antisepsiye uygun hale getirildi. 3 cm'lik insizyonla gastroknemius kasına ulaşıldı ve 12U/kg BTx-A enjeksiyonu uygulandı. İnsizyon 3-0 emilebilen monofilaman sütür ile sütüre edildi. Sütürasyon sonrası povidon iyot ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. İşlem sonrası 36. ve 60. günlerde kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı. 60. günde 12U/kg BTx-A enjeksiyonu tekrar uygulandı. İşlemden sonra 36. ve 60. günlerde (ilk uygulamadan sonra 36.-60.-96.-120. günlerde) kontrol volumetrik MR çekilerek kas hacmi hesaplandı.

3.3. Radyolojik Değerlendirme

BTx-A uygulaması öncesinde 0. gün tüm hayvanların sağ gastroknemius kas hacmi volumetrik MR çekilerek değerlendirildi (Şekil 19). BTx-A etkinliğinin maksimum olduğu 36. günde, etkinin sona erdiği ve 5., 6., 7. ve 8. gruplara tekrar dozunun yapıldığı 60. günde ikinci doz yapıldıktan sonraki 36. günde (96. gün) ve ikinci doz yapıldıktan sonraki 60. günde (120. gün) tüm hayvanların sağ gastroknemius kas hacimleri volumetrik MR ile değerlendirildi.



Şekil 19: Sıçanlara Volumetrik MR Çekilmesi

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma olarak verildi. Bağımlı grup analizleri sayısal değişkenlerin farkları normal dağılım koşulunu sağladığından Tekrarlı Ölçüm Varyans Analizi ile yapıldı. Bağımsız iki grup karşılaştırmaları sayısal değişkenler normal dağılım koşulunu sağladığından Student t testi ile yapıldı. Bağımsız ikiden çok grupta, gruplarda sayısal değişkenler normal dağılım koşulunu sağladığından One Way ANOVA testi ile karşılaştırıldı. Alt grup analizleri homojenlik koşulu sağlandığından Tukey testi ile yapıldı. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 48 adet sıçanda gerçekleştirilen işlemler sırasında kayıp yaşanmadı. İlk 4 gruptaki sıçanlar 5 kez MR çekimi için 1 kez cerrahi işlem için olmak üzere toplam 6 kez, son 4 gruptaki sıçanlar ise 5 kez MR çekimi ve 2 kez cerrahi işlem için olmak üzere toplam 7 kez anestezi aldılar. Hiçbir sıçanda cerrahi işleme bağlı bir morbidite izlenmedi.

4.1. Radyolojik Bulgular

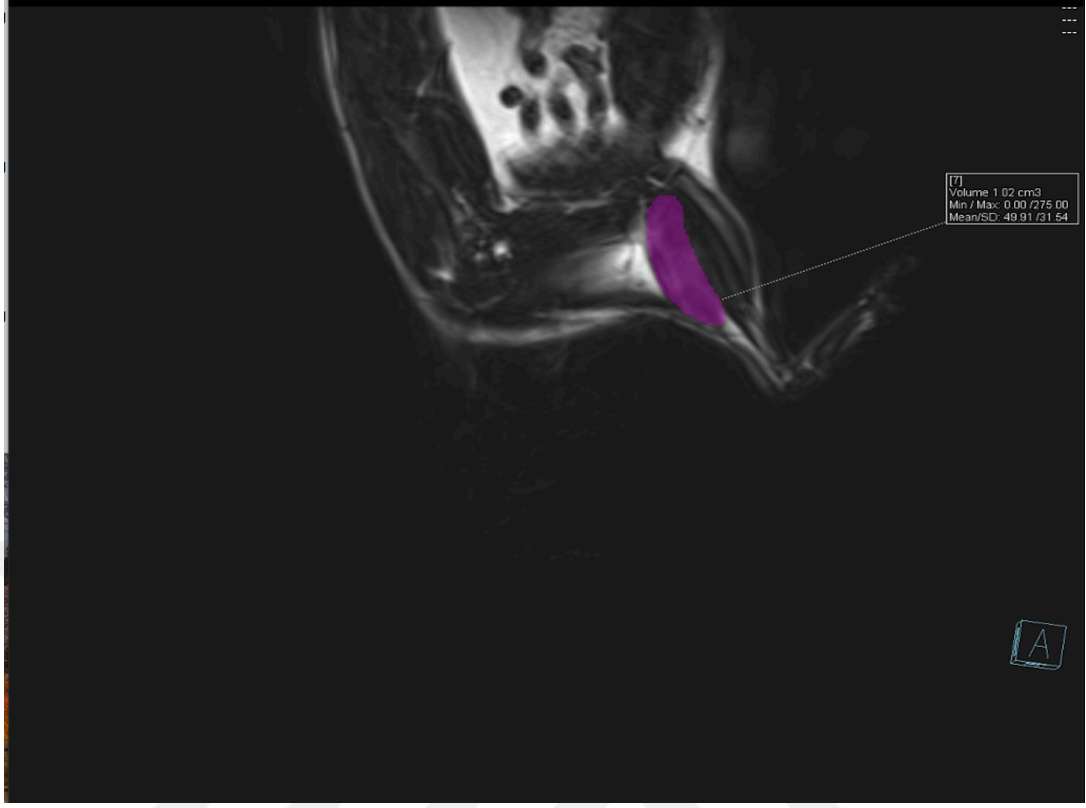
Yapılan MR ölçümleri Radyoloji Anabilim Dalı tarafından 3 boyutlu volumetrik olarak hesaplandı (Şekil 20-21-22-23-24). Hesaplanan ölçümler Microsoft Excel programına kaydedildi (Tablo 4-5-6-7-8-9-10-11).



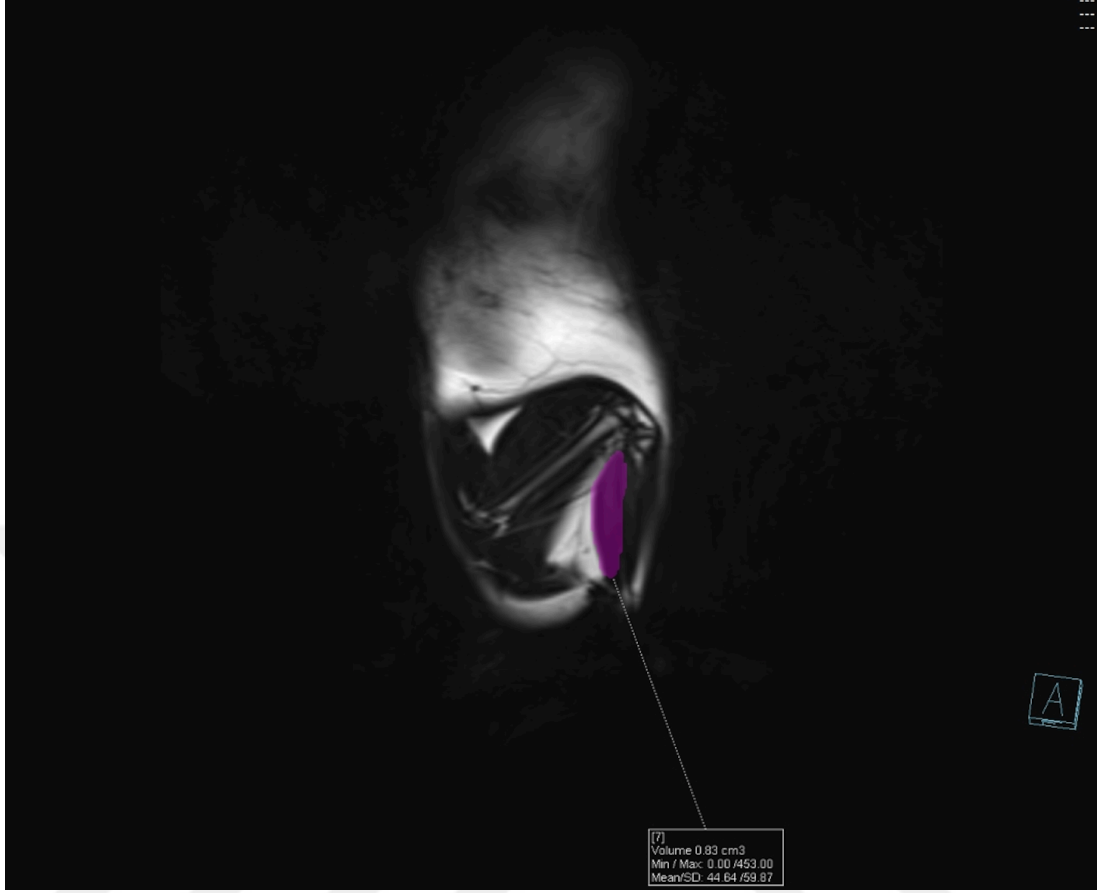
Şekil 20: 6. Grup 6. Sıçan 0. Gün Gastrocnemius Kas Hacmi Ölçümü



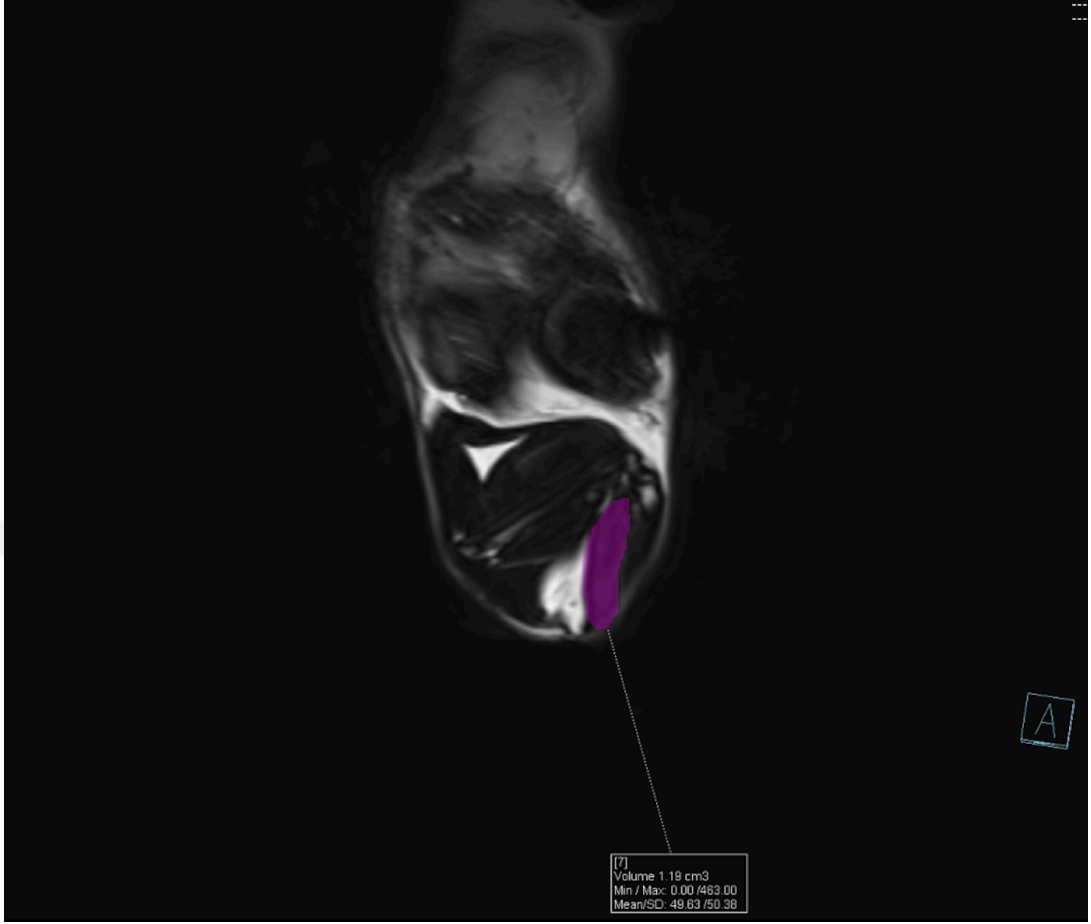
Şekil 21: 6. Grup 6. Sıçan 36. Gün Gastrocnemius Kas Hacmi Ölçümü



Şekil 22: 6. Grup 6. Sıçan 60. Gün Gastrocnemius Kas Hacmi Ölçümü



Şekil 23: 6. Grup 6. Sıçan 96. Gün Gastrocnemius Kas Hacmi Ölçümü



Şekil 24: 6. Grup 6. Sıçan 120. Gün Gastrocnemius Kas Hacmi Ölçümü

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1330	1330	1200	1230	1310
2. Sıçan	1290	1280	1260	1270	1360
3. Sıçan	1640	1540	1420	1410	1380
4. Sıçan	1310	1350	1390	1490	1440
5. Sıçan	1260	1220	1300	1360	1350
6. Sıçan	1540	1550	1440	1410	1400

Tablo 4: 1. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1350	1050	1540	1640	1690
2. Sıçan	1370	940	1260	1370	1350
3. Sıçan	1160	980	1220	1180	1330
4. Sıçan	1330	1030	1430	1350	1250
5. Sıçan	1250	880	1310	1300	1420
6. Sıçan	1240	700	1110	1130	1100

Tablo 5: 2. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1590	1040	1330	1380	1310
2. Sıçan	1390	970	1130	1150	1200
3. Sıçan	1360	1050	1170	1150	1150
4. Sıçan	1570	1120	1260	1240	1380
5. Sıçan	1480	1230	1420	1490	1530
6. Sıçan	1270	1030	1130	1240	1130

Tablo 6: 3. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1470	1150	1380	1350	1420
2. Sıçan	1220	800	1200	1190	1200
3. Sıçan	1370	1100	1250	1170	1140
4. Sıçan	1190	950	1090	1030	1170
5. Sıçan	1530	1190	1140	1240	1130
6. Sıçan	1200	720	790	800	980

Tablo 7: 4. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1360	1380	1420	1450	1490
2. Sıçan	1350	1450	1420	1390	1400
3. Sıçan	1290	1230	1150	1190	1290
4. Sıçan	1380	1350	1310	1440	1490
5. Sıçan	1330	1320	1300	1360	1240
6. Sıçan	1390	1430	1440	1420	1450

Tablo 8: 5. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1130	960	1090	770	960
2. Sıçan	1200	840	970	780	960
3. Sıçan	1040	780	930	730	610
4. Sıçan	1250	910	1090	910	1060
5. Sıçan	1130	660	900	650	860
6. Sıçan	1250	910	1020	830	1190

Tablo 9: 6. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1250	930	1040	660	920
2. Sıçan	1270	870	1060	710	980
3. Sıçan	1350	910	1150	800	980
4. Sıçan	990	740	910	720	880
5. Sıçan	770	510	680	590	710
6. Sıçan	940	540	770	590	830

Tablo 10: 7. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün
1. Sıçan	1510	740	1110	730	910
2. Sıçan	1560	1030	1330	810	1080
3. Sıçan	1020	580	990	580	730
4. Sıçan	1310	850	1120	650	840
5. Sıçan	1080	700	980	660	890
6. Sıçan	1210	780	940	610	850

Tablo 11: 8. Grup Gastroknemius Kas Hacimleri (mm³)

4.1.2 Radyolojik Bulguların İstatistiksel Analizi

Tek doz enjeksiyon yapılan gruplara baktığımızda kontrol grubu haricinde olan gruplarda (2., 3., ve 4. gruplar) kas hacimlerinin ortalama değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (hepsi için $p<0,001$). Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te 0. gün yapılan ölçümlerdeki kas hacimlerinin ortalama değerlerine göre 36. gündeki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı (Grup 2 ve 3 $p=0,001$ Grup4 $p<0,001$). 0. gün-120. gün ölçüm karşılaştırılmalarında, kontrol grubu haricinde BTx-A enjeksiyonu yapılan **2., 3. ve 4. gruplara bakıldığında ise 3U/kg BTx-A enjeksiyonu yapılan 2. grupta 120. gün sonunda kas hacminde kalıcı bir azalma görülmediği halde 6U/kg BTx-A yapılan 3. grupta ve 12U/kg BTx-A yapılan 4. grupta 120. gün sonunda 0. gün kas hacmine göre gastroknemius kas hacminde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi** (Tablo 12-13) (Şekil 25).

İki doz enjeksiyon yapılan gruplarda kontrol grubu dışındaki gruplarda (6., 7., ve 8. gruplar) kas hacimlerinin ortalama değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Grup 7 $p=0,001$ diğerleri $p<0,001$). İki kez enjeksiyon yapılan Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'de ilk enjeksiyonda 0. gün yapılan ölçümlerdeki kas hacimlerinin ortalama değerlerine göre 36. gündeki azalma (Grup 6 $p=0,001$, Grup 7 ve Grup 8 $p<0,001$), ikinci enjeksiyonda Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'de; 60. gün ölçümlerdeki kas hacimlerinin ortalama değerlerine göre 96. gündeki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı (Grup 6 ve 8 de $p<0,001$ Grup 7 $p=0,03$) (Tablo 12-13) (Şekil 26).

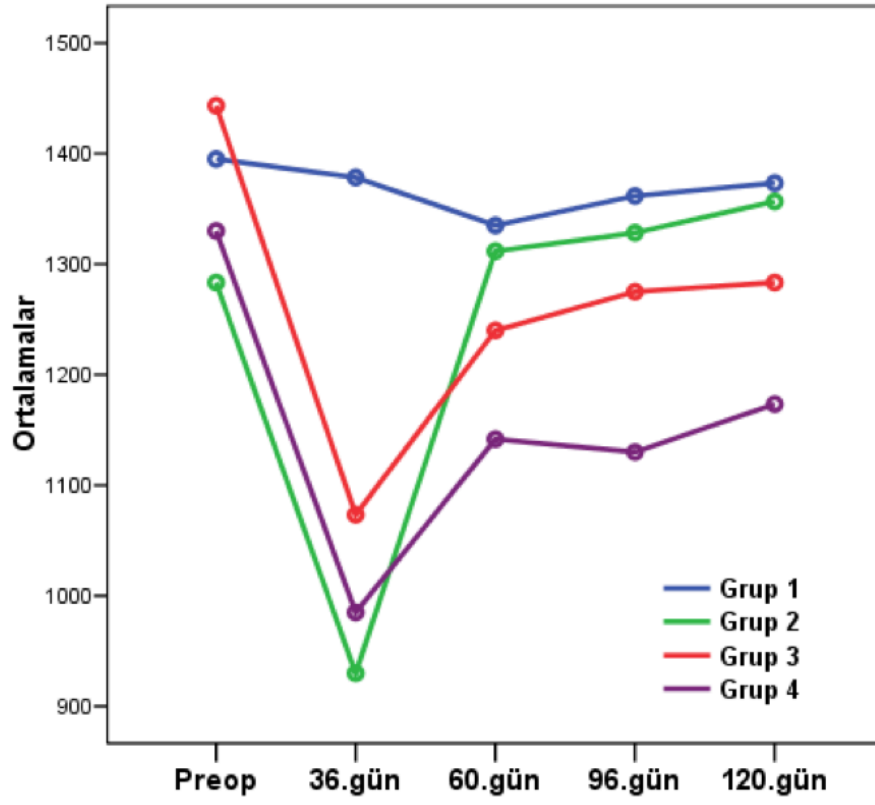
	0. Gün	36. Gün	60. Gün	96. Gün	120. Gün	
	Ort.± SD	Ort.± SD	Ort.± SD	Ort.± SD	Ort.± SD	p
Tek Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar						
Grup 1	1395,0±156,0	1378,3±137	1335,0±96,3	1361,7±96,8	1373,3±44,6	0,712
Grup 2	1283,3±80,4	930,0±128,4	1311,7±153,5	1328,3±179,7	1356,7±196,5	<0,001
Grup 3	1443,3±125,5	1073,3±90,5	1240,0±118,3	1275,0±134,9	1283,3±154,4	<0,001
Grup 4	1330,0±148,2	985,0±194,0	1141,7±199,1	1130,0±192,1	1173,3±142,8	<0,001
İki Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar						
Grup 5	1350,0±36,3	1360,0±80,0	1340,0±110,8	1375,0±96,5	1393,3±106,0	0,418
Grup 6	1166,7±82,1	843,3±109,7	1000,0±80,5	778,3±88,2	940,0±196,5	<0,001
Grup 7	1095,0±228,2	750,0±186,7	935,0±182,1	678,3±81,8	883,3±102,9	0,001
Grup 8	1281,7±221,2	780,0±151,9	1078,3±143,3	673,3±84,1	883,3±114,8	<0,001

Tablo 12: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişimleri

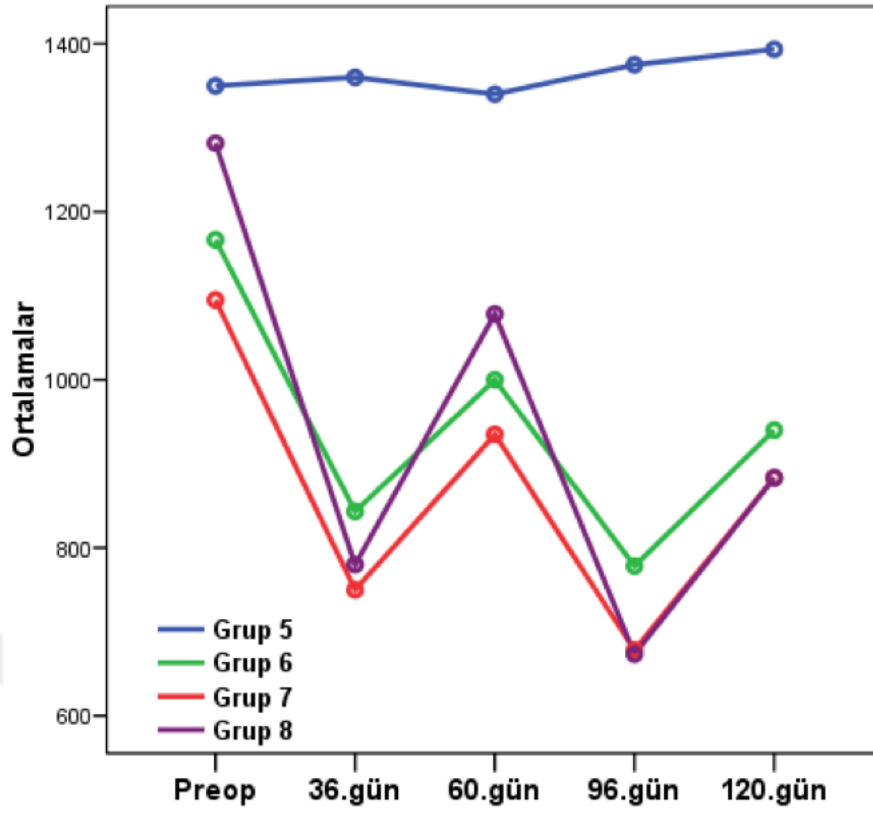
Tek Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
	p	p	p	p
0. Gün vs. 36. Gün	0,438	0,001	0,001	<0,001
0. Gün vs. 60. Gün	0,246	0,601	0,003	0,040
0. Gün vs. 96. Gün	0,615	0,442	0,025	0,013
0. Gün vs. 120. Gün	0,740	0,372	0,018	0,050
36. Gün vs. 60. Gün	0,291	<0,001	0,002	0,053
60. Gün vs. 96. Gün	0,228	0,615	0,158	0,672
96. Gün vs. 120. Gün	0,647	0,501	0,829	0,372

İki Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar	Grup 5	Grup 6	Grup 7	Grup 8
	p	p	p	p
0. Gün vs. 36. Gün	0,683	0,001	<0,001	<0,001
0. Gün vs. 60. Gün	0,784	0,004	0,001	0,012
0. Gün vs. 96. Gün	0,392	<0,001	0,002	<0,001
0. Gün vs. 120. Gün	0,242	0,006	0,012	0,001
36. Gün vs. 60. Gün	0,291	<0,001	<0,001	<0,001
60. Gün vs. 96. Gün	0,201	<0,001	0,003	<0,001
96. Gün vs. 120. Gün	0,571	0,052	<0,001	<0,001

Tablo 13: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişimlerinin p Değerleri



Şekil 25: Tek Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişim Grafiği



Şekil 26: İki Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplarda Günlere Göre Kas Hacimlerinin Ortalama Değişim Grafiği

Tek doz enjeksiyon yapılan sıçan gruplarında 0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesi; Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 14-15).

0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesindeki değişimlere bakıldığında; 2., 3. ve 4. gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel fark oluşturmamakla beraber, Grup 2'den Grup 4'e gidildikçe artan dozlarla birlikte kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü. (Tablo 14-15).

İki doz enjeksiyon yapılan sıçan gruplarında 0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesine ve ikinci doz yapıldıktan sonraki (60. gün) 60-96. günlerdeki kas hacmi değişim yüzdesine baktığımızda Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'de kontrol grubuna göre kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 14-15).

0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesini incelediğimizde; Grup 6'dan Grup 8'e gidildikçe 2., 3. ve 4. gruplarda olduğu gibi doz artırıldıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü. Grup 6 ile Grup 8 kıyaslandığında ise doz arttıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olması istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0,037$) (Tablo 14-15).

6., 7. ve 8. gruplar, 60. gün tekrar dozları yapıldıktan sonra incelendiğinde ise 96. gündeki kas hacmi yüzdesinin 60. güne göre tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha fazla azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 14-15). Bu grupların kendileri arasındaki ilişkilerine baktığımız zaman ise Grup 6'dan Grup 8'e gidildikçe doz artırıldıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü. Grup 7 ile Grup 8 ve Grup 6 ile Grup 8 kıyaslandığında ise doz arttıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,017$, $p=0,001$).

Tek Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar					İki Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar			
% Değişimler		Ort.	95% CI			Ort.	95% CI	
0. gün-36.gün	Grup 1	-1,1±3,2	-4,4	2,3	Grup 5	0,7±4,2	-3,7	5,1
	Grup 2	-24,5±9,7	-37,7	-17,3	Grup 6	-27,7±8,6	-36,7	-18,7
	Grup 3	-25,3±6,9	-32,6	-18,1	Grup 7	-31,9±6,3	-38,5	-25,2
	Grup 4	-26,4±8,6	-35,4	-17,3	Grup 8	-39,0±6,8	-46,1	-31,9
	p	<0,001			p	<0,001		
0. gün-60.gün	Grup 1	-3,8±7,5	-11,7	4,1	Grup 5	-0,8±6,4	-7,5	5,9
	Grup 2	2,2±9,5	-7,8	12,1	Grup 6	-14,1±6,5	-20,9	-7,4
	Grup 3	-14,0±5,8	-20,1	-7,9	Grup 7	-14,3±3,8	-18,3	-10,4
	Grup 4	-14,1±12,7	-27,5	-0,7	Grup 8	-15,0±8,5	-24,0	-6,1
	p	0,014			p	0,003		
0. gün-96.gün	Grup 1	-1,6±10,6	-12,8	9,5	Grup 5	1,8±5,0	-3,4	7,0
	Grup 2	3,3±10,0	-7,1	13,8	Grup 6	-33,3±5,3	-38,9	-27,8
	Grup 3	-11,4±8,6	-20,5	-2,4	Grup 7	-36,7±9,5	-46,6	-26,7
	Grup 4	-15,2±10,6	-26,2	-4,1	Grup 8	-47,0±4,9	-52,1	-41,8
	p	0,016			p	<0,001		
0. gün-120.gün	Grup 1	-0,7±10,1	-11,3	10,0	Grup 5	3,1±5,9	-3,1	9,3
	Grup 2	5,8±14,1	-9,1	20,6	Grup 6	-20,0±12,2	-32,9	-7,2
	Grup 3	-11,1±7,5	-18,9	-3,2	Grup 7	-17,9±8,6	-26,9	-8,8
	Grup 4	-11,3±10,5	-22,3	-0,3	Grup 8	-30,4±7,6	-38,3	-22,4
	p	0,032			p	<0,001		
36.gün-60.gün	Grup 1	-2,8±6,5	-9,7	4,1	Grup 5	-1,6±3,2	-4,9	1,8
	Grup 2	41,±912,0	29,3	54,5	Grup 6	19,4±8,8	10,1	28,7
	Grup 3	15,6±6,5	8,7	22,4	Grup 7	26,5±10,5	15,4	37,5
	Grup 4	17,3±18,0	-1,6	36,2	Grup 8	40,3±17,9	21,5	59,2
	p	<0,001			p	<0,001		
60.gün-96.gün	Grup 1	2,1±3,4	-1,6	5,7	Grup 5	2,8±4,4	-1,8	7,4
	Grup 2	1,2±5,6	-4,6	7,1	Grup 6	-22,2±5,2	-27,7	-16,8
	Grup 3	2,8±4,3	-1,7	7,4	Grup 7	-26,2±8,7	-35,3	-17,2
	Grup 4	-0,8±5,5	-6,6	5,0	Grup 8	-37,4±3,9	-41,5	-33,3
	p	0,600			p	0,001		
96.gün-120.gün	Grup 1	1,1±4,5	-3,6	5,8	Grup 5	1,4±5,7	-4,5	7,4
	Grup 2	2,2±7,6	-5,7	10,2	Grup 6	20,6±20,3	-0,8	41,9
	Grup 3	0,7±7,1	-6,8	8,2	Grup 7	30,5±9,7	20,3	40,8
	Grup 4	5,1±11,4	-6,8	17,1	Grup 8	31,2±5,6	25,3	37,1
	p	0,779			p	0,001		

Tablo 14: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacim Yüzdelерinin Değişimleri

Tek Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar	Grup 1 vs. Grup 2	Grup 1 vs. Grup 3	Grup 1 vs. Grup 4	Grup 2 vs. Grup 3	Grup 3 vs. Grup 4	Grup 2 vs. Grup 4
% Değişim	p	p	p	p	p	p
0. gün-36. gün	<0,001	<0,001	<0,001	0,961	0,995	0,994
0. gün-60. gün	0,685	0,257	0,248	0,032	1,000	0,030
0. gün-96. gün	0,825	0,350	0,121	0,081	0,916	0,021
0. gün-120. gün	0,733	0,365	0,345	0,061	1,000	0,056
36. gün-60. gün	<0,001	0,061	0,036	0,005	0,994	0,008
60. gün-96. gün	0,991	0,992	0,732	0,939	0,567	0,881
96. gün-120.gün	0,995	1,000	0,824	0,988	0,782	0,925

İki Doz Enjeksiyon Yapılan Gruplar	Grup 5 vs. Grup 6	Grup 5 vs. Grup 7	Grup 5 vs. Grup 8	Grup 6 vs. Grup 7	Grup 7 vs. Grup 8	Grup 6 vs. Grup 8
% Değişim	p	p	p	p	p	p
0. gün-36. gün	<0,001	<0,001	<0,001	0,697	0,279	0,037
0. gün-60. gün	0,010	0,009	0,006	1,000	0,998	0,995
0. gün-96. gün	<0,001	<0,001	<0,001	0,808	0,053	0,008
0. gün-120. gün	0,001	0,003	<0,001	0,974	0,103	0,218
36. gün-60. gün	0,022	0,002	<0,001	0,709	0,186	0,023
60. gün-96. gün	<0,001	<0,001	<0,001	0,640	0,017	0,001
96. gün-120.gün	0,053	0,002	0,002	0,490	1,000	0,434

Tablo 15: Tüm Gruplarda Günlere Göre Kas Hacim Yüzdelерinin Değişimlerinin p Değerleri

5. TARTIŞMA

BTx-A'nın 1817 yılında Justinus Kerner tarafından tanımlanmasından sonra başlayan çalışmalar, 1949 yılında Burgen'in etki mekanizmasını tanımlamasının ardından hız kazanmış ve günümüze kadar BTx-A üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır [7, 9]. Önceki yıllarda hemifasyal spazm, strabismus ve bleferospazm tedavisi için kullanılırken daha sonra Jean Carruthers ve Alastair Carruthers'in çalışmalarıyla beraber kozmetik alanda kullanıma girmiştir. 2002'de FDA botulinum toksin uygulamalarını glabellar kırışıklıklar için onaylamıştır [10, 11, 13, 15].

Günümüzde BTx-A oftalmatoloji ve kozmetik cerrahideki kullanımının yanı sıra miyofasiyal ağrı sendromu, spazmodik disfoni, oromandibular distoni, kranioservikal distoni, Frey sendromu, Hirschsprung hastalığı, tortikollis, hidradenitis suppurativa, hiperhidrosis ve migrende de etkin olarak kullanılmaktadır [16-24].

Masseter kasının bilateral ağrısız şişliği ile karakterize olan benign masseter hipertrofisinde kas gevşetici ve splint kullanımı gibi konservatif tedavilerden fayda görmeyen hastalarda önceden parsiyel kas eksizyonu gibi cerrahi yöntemler kullanılırken; bu yöntemlerin hemoraji, ödem, skar gibi komplikasyonlarla beraber fasial sinir yaralanması gibi ciddi sonuçlar oluşturabilecek bir komplikasyona da yol açabilecek olması nedeniyle günümüzde BTx-A enjeksiyonu gibi daha az invaziv yaklaşımlar yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu çalışmalarda yüz güldürücü sonuçlar alındığı bildirilmiştir [95, 97].

BTx-A enjeksiyonu klinikte yoğun kullanılan, kalıcı olmayan, hedef kasta iyatrojenik paralizi oluşturan bir tedavi yöntemidir. Tedavinin geçici olmasının nedeni toksinin resorbsiyonu ve nörotransmitter sisteminin kendisini onarmasıdır. Elde edilen paralizi kırışıklığın düzelmesini ve aynı zamanda kas hacmi azalmasını da sağlamaktadır. Bu noktadan hareketle çalışmamızda kas hacmi azalmasının objektif (kantitatif) verilerle tespit edilmesi amaçlandı.

Her ne kadar klinikte yoğun kullanılan bir tedavi modalitesi olsa da, literatürde artan ve tekrarlayan dozlarda BTx-A uygulanmasının kas hacmi üzerine etkisini volumetrik olarak gösteren bir çalışmanın bilebildiğimiz kadarıyla olmadığından dolayı bu çalışma planlandı ve bu amaç doğrultusunda deneysel çalışma için uygun bir model olan sıçan gastroknemius kası üzerinde çalışıldı [1, 3-5]. Sıçan gastroknemius kası üzerinde yapılan, artan ve tekrarlayan dozlardaki BTx-A enjeksiyonu uygulamasının, volumetrik MR yardımı ile kas hacmi üzerindeki etkisi incelendi.

Çalışmamızda standartizasyonu olabildiğince sağlamak amacıyla tüm sıçanlarda sağ alt ekstremitte posteriorundan 3 cm'lik vertikal insizyonu takiben soleus kasına yakınlığı gözetilerek diseksiyon ile gastroknemius kasına ulaşılmış ve kontrol gruplarında (1. ve 5. gruplar) ve BTx-A enjeksiyonu yapılan gruplarda tüm enjeksiyonlar direkt gastroknemius kası içerisine yapılmıştır.

BTx-A uygulaması öncesinde 0. gün tüm hayvanların sağ gastroknemius kas hacmi volumetrik MR çekilerek değerlendirildi. BTx-A etkinliğinin maksimum olduğu 36. günde, etkinin sona erdiği ve 5., 6., 7. ve 8. gruplara tekrar dozunun yapıldığı 60. günde, ikinci doz yapıldıktan sonraki 36. günde (96. gün) ve ikinci doz yapıldıktan sonraki 60. günde (120. gün) tüm hayvanların sağ gastroknemius kas hacimleri volumetrik MR ile değerlendirildi. MR çekimi planlanan günler literatürde öngörüldüğü üzere maksimum etkinin 30-36. günlerde görülmesi ve kemirgenlerde yapılan bir çalışmada BTx-A etkisinin 8 haftaya kadar sürdüğünün belirtilmesi dikkate alınarak planlandı ve tekrar dozu yapılan gruplarda bu durum gözetilerek tekrar dozları 60. günde uygulandı [37, 39, 100]. Çalışmamızda 8 grubun değişen kas hacimlerinin ortalama değişimleri ve kas hacim değişiklik yüzdeleri birbirleriyle kıyaslandı.

Yapılan incelemeler sonucunda tek doz enjeksiyon yapılan gruplara baktığımızda kontrol grubu haricinde olan gruplarda (Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te) 0. gün yapılan ölçümlerdeki kas hacimlerinin ortalama değerlerine göre 36. gündeki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı.

0. gün-120. gün ölçüm karşılaştırılmalarında, kontrol grubu haricinde BTx-A enjeksiyonu yapılan 2., 3. ve 4. gruplara bakıldığında ise 3U/kg BTx-A enjeksiyonu

yapılan 2. grupta 120. gün sonunda kas hacminde kalıcı bir azalma görülmediği halde 6U/kg BTx-A yapılan 3. grupta ve 12U/kg BTx-A yapılan 4. grupta 120. gün sonunda 0. gün kas hacmine göre gastroknemius kas hacminde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi (Tablo 12-13) (Şekil 1). Literatüre bakıldığında BTx-A etkisinin kemirgenlerde ortalama 8 hafta sürdüğü belirtildiği halde; çalışmamızın 120. gününde 3U/kg verilen 2. grupta 0. gün ölçümlerine göre kas hacminin daha az olması istatistiksel olarak anlamlı değil iken, 6U/kg ve 12U/kg verilen iki grubumuzda (3. ve 4. gruplar) 120. günde 0. gün ölçümlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir kas hacmi azalmasının tespit edilmesi nedeniyle, yüksek dozlarda uygulanan BTx-A etkisinin tamamen geçici değil de artan dozlarda bir miktarının kalıcı olabileceğini ve bu kalıcılığın doz ayarlamaları ile arttırılabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle bu görüşümüzün teyit edilmesi amacıyla literatürde belirtilen sürenin dışında daha uzun süreleri kapsayan çalışmalar yapılmasının bu konudaki çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızdaki bulgular çerçevesinde; tek doz enjeksiyon yapılan sıçan gruplarında 0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesi; Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 14-15). 0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesindeki değişimlere bakıldığında; 2., 3. ve 4. gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel fark oluşturmamakla beraber, Grup 2'den Grup 4'e gidildikçe artan dozlarla birlikte kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü (Tablo 14-15). Bu durum istatistiksel olarak anlamlı olmasa dahi kas hacmi yüzde değişimlerinin klinik olarak anlamlılığı konusunda daha fazla deneysel çalışma yapılmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

İki doz enjeksiyon yapılan sıçan gruplarında 0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesine ve ikinci doz yapıldıktan sonraki (60. gün) 60-96. günlerdeki kas hacmi değişim yüzdesine baktığımızda Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'de kontrol grubuna göre kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 14-15).

0. gün-36. gün kas hacmi değişim yüzdesini incelediğimizde; Grup 6'dan Grup 8'e gidildikçe 2., 3. ve 4. gruplarda olduğu gibi doz artırıldıkça kas hacmi yüzdelerinde

daha fazla azalma olduğu görüldü. Grup 6 ile Grup 8 kıyaslandığında ise doz arttıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olması istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0,037$) (Tablo 14-15).

6., 7. ve 8. gruplar, 60. gün tekrar dozları yapıldıktan sonra incelendiğinde ise 96. gündeki kas hacmi yüzdesinin 60. güne göre tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha fazla azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 14-15). Bu grupların kendileri arasındaki ilişkilerine baktığımız zaman ise Grup 6'dan Grup 8'e gidildikçe doz artırıldıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü. Grup 7 ile Grup 8 ve Grup 6 ile Grup 8 kıyaslandığında ise doz arttıkça kas hacmi yüzdelerinde daha fazla azalma olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,017$, $p=0,001$).

Bu veriler ışığında; tek doz ve iki doz BTx-A enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda kas hacim yüzdelerinin artan dozlarla birlikte daha fazla azaldığı görüldü. Bu azalma tek doz yaptığımız gruplarda (2., 3. ve 4. gruplar) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İki doz yaptığımız gruplara baktığımızda ise (6., 7. ve 8. gruplar) 3U/kg BTx-A enjeksiyonu yaptığımız 6. grupta kas hacim yüzdelerinin azalması istatistiksel olarak anlamlı değilken, 6U/kg BTx-A yaptığımız 7. grupta ve 12U/kg BTx-A yaptığımız 8. grupta 60-96. günlerdeki kas hacim yüzdelerinin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgulardan yola çıkarak yüksek dozlarda yapılan tekrar dozlarının daha efektif bir etki yarattığı sonucuna ulaşabiliriz. Bu bağlamda değişen doz ve tekrar sayısı ile ilgili yapılacak deneysel çalışmaların bizi fayda ve maliyet etkinliği açısından en ideal sonuca ulaştırabileceğini öngörmekteyiz.

6. SONUÇ

Günümüzde giderek hızla yaygınlaşan minimal invaziv tedavi yöntemlerinden biri olan ve hekimlerce uygulanması gereken BTx-A tedavisinin, yetkisiz kişilerce yerli yersiz kullanımları, ampirik doz ayarlamaları ve rastgele tekrarlama aralıkları nedeniyle ciddi bir kontrolsüzlük mevcuttur.

Bu çalışmada elde edilen veriler, sıçanlar üzerinde uygun doz ve tekrar sayısı dikkate alınarak uygulanan BTx-A etkisinin literatürde öngörülenden daha uzun olabileceğini ve kas hacmi azalması konusunda bir miktar kalıcı etki sağlayabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Montecucco, C. and G. Schiavo, *Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins*. Molecular microbiology, 1994. **13**(1): p. 1-8.
2. Park, G., et al., *Does Botulinum Toxin Injection into Masseter Muscles Affect Subcutaneous Thickness?* Aesthetic surgery journal, 2017. **38**(2): p. 192-98.
3. Caron, G., T. Marqueste, and P. Decherchi, *Long-Term Effects of Botulinum Toxin Complex Type A Injection on Mechano- and Metabo-Sensitive Afferent Fibers Originating from Gastrocnemius Muscle*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140439.
4. Tsai, S.W., et al., *Effects of treadmill running on rat gastrocnemius function following botulinum toxin A injection*. Journal of Orthopaedic Research, 2012. **30**(2): p. 319-24.
5. Han, N., et al., *Proteomic changes in rat gastrocnemius muscle after botulinum toxin a injection*. Annals of rehabilitation medicine, 2013. **37**(2): p. 157-66.
6. Chen, C.-M., N.S. Stott, and H.K. Smith, *Effects of botulinum toxin A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle*. Journal of Applied Physiology, 2002. **93**(4): p. 1437-47.
7. Erbguth, F.J., *Historical notes on botulism, Clostridium botulinum, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin*. Mov Disord, 2004. **19** Suppl 8: p. S2-6.
8. Jankovic, J. and M.F. Brin, *Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications*. Muscle & nerve, 1997. **20**(S6): p. 129-45.
9. Ting, P.T. and A. Freiman, *The story of Clostridium botulinum: from food poisoning to Botox*. Clinical medicine, 2004. **4**(3): p. 258-61.
10. Carruthers, J.D. and J.A. Carruthers, *Treatment of glabellar frown lines with C. Botulinum-A exotoxin*. The Journal of dermatologic surgery and oncology, 1992. **18**(1): p. 17-21.

11. Carruthers, A. and J. Carruthers. *Botulinum toxin type A: history and current cosmetic use in the upper face*. in *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2001. WB Saunders.
12. <https://www.news.com.au/technology/how-botox-inventor-let-fame-fortune-slip/news-story/ef50d3f86326a46c333ff5b1490524d0>.
13. Cartee, T.V. and G.D. Monheit, *An overview of botulinum toxins: past, present, and future*. Clinics in plastic surgery, 2011. **38**(3): p. 409-426.
14. <http://time.com/4623409/botox-drug-treating-everything/>.
15. Coté, T.R., et al., *Botulinum toxin type A injections: adverse events reported to the US Food and Drug Administration in therapeutic and cosmetic cases*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2005. **53**(3): p. 407-415.
16. Guyuron, B. and B.M. Kinney, *Aesthetic plastic surgery video atlas e book*. 2011: Elsevier Health Sciences.
17. O'reilly, D.J., J.M. Pleat, and A.M. Richards, *Treatment of hidradenitis suppurativa with botulinum toxin A*. Plastic and reconstructive surgery, 2005. **116**(5): p. 1575-1576.
18. Heckmann, M., A.O. Ceballos-Baumann, and G. Plewig, *Botulinum toxin A for axillary hyperhidrosis (excessive sweating)*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(7): p. 488-493.
19. Drobik, C. and R. Laskawi, *Frey's syndrome: treatment with botulinum toxin*. Acta oto-laryngologica, 1995. **115**(3): p. 459-461.
20. Cheshire, W.P., S.W. Abashian, and J.D. Mann, *Botulinum toxin in the treatment of myofascial pain syndrome*. Pain, 1994. **59**(1): p. 65-69.
21. Sedory Holzer, S.E. and C.L. Ludlow, *The swallowing side effects of botulinum toxin type A injection in spasmodic dysphonia*. The Laryngoscope, 1996. **106**(1): p. 86-92.
22. Blitzer, A., et al., *Botulinum toxin injection for the treatment of oromandibular dystonia*. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 1989. **98**(2): p. 93-97.
23. Minkes, R.K. and J.C. Langer, *A prospective study of botulinum toxin for internal anal sphincter hypertonicity in children with Hirschsprung's disease*. Journal of pediatric surgery, 2000. **35**(12): p. 1733-1736.

24. Silberstein, S., et al., *Botulinum toxin type A as a migraine preventive treatment*. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 2000. **40**(6): p. 445-450.
25. Lam, S.M., *The basic science of botulinum toxin*. Facial plastic surgery clinics of North America, 2003. **11**(4): p. 431-38.
26. Nigam, P. and A. Nigam, *Botulinum toxin*. Indian journal of dermatology, 2010. **55**(1): p. 8.
27. Aoki, K.R., *Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes*. Journal of Neurology, 2001. **248**(1): p. I3-I10.
28. Aoki, K. and B. Guyer, *Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions*. European Journal of Neurology, 2001. **8**(s5): p. 21-9.
29. Huang, W., J.A. Foster, and A.S. Rogachefsky, *Pharmacology of botulinum toxin*. Journal of the American academy of dermatology, 2000. **43**(2): p. 249-59.
30. Dressler, D. and F.A. Saberi, *Botulinum toxin: mechanisms of action*. European neurology, 2005. **53**(1): p. 3-9.
31. Coffield, J., *The site and mechanism of action of botulinum neurotoxin*. Therapy with botulinum toxin, 1994: p. 3-13.
32. Simpson, L.L., *Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1986. **26**(1): p. 427-53.
33. Williamson, L.C., et al., *Clostridial Neurotoxins and Substrate Proteolysis in Intact Neurons Botulinum Neurotoxin C Acts On Synaptosomal-Associated Protein OF 25 kDa*. Journal of biological chemistry, 1996. **271**(13): p. 7694-99.
34. Brin, M.F. and K.R. Aoki, *Botulinum toxin type A: pharmacology*. Spasticity: etiology, evaluation, management and the role of botulinum toxin, 2002: p. 110-24.
35. Dolly, O., *Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins*. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 2003. **43**(s1): p. 16-24.
36. Schantz, E.J., *Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment*. Therapy with botulinum toxin, 1994.

37. Rohrich, R.J., et al., *The cosmetic use of botulinum toxin*. Plastic and reconstructive surgery, 2003. **112**(5): p. 177S-88S.
38. Improvement, L.M., *BOTOX® COSMETIC (Botulinum Toxin Type A) Purified Neurotoxin Complex*.
39. Matic, D.B., et al., *The effects of botulinum toxin type A on muscle blood perfusion and metabolism*. Plastic and reconstructive surgery, 2007. **120**(7): p. 1823-33.
40. Scott, A.B., R.A. Kennedy, and H.A. Stubbs, *Botulinum A toxin injection as a treatment for blepharospasm*. Archives of ophthalmology, 1985. **103**(3): p. 347-50.
41. Pasricha, P.J., et al., *Intrasphincteric botulinum toxin for the treatment of achalasia*. New England Journal of Medicine, 1995. **332**(12): p. 774-78.
42. Grazko, M.A., K.B. Polo, and B. Jabbari, *Botulinum toxin A for spasticity, muscle spasms, and rigidity*. Neurology, 1995. **45**(4): p. 712-17.
43. Çoban, A., et al., *Efficacy of Botulinum Toxin Injections in the Treatment of Various Types of Facial Region Disorders*. Turkish Journal of Neurology/Türk Noroloji Dergisi, 2012. **18**(4).
44. Durham, P.L., R. Cady, and R. Cady, *Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy*. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 2004. **44**(1): p. 35-43.
45. Cosgrove, A., I. Corry, and H. Graham, *Botulinum toxin in the management of the lower limb in cerebral palsy*. Developmental Medicine & Child Neurology, 1994. **36**(5): p. 386-96.
46. Helveston, E.M. and A.E. Pogrebniak, *Treatment of acquired nystagmus with botulinum A toxin*. American journal of ophthalmology, 1988. **106**(5): p. 584-86.
47. Tan, E.-K. and J. Jankovic, *Treating severe bruxism with botulinum toxin*. The Journal of the American Dental Association, 2000. **131**(2): p. 211-16.
48. Tokgöz, H., İ. Dönmez, and N.A. Mungan, *Ürolojide Botulinum Toksini Kullanımı: Son Yılların Yükselen Akımı*.

49. Jankovic, J., K. Schwartz, and D.T. Donovan, *Botulinum toxin treatment of cranial-cervical dystonia, spasmodic dysphonia, other focal dystonias and hemifacial spasm*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1990. **53**(8): p. 633-39.
50. Canter, H.I., et al., *Botulinum toxin in closed treatment of mandibular condylar fracture*. Annals of plastic surgery, 2007. **58**(5): p. 474-78.
51. Savrun, F.K., *Botulinum Toksini: Tarihçe, Etki Mekanizması, Uygulama, Terapötik Kullanım/Botulinum Toxin: History, Mechanism of Action, Therapeutic Applications*. Noro-Psikyatrisi Arsivi, 2010. **47**: p. 1.
52. Tunali, Ş. and A. Turan, *Hiperhidroziste Botulinum Toksin Uygulaması*. Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences, 2007. **3**(48): p. 99-102.
53. Ceyhan, A.M. and İ. Erturan, *Hiperhidrozda Eski ve Yeni Seçenekler*. Türkiye Klinikleri Journal of Cosmetic Dermatology Special Topics, 2016. **9**(1): p. 80-7.
54. Dinçer, Ü., et al., *Diplejik Serebral Palsili Hastalarda Botulinum Toksin Uygulaması Sonrasında Fizyoterapi ve Alt Ekstremitte Ortezinin Etkinliğinin Karşılaştırılması*. Turkish Journal of Physical Medicine & Rehabilitation/Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi, 2008. **54**(2).
55. Çağliyan Türk, A. and S. Özel, *Serebral Palsi Tanısı ile İzlediğimiz Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri*. Journal of Physical Medicine & Rehabilitation Sciences/Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi, 2018. **21**(2).
56. Sirin, S., *Spazmodik disfoni*. Journal of Turgut Ozal Medical Center, 2017. **24**(2).
57. Karaçaylı, Ü., B. Ergüder, and R. Köymen, *Botulinum Toksininin Maksillofasial Bölgede Kullanımı*. Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences, 2012. **18**(3): p. 296-303.
58. Tinastepe, N., B.B. Küçük, and K. Oral, *Botulinum toxin for the treatment of bruxism*. 2015, Taylor & Francis.
59. Ozturk, E., et al., *Unilateral temporalis muscle hypertrophy with contralateral masseteric hypertrophy*. Dentomaxillofacial Radiology, 2007. **36**(5): p. 296-97.

60. Balaban, B., et al., *Botulinum toxin a treatment in children with cerebral palsy: its effects on walking and energy expenditure*. American journal of physical medicine & rehabilitation, 2012. **91**(1): p. 53-64.
61. Foster, J.A., et al., *Cosmetic uses of Botulinum toxin*, in *Manual of oculoplastic surgery*. 2018, Springer. p. 165-72.
62. Thomas, A.J., et al., *Effect of 3 Commercially Available Botulinum Toxin Neuromodulators on Facial Synkinesis: A Randomized Clinical Trial*. JAMA facial plastic surgery, 2018. **20**(2): p. 141-47.
63. Kaya, B. and S.Ö.T. Karagüven, *Kozmetik Amaçlı Botulinum Toksin Tıp A Uygulamalarında Hasta Memnuniyeti ve Sık Karşılaşılan Hasta Şikayetleri*. Türkiye Klinikleri Journal of Plastic Surgery Special Topics, 2017. **6**(2): p. 144-47.
64. Bozatlı, H.Ö., *Kırılganlık Tedavisinde Botulinum Toksin Uygulaması*. Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences, 2007. **3**(48): p. 94-8.
65. Tatlıdede, S., et al., *Alın ve göz çevresinde botulinum toksin A uygulamalarımız*. Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk J Plast Surg), 2001. **9**(3).
66. Erk, Y., A. Kayıkçıoğlu, and İ. Manavbaşı, *Fasiyal Hiperkinetik Çizgilerin Giderilmesinde Botulinum Toksini Uygulaması*. Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk J Plast Surg), 1998. **6**(3).
67. Yavuzer, R., *Fasiyal estetik uygulamalarda botulinum toksini*. Gazi Medical Journal, 2006. **17**(4).
68. Özsoy, Z., B. Genç, and A. Gözü, *A new technique applying botulinum toxin in narrow and wide foreheads*. Aesthetic plastic surgery, 2005. **29**(5): p. 368-72.
69. Tiryaki, T. and N.S.E. Ciloglu, *Eye brow asymmetry: definition and symmetrical correction using botulinum toxin A*. Aesthetic surgery journal, 2007. **27**(5): p. 513-17.
70. Ozsoy, Z., A. Gözü, and B. Genç, *Two-plane injection of botulinum toxin for the treatment of glabellar frown lines*. Plastic and reconstructive surgery, 2002. **110**(1): p. 371-72.

71. Motegi, S.i., et al., *Successful treatment of Raynaud's phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis patients with botulinum toxin B injection: Assessment of peripheral vascular disorder by angiography and dermoscopic image of nail fold capillary*. The Journal of dermatology, 2018. **45**(3): p. 349-52.
72. Kossintseva, I. and B. Barankin, *Improvement in both Raynaud disease and hyperhidrosis in response to botulinum toxin type A treatment*. Journal of cutaneous medicine and surgery, 2008. **12**(4): p. 189-93.
73. Van Beek, A.L., et al., *Management of vasospastic disorders with botulinum toxin A*. Plastic and reconstructive surgery, 2007. **119**(1): p. 217-26.
74. Morris, J.L., P. Jobling, and I.L. Gibbins, *Differential inhibition by botulinum neurotoxin A of cotransmitters released from autonomic vasodilator neurons*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2001. **281**(5): p. H2124-H2132.
75. Janis, J.E., et al., *A review of current evidence in the surgical treatment of migraine headaches*. Plastic and reconstructive surgery, 2014. **134**(4S-2): p. 131S-41S.
76. Ertem, D.H. and D. Uludüz, *Baş Ağrısı Tedavisinde Botulinum Toksin Uygulamaları*. Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics, 2018. **11**(1): p. 114-19.
77. Behmand, R.A., T. Tucker, and B. Guyuron, *Single-site botulinum toxin type A injection for elimination of migraine trigger points*. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 2003. **43**(10): p. 1085-89.
78. Guyuron, B., et al., *Comprehensive surgical treatment of migraine headaches*. Plastic and reconstructive surgery, 2005. **115**(1): p. 1-9.
79. Liu, M.T., B.S. Armijo, and B. Guyuron, *A comparison of outcome of surgical treatment of migraine headaches using a constellation of symptoms versus botulinum toxin type A to identify the trigger sites*. Plastic and reconstructive surgery, 2012. **129**(2): p. 413-19.
80. Çelik, E., et al., *Versatility of botulinum toxin: a use in stabilization of pedicled muscle flaps*. Plastic and reconstructive surgery, 2006. **117**(2): p. 462-67.
81. Yildirim, A.M., et al., *Nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flap using botulinum toxin type A*. Plastic and reconstructive surgery, 2008. **122**(1): p. 53e-4e.

82. Kim, T.K., et al., *The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2009. **62**(7): p. 906-13.
83. Arnold, P.B., et al., *Effects of perivascular Botulinum Toxin-A application on vascular smooth muscle and flap viability in the rat*. Annals of plastic surgery, 2009. **62**(5): p. 463-67.
84. Arnold, P.B., et al., *Modification of blood vessel diameter following perivascular application of botulinum toxin-A*. Hand, 2009. **4**(3): p. 302-07.
85. Clemens, M.W., J.P. Higgins, and E.F.S. Wilgis, *Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin a in an animal model*. Plastic and reconstructive surgery, 2009. **123**(1): p. 64-70.
86. Chenwang, D., et al., *Application of botulinum toxin type A in myocutaneous flap expansion*. Plastic and reconstructive surgery, 2009. **124**(5): p. 1450-57.
87. De Aguiar, G., et al., *Chemoprotection of flexor tendon repairs using botulinum toxin*. Plastic and reconstructive surgery, 2009. **124**(1): p. 201-09.
88. Senior, M.A., *Botox and the management of pectoral spasm after subpectoral implant insertion*. Plastic and reconstructive surgery, 2000. **106**(1): p. 224-25.
89. Richards, A., et al., *Botox for contraction of pectoral muscles*. Plastic and reconstructive surgery, 2001. **108**(1): p. 270-71.
90. Cattin, T. and S. Govender, *Botulinum toxin for tethering of breast implant*. Plastic and reconstructive surgery, 2005. **116**(2): p. 686-88.
91. Klein, A.W., *Complications with the use of botulinum toxin*. International ophthalmology clinics, 2005. **45**(3): p. 163-69.
92. Carruthers, J.D., et al., *Double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of botulinum toxin type A for patients with glabellar lines*. Plastic and reconstructive surgery, 2003. **112**(5): p. 21S-30S.
93. Oliveira Monteiro, E., *Botulinum toxin and pregnancy*. SKINmed: Dermatology for the Clinician, 2006. **5**(6): p. 308-308.
94. Lowe, N.J., *Botulinum toxin type A for facial rejuvenation*. Dermatologic Surgery, 1998. **24**(11): p. 1216-18.
95. Kocaelli, H., S. Çakarar, and M. Yaltirik, *Botulimum Toksin (Btx) Ve Klinik Kullanımı/Botulimun Toxin (Btx) And Clinical Usage*. Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry, 2004. **38**(3-4): p. 37-43.

96. Yaman, Z., Ş. Özkal, and S. Göktepe, *Benign Masseter Hipertrofisinin Botulinum Toksin Tip A İle Tedavisi-Treatment Of Benign Masseter Hypertrophy With Botulinum Toxin Type A*. Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry, 1997. **31**(1): p. 3-6.
97. Moore, A. and G. Wood, *The medical management of masseteric hypertrophy with botulinum toxin type A*. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1994. **32**(1): p. 26-8.
98. Aoki, K.R., *Botulinum neurotoxin serotypes A and B preparations have different safety margins in preclinical models of muscle weakening efficacy and systemic safety*. Toxicon, 2002. **40**(7): p. 923-28.
99. Akdeniz, Z.D., et al., *The role of botulinum toxin type a-induced motor endplates after peripheral nerve repair*. Muscle & nerve, 2015. **52**(3): p. 412-18.
100. Kane, M.A., *Nonsurgical treatment of platysmal bands with injection of botulinum toxin A*. Plastic and reconstructive surgery, 2003. **112**(5): p. 115S-22S.