

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA TEKRARLAYAN BOTULİNUM TOKSİN TİP A
ENJEKSİYONLARININ KAS YAPISI ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Tuncay KARSLI

**FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

ANKARA, 2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA TEKRARLAYAN BOTULİNUM TOKSİN TİP A
ENJEKSİYONLARININ KAS YAPISI ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Tuncay KARSLI

**FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şehim KUTLAY**

ANKARA, 2020

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı	: DR.TUNCAY KARSLI
Anabilim/Bilim Dalı	: FTR ANABİLİM DALI
Tez Danışmanı	: PROF.DR.ŞEHİM KUTLAY
Sınav tarihi: 20 / 10 / 2020	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Tekrarlayan Botulinum Toksin Tip A enjeksiyonlarının kas yapısı üzerine etkisinin değerlendirilmesi	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

PROF.DR.ŞEHİM KUTLAY
Jüri Başkanı

Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı

PROF.DR.HAYDAR GÖK
Jüri Üyesi

Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı

DOÇ.DR.ENGİN KOYUNCU
Jüri Üyesi

Ankara Fizik Tedavi Rehabilitasyon E.A.H.

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana yol gösteren desteğini benden esirgemeyen, her sıkıntıda yanımda olan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim ve asistanlık sürecim boyunca benimle paylaştığı değerli bilgileri, önerileriyle gelecekte mesleki hayatıma çok büyük emeği olan kıymetli hocam Prof. Dr. Şehim Kutlay'a;

Araştırma sürecinde çalışmanın histolojik incelemelerini yapan, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan, tezimin analizlerini yapmamda büyük desteği olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Doç. Dr. Deniz Billur 'a ve çalışmanın istatistiksel analizlerini gerçekleştirip sonuçlarda bana yol gösteren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Doç. Dr. Derya Öztuna'ya;

Asistanlık sürecimde eğitimime büyük katkıları olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalının saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Safiye Tuncer, Prof. Dr. Ayşe Küçükdeveci, Prof. Dr. Şebnem Ataman, Prof. Dr. Ayşe Peyman Yalçın, Doç. Dr. Ayşe Bölükbaşı, Prof. Dr. Yeşim Kurtaiş Aytür, Prof. Dr. Birkan Sonel Tur, Prof. Dr. Haydar Gök'e, Doç. Dr. Aysun Genç, Dr. Seçilay Güneş'e;

Birlikte güzel anılar paylaştığım ve özlemle anımsayacağım sevgili asistan arkadaşlarıma ve hep birlikte ekip olarak çalıştığımız ve iş hayatımda yardımlarıyla yanımda olan servis hemşireleri, servis ve poliklinik sekreterleri, fizyoterapistler ve bütün yardımcı sağlık personeline;

Hayatımın her anında varlıklarını yanımda hissettiğim bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan, destekleyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime;

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuncay Karşlı

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İSKELET KASI	3
2.1.1. Gelişimi ve Rejenerasyonu:	3
2.1.2. İskelet Kası Hücreleri:	5
2.1.3. İskelet Kasının Organizasyonu:	11
2.2. BOTULİNUM TOKSİN	12
2.2.1. Etki Mekanizması	12
2.2.2. İmmünolojik Etkileri.....	14
2.2.3. Kullanılan Formları	14
2.2.4. Klinik Uygulama Alanları	15
2.2.5. Yan Etkileri	15
2.3. BOTULİNUM TOKSİNİN KAS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	16
2.3.1. Kas Atrofisi	16
2.3.2. Kas Yapısal Hasarının Belirlenmesi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. ETİK UYGUNLUK VE BÜTÇE	19
3.2. ARAŞTIRMANIN TİPİ.....	19
3.3. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER VE ÖZELLİKLERİ.....	19
3.4. ARAŞTIRMANIN TASARIMI.....	20
3.5. ENJEKSİYON PROTOKOLÜ	21
3.6. ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNDE KULLANILAN DEĞERLENDİRME PARAMETRELERİ.....	22
3.7. KAS DOKUSUNUN ALINMASI	22

3.8. HİSTOLOJİK İNCELEMELER.....	23
3.8.1. Işık Mikroskobu (IM) İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar	23
3.8.2. İmmünohistokimya İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar	25
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. RAT AĞIRLIĞI.....	27
4.2. RAT GASTROKNEMİUS/VÜCUT AĞIRLIĞI YÜZDESİ.....	27
4.3. IŞIK MİKROSKOBU İNCELEMELERİ	28
4.4. KAS LİFİNİN ENİNE KESİTLERDE ALAN ÖLÇÜMÜ	43
4.5. İNFİLTRASYON SKORU.....	44
4.6. HİSTOLOJİK HASAR SKORU	45
4.7. APOPTOZİS İNDEKSİ	46
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR.....	56
ÖZET	58
ABSTRACT.....	59
KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR

Aif	: Apoptozis İndükleyici Faktör
BTX	: Botulinum Toksin
BTX-A	: Botulinum toksin tip-A
cc	: Santimetre Küp
F-Aktin	: Fibriler Aktin
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi (Amerika Birleşik Devletleri)
G-aktin	: Globuler aktin
HE	: Hematoksilen-Eozin
IM	: Işık Mikroskobu
kDa	: kilodalton
Kg	: Kilogram
LD50	: Medyan Öldürücü Doz
mg	: Miligram
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MyoD	: Myoblast Determination Protein 1
ng	: Nanogram
SER	: Sarkoplazmik Retikulum
SNAP-25	: Sinaptozomal İlişkili Protein 25 Kilodalton
SNARE	: Füzyon Membran Kompleks Proteini
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick-End Etiketleme
TnC	: Troponin C
TnI	: Troponin I
TnT	: Troponin T
U	: Ünite
USG	: Ultrasonografi
µl	: Mikrolitre
VAMP 2	: Vezikül İlişkili Membran Proteini 2

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: Çalışmaya dahil edilen ratların başlangıç vücut ağırlıkları.....	27
Tablo 2: Grupların sağ gastroknemius ağırlığının vücut ağırlığına yüzdelерinin değeri.....	28
Tablo 3: Histolojik enine kesit alanlarında grupların kas lifi alan ölçümleri	43
Tablo 4: Grupların İnfiltrasyon Skoru değeri.....	44
Tablo 5: Grupların Histolojik Hasar Skoru değeri	45
Tablo 6: Grupların Apoptosis İndeksi değeri.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1:	Miyoblast iskelet kas lifine farklılaşması.....	4
Şekil 2:	İnce filaman.....	6
Şekil 3:	Miyozin II molekülü ve Kalın filaman	7
Şekil 4:	İskelet kasının elektron mikyografisi ve bir sarkomere karşılık gelen moleküler yapısı	8
Şekil 5:	Çizgili kas lifi organizasyon şeması.....	8
Şekil 6:	İnsan iskelet kası enine kesitte kas lifleri.....	9
Şekil 7:	İnsan iskelet kası boyuna kesitte kas lifleri.....	10
Şekil 8:	İskelet kası organizasyonu	11
Şekil 9:	Botulinum toksini serotiplerine göre hücre içi etki mekanizması.....	13
Şekil 10:	Deney gerçekleştirilen Wistar rat grupları	20
Şekil 11:	Wistar rat enjeksiyon uygulaması	21
Şekil 12:	Wistar rat ötenazi sonrası gastroknemius kasının çevre dokulardan eksplorasyonu.....	22
Şekil 13:	Wistar rat gastroknemius kasının ayrılması	23
Şekil 14:	1. gruba ait ışık mikyografıta enine kesitlerde kas lifleri	29
Şekil 15:	1. gruba ait ışık mikyografıta boyuna kesitte kas lifleri	30
Şekil 16:	2. gruba ait ışık mikyografıta enine kesitte kas lifleri, Büyütme: x10.....	30
Şekil 17:	2. gruba ait ışık mikyografıta enine kesitlerde kas lifleri, Büyütme: x40.....	31
Şekil 18:	2. gruba ait ışık mikyografıta boyuna kesitte kas lifleri	31
Şekil 19:	3. gruba ait ışık mikyografıta boyuna kesitlerde kas lifleri	32
Şekil 20:	3 gruba ait ışık mikyografıta enine kesitte kas lifleri, Büyütme: x10.....	33
Şekil 21:	3. gruba ait ışık mikyografıta enine kesitlerde kas lifleri, Büyütme: x40.....	33
Şekil 22:	4. gruba ait ışık mikyografıta boyuna kesitte kas lifleri	34
Şekil 23:	4. gruba ait ışık mikyografıta enine kesitlerde kas lifleri	35

Şekil 24: 5. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitlerde kas lifleri	36
Şekil 25: 5 gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri	37
Şekil 26: 6. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitlerde kas lifleri	38
Şekil 27: 6. gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri, Büyütme: x10 ve x40.....	39
Şekil 28: 6. gruba ait ışık mikrografta enine kesitte kas lifleri, Büyütme: x10.....	39
Şekil 29: 7. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitlerde kas lifleri	40
Şekil 30: 7. gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri	41
Şekil 31: Gruplara ait kasların TUNEL boyamalarına ait görüntüleri	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Botulinum toksin tip-A (BTX-A) enjeksiyonları spastisite tedavisinde, distoni, blefarospazm vb. hareket bozukluklarının tedavisinde, hiperhidrasyon, kozmetik alanında, anal fissur tedavisi vb. birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (1–5) . Botulinum toksini Clostridium botulinum tarafından üretilen nörotoksik bir protein olup sinir kas kavşağında asetilkolinin akson uçlarından salınımını önleyerek kas üzerinde flask paraliziye neden olmaktadır (6,7). A, B, C, D, E, F ve G olmak üzere 7 serotipi bulunmaktadır (8). Klinik uygulamalarda çoğunlukla A serotipi kullanılmaktadır (9). BTX-A'nın kas üzerine etkileri uygulama sonrası ilk haftada başlarken, 4.-6. haftalarda maksimum düzeye ulaşmakta, genellikle 3-4 ay içerisinde kaybolmaktadır (9,10).

Botulinum toksin tip-A enjeksiyonlarının klinik bulgular ve hastalarda fonksiyonel sonuçlar üzerine olumlu etkileriyle birlikte etkin ve güvenilir olduğunu destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır (3,4,10,11). Botox® (Allergan, Irvine, Calif) 1991 yılında FDA onayı alan ilk botulinum toksin serotip A preparatıdır. Günümüzde de yüz kırışıklıklarında kozmetik amaçlı kullanımıyla birlikte şaşılık, blefarospazm, kronik migren, aşırı aktif mesane, servikal distoni, spastisite (erişkin), aksiller hiperhidrozis tedavisiyle birlikte çocuklarda da 09/07/2020'de spastisite (2 yaş üstü çocuklarda) tedavisinde kullanımına yönelik FDA onayı almıştır. Sistemik yan etkiler klinikte standart uygulanan dozlarda nadiren iken uygulama sonrasında bölgesel yan etkiler olarak hedef kasta ve komşu hedef olmayan kaslarda zayıflık, atrofi görülebilmektedir (12–14).

Hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalarda kas atrofisinin değerlendirilmesi genellikle enjeksiyon sonrası dönemde ötenazi sonrası kas kütlesinin tartılmasına dayanmaktadır (15,16). Tek enjeksiyonun uygulandığı bir çok çalışmada enjeksiyon sonrası kas kütlesinde anlamlı kaybın geliştiği belirtilmiştir (15–17). BTX-A enjeksiyonlarının kas üzerindeki etkilerinin zamanla kaybolmasına bağlı olarak tedavi 3-6 aylık aralıklarla tekrarlanarak uygulanmaktadır (10). Giderek artan kullanımı ve tekrarlayan enjeksiyonların kas yapısı üzerine özellikle de uzun dönemde etkilerinin bilinmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada tekrarlayan (2 ve 3 kez) BTX-A enjeksiyonlarının kısa ve uzun dönemde kas üzerine olan etkilerini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaçlarla ratların sağ gastroknemius kasına tekrarlayan enjeksiyonlar uygulanmış ve 1.ve 6. ayda kas atrofisi, histolojik olarak kasta gelişebilecek değişiklikler ve kas apoptozisi değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İSKELET KASI

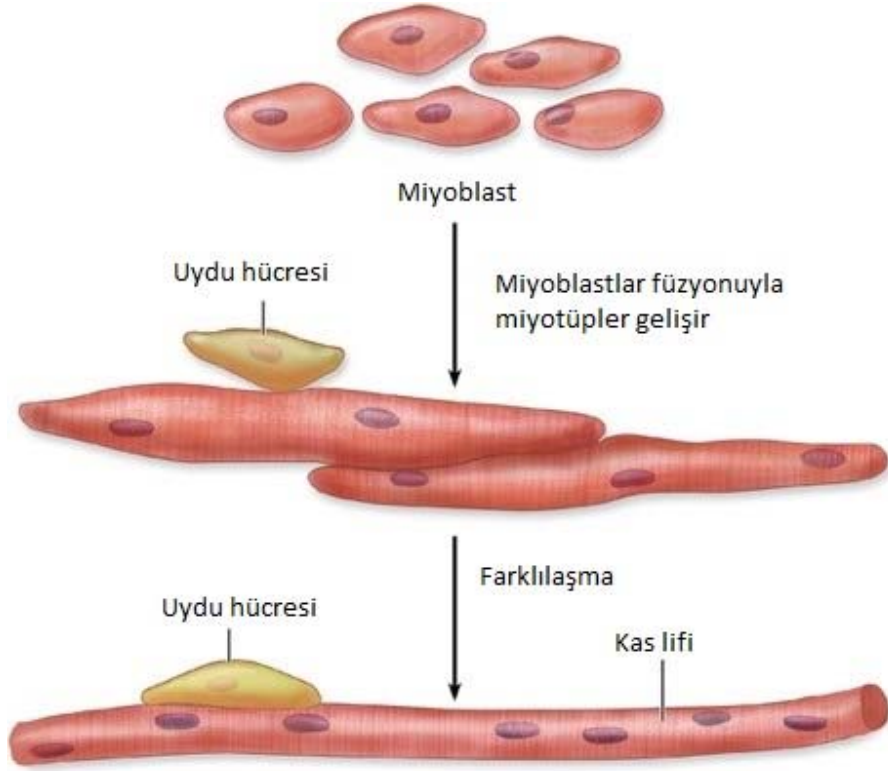
2.1.1. Gelişimi ve Rejenerasyonu

Embriyonel gelişiminin 4. haftasında paraksiyal mezodermden somitler oluşmaktadır (18). Somitlerin dorsal yüzünün iç hücre kitlesinden myotom plakları gelişmektedir (18). Myotom plağında yer alan mezenşimal hücreler de son hedefteki yerlerine göç ederken bir seri değişime uğrayıp ve miyoblastlara dönüşürler (18).

Erken embriyonik dönemde miyoblastlar myoblast determination protein 1 (MyoD) transkripsiyon faktörü eksprese ederler (18). Diğer miyojenik regülatör faktörlerle birlikte MyoD transkripsiyon faktörü tüm iskelet kaslarının farklılaşmasında önemli role sahiptir (18). İskelet kası gelişimindeki denge myostatin sentezine neden olan miyostatin geninin negatif regülatör ekspresyonu ile gerçekleşmektedir (18).

Gelişen iskelet kası 2 tip miyoblast içermektedir:

- Erken miyoblastlar; primer miyotüplerin gelişiminden sorumludur. Primer miyotüpler tendon ve gelişen kas arasında uzanan zincir benzeri yapılardır (18). Bunlar, erken miyoblastların yan yana füzyonuyla oluşurlar (18). Işık mikroskopunda primer miyotüplerin miyofilamanlarca sarıldığı ve çok sayıda zincir tarzında düzenlenmiş merkezi yerleşimli çekirdeğinin bulunmasıyla dikkat çekerler (18).
- Geç miyoblastlar; gelişen kasın sinir terminalleriyle direkt ilişki kurduğu zonda sekonder miyotüplerin oluşumuna neden olurlar (18). Sekonder miyotüpler, arda arda dizilen miyoblastların uzunluğu boyunca devam ederler (18). Sekonder miyotüpler; küçük çapları, geniş aralıklı nükleus dizilimleri ve miyofilamanlarında ki artışla karakterizedir (Şekil 1) (18).



Şekil 1: Miyoblast iskelet kas lifine farklılaşması (19)

2.1.1.1. Rejenerasyon

Erişkinde iskelet kası lifleri sarkolemma ile eksternal lamina arasında yerleşmiş, küçük ve tek çekirdekli uydu hücreler içerirler (18). Uydu hücreler iskelet kaslarının rejenerasyonundan sorumlu olup sınırlı yeteneklere sahiptirler (18).

Olgun kas lifleri bölünemezler (18). Egzersiz ve ağırlık kaldırma aktivitelerine cevap olarak gelişen kas kitlesinde artış hücre bölünmesi (hiperplazi) ile değil hipertrofi ile sağlanır (18). Egzersiz ve ağırlık kaldırma gibi aktiviteler sessiz bekleyen kök hücre özelliğindeki uydu hücreler üzerinde proliferatif etki oluştururlar (18). Bir kısmı bölünerek miyoblastlara dönüşürler, miyoblastlarda mevcut kas lifleriyle kaynaşarak çaplarının artışına böylelikle kasta hipertrofiye yol açarlar (18). Yaralanma sonrasında da bazı uydu hücreleri aktive olarak, yeniden hücre döngüsüne girerek, miyojenik regülatör faktörleri eksprese ederek çoğalıp yeni miyoblastlara dönüşürler (18). Yaralanma sonrası onarım için eksternal laminanın

sağlam olması önemlidir (18). Eksternal laminada bozulma varsa yara alanı fibroblastlarca onarılır ve iyileşme sonrasında geride skar dokusu kalır (18).

2.1.2. İskelet Kası Hücreleri

İskelet kaslarında her bir kas hücresi, gelişim sırasında miyoblast olarak adlandırılan çok sayıda küçük hücrenin füzyonu ile oluştuğundan çok çekirdekli dirler (18). Bu nedenle iskelet kası hücresi terimi yerine kas lifi terimi kullanılmaktadır (18). Çekirdekler sitoplazma içinde (kas hücre sitoplazması), sarkolemmanın (kas hücresi plazma membranı) altında periferik yerleşimlidirler (18). Sarkoplazma içinde mitokondri, sarkoplazmik retikulum (düz endoplazmik retikulum), myoglobin ve glikojen tanecikleri bol miktarda gözlenir (18). Kas lifinin sarkoplazması da kas lifinin uzunluğuna paralel dizilim gösteren miyofibriller tarafından kaplanmıştır (18).

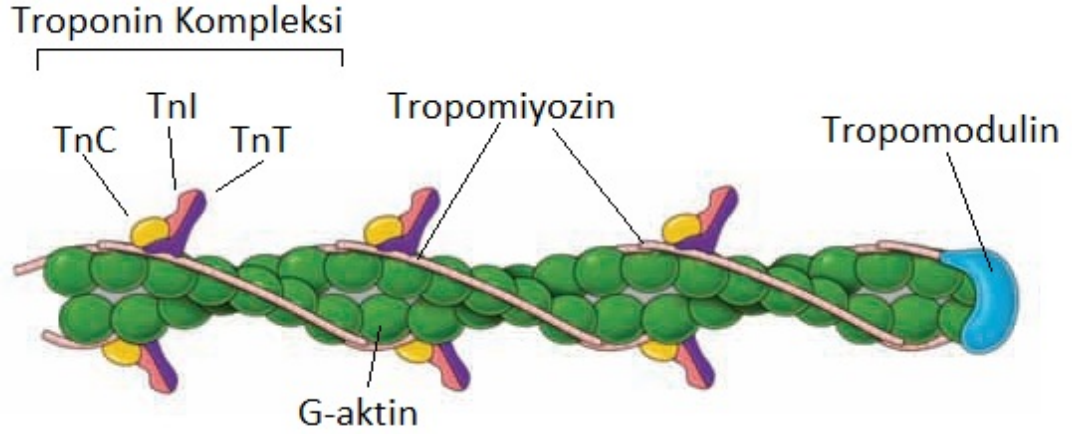
2.1.2.1. Miyofibriller ve Miyofilamanlar

Miyofibriller; miyofilaman demetlerinin düzenlenmesiyle oluşurlar (18). Büyüklük ve kimyasal yapısı farklı ince (aktin) filamanlar ve kalın (miyozin) iki tip miyofilaman ayırt edilir (18).

a. İnce filamanlar; aktin, tropomiyozin ve troponin olmak üzere üç farklı protein içerir (Şekil 2) (18).

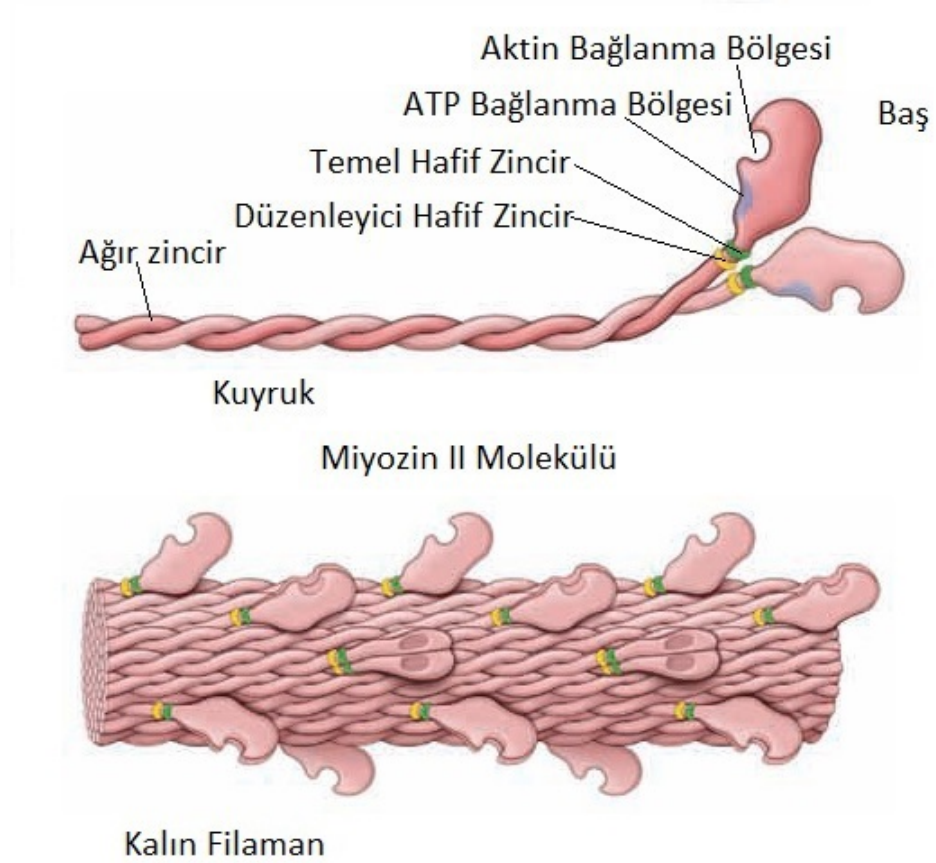
- Fibriler Aktin (F-Aktin): Globuler aktin (G-aktin) molekülleri ardı ardına dizilerek fibriler aktini (F-aktin) oluştururlar (18). Her bir G-aktin miyozin için bağlanma noktasına sahiptir (18). İki fibriler aktin bir sarmal oluşturur (18).
- Tropomiyozin: İki polipeptid zincirinden oluşan çift heliks yapısındadır (18). Aktin filamanı sarmallarındaki oluklara yerleşir (18).
- Troponin kompleksi: Tropomiyozine bağlanmış olup üç alt birimden oluşur (18).
- ✓ Troponin C (TnC): Ca^{++} iyonlarına bağlanarak kontraksiyonu başlatır.

- ✓ Troponin T (TnT): Troponin kompleksini tropomiyozine bağlar.
- ✓ Troponin I (TnI): Aktine bağlanarak aktin-miyozin etkileşimini engeller.



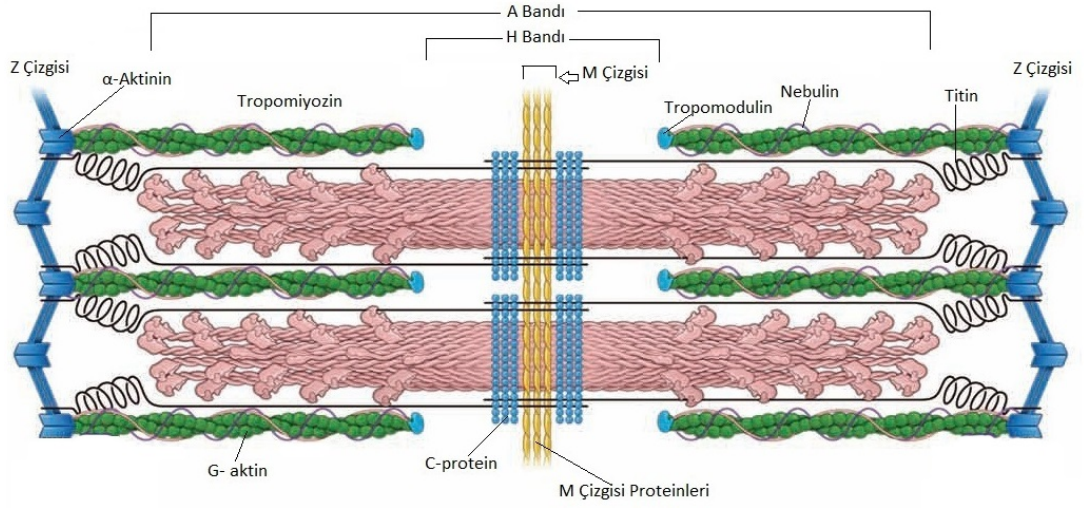
Şekil 2: İnce filaman (20)

b. Kalın Filamanlar; Miyozin II molekülünden oluşur (18). Her bir miyozin II molekülünde iki ağır, dört hafif zincir bulunur (18). Her bir ağır zincir globüler bir baş kısmına sahiptir (18). Her bir başa iki farklı hafif zincir bağlanır. Bunlar esas hafif zincir ve düzenleyici hafif zincir olarak isimlendirilir (18). Molekülün baş kısmı aktin bağlayıcı bölge ve ATP bağlayıcı bölge olmak üzere iki bağlanma noktası içerir (18). Miyozin II molekülleri kuyruk kuyruğa yığınlar oluşturarak bi-polar düzenlenmiş olan kalın filamanları meydana getirirler (Şekil 3) (18).

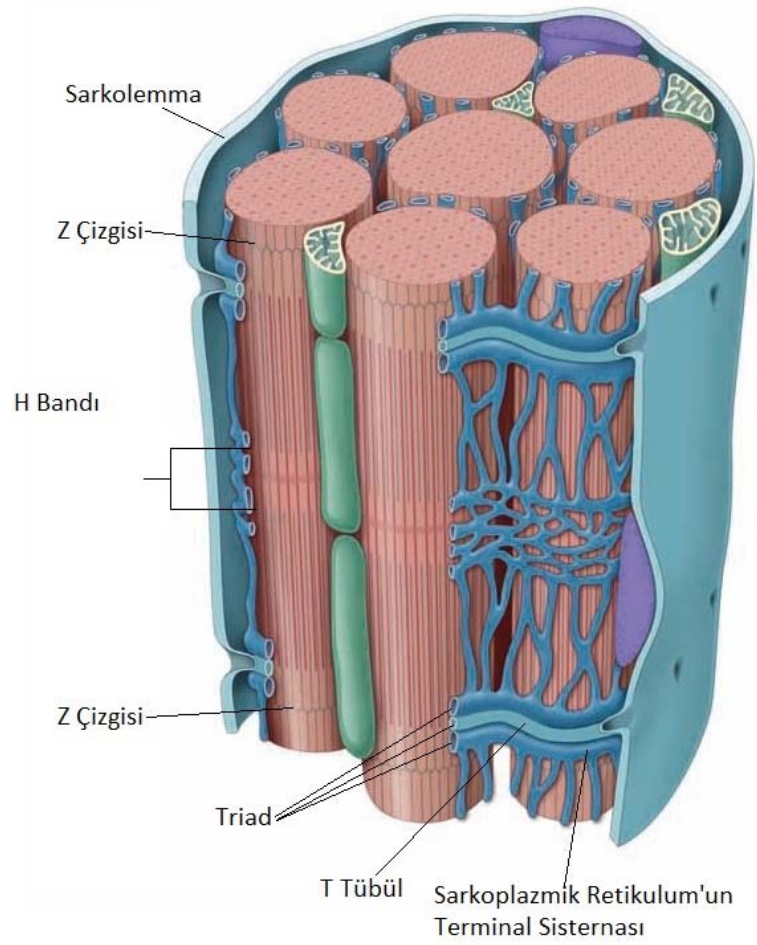


Şekil 3: Miyozin II molekülü ve Kalın filaman (20)

c. Miyofilamanların organizasyonu: İnce ve kalın miyofilamanlar birbirlerine paralel demetler şeklinde özel bir yapılanma göstererek miyofibrilleri oluştururlar (Şekil 4 ve Şekil 5) (18). Miyofibriller sarkoplazmik retikulum (SER) ile çevrelenmiş olup, mitokondriler ve glikojen depoları miyofibrillerin arasına yerleşmiştirler (18).



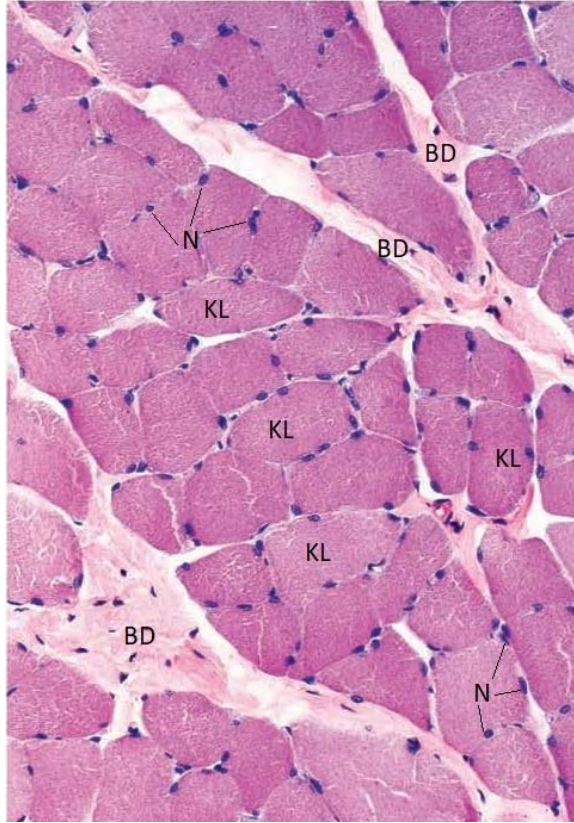
Şekil 4: İskelet kasının elektron mikrofrafisi ve bir sarkomere karşılık gelen moleküler yapısı (20)



Şekil 5: Çizgili kas lifi organizasyon şeması (20)

2.1.2.1.2. Işıık Mikroskobu İncelemelerinde Kas Liflerinin Morfolojisi

Enine kesit: Işıık mikroskobunda kas liflerinin enine kesitlerinde kas lifinin içi, miyofibrillerin enine kesiti olan küçük, koyu boyanmış noktasal yapılarla dolu olarak gözlenir (18,20). Sarkolemmmanın hemen altında bir veya daha fazla sayıda çekirdek enine kesitte görülebileceğı gibi çekirdek içermeyen enine kesitler de olabilir (Şekil 6) (18,20).

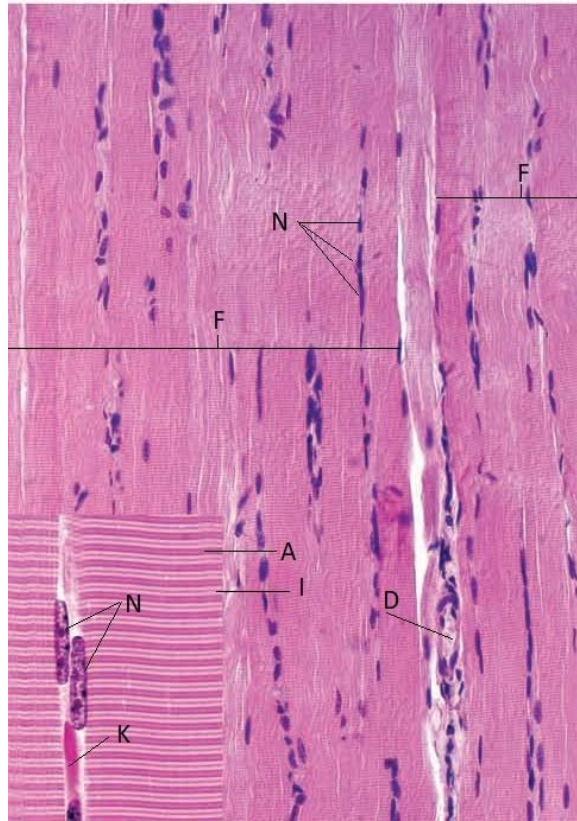


Şekil 6: İnsan iskelet kası enine kesitte kas lifleri. Hematoksilen – Eozin, x256. N: Kas Çekirdeğı, KL: Kas lifi, BD: Bağ dokusu (20)

Longitudinal kesit: Işıık mikroskobu ve elektron mikroskobu incelemelerinde her bir miyofibrilin uzun ekseni boyunca birbirini takip eden batların çizgilenme oluşturduğu izlenir (18,20). Histolojik olarak boyalı kesitlerde koyu bantlar kuvvetli boyanırken açık segmentler zayıf boyanır. Koyu bantlar bazik, açık bantlar asidik boyalarla boyanırlar (18,20). Çizgilenme özellikle polarizasyon

mikroskobunda daha iyi gözlenir (20). Koyu boyanan bant anizotrop özellikte olduğundan ışığı çift kırar ve A bandı denir (18,20). Açık boyanan bant ise izotrop (ışığı tek kırar) özellikte olduğundan I bandı olarak adlandırılır (Şekil 7) (18). Z çizgisi; I bandının ortasında görülen koyu çizgi, H bandı; A bandının ortasında görülen daha açık bölge, M çizgisi; H bandının ortasındaki koyu çizgi olarak tanımlanır (18).

Sarkomer iki Z çizgisi arasında kalan kısımdır ve kasılma birimidir (18). Bir tam A bandı ve iki yarım I bandından oluşur (18). Sarkomerler uzunlamasına art arda Z çizgileri ile birbirine bağlanarak miyofibrilleri oluşturur (18).

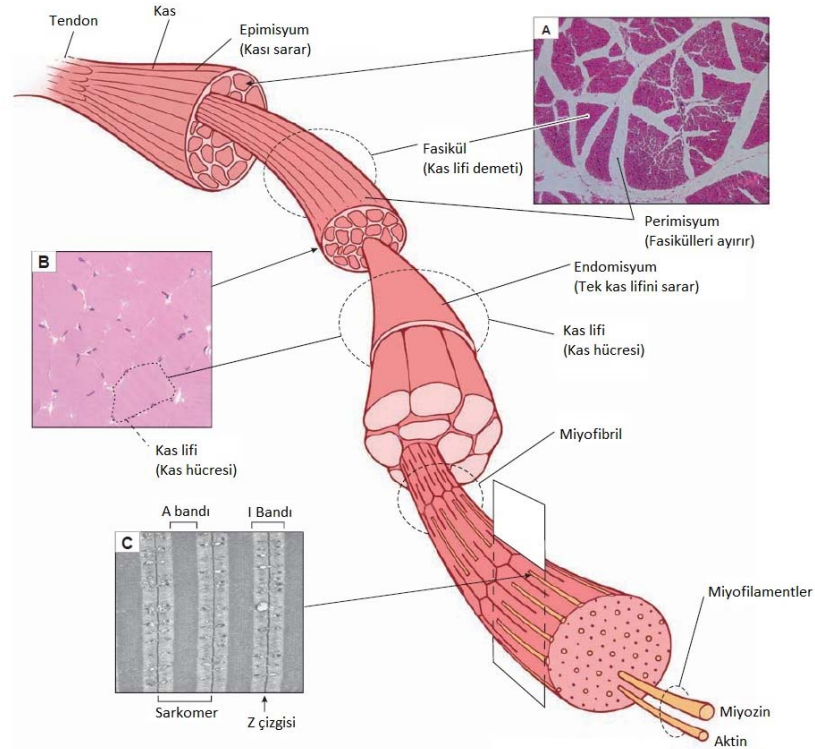


Şekil 7: İnsan iskelet kası boyuna kesitte kas lifleri. Hematoksilen – Eozin, x256, küçük resim x700. N: Kas Çekirdeği, F: Kas Fasikülü, K: Kapiller, D: Kan damarları, A: A Bandı, I: I Bandı (20)

2.1.3. İskelet Kasının Organizasyonu

Kas uzunluğunca paralel düzenlenen iskelet kası lifleri (kas hücreleri) birleşerek fasikülleri, fasiküller ise bir araya gelerek kasın bütünü oluştururlar (20). Hem bağımsız kas lifleri hem de kas lifi demetlerini çevreleyen bağ dokusu kılıfları güç aktarımı için önemlidir (20). Kasların sonunda bağ dokusu kılıfları tendonu oluşturarak kasın kemiğe tutmasını sağlarlar. Bağ dokusu kılıfları kas lifleriyle ilişkisine göre de özel isim alır (Şekil 8) (20). Bunlar sırasıyla şu şekilde isimlendirilir;

- Endomisyum: Bir tek kas lifini sarıp, retikulum liflerinden ve az sayıda kollajen liften oluşurlar. Küçük çaplı kan damarları ve ince akson uzantıları bulundurlar (20).
- Perimisyum: Bir kas demetini (fasikülünü) sarıp, tip 1 ve tip 3 kollajen lifleri içerirler. Kan damarları sinir dallanmaları içerirler (20).
- Epimisyum: Kası dıştan saran sıkı bağ dokusu yapısında kılıftır. Ana damar ve sinirleri barındırır (20).



Şekil 8: İskelet kası organizasyonu.

A ve B; ışık mikroskobu kas lifi kesiti, C; elektron mikroskobu kas lifi kesiti (21)

2.2. BOTULİNUM TOKSİN

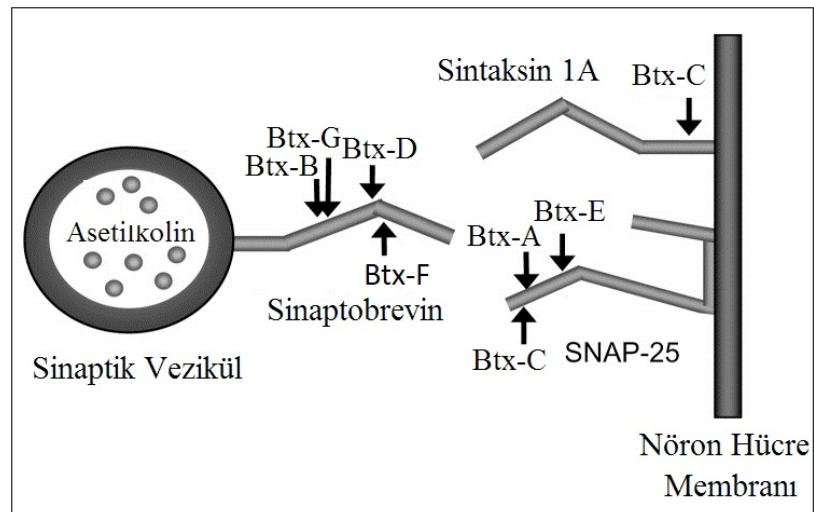
Botulinum toksini toprakta, suda, bitkilerde, hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan anaerobik, gram-pozitif, spor oluşturan çubuk şekilli Clostridium botulinum bakterisi tarafından üretilmektedir (22,23). Güçlü bir nörotoksin olup insanlarda, hayvanlarda flask paraliziye neden olmaktadır (6,7,22). Toksinine bağlı zehirlenme vakaları gıda kaynaklı botulizm şeklinde olabildiği gibi, infantil ve yara yerinden kaynaklanan botulizm tabloları da vardır (23). Yedi ana serotipi (A, B, C, D, E, F ve G) bulunmaktadır (8). Birçok yeni BTX kodlayan genin keşfedilmesiyle yeni BTX serotipleri bulunmuştur (8). Farklı amino asit dizilerine sahip olan bu serotipler mevcut ana serotiplerin alt tipleri olarak belirtilmiş ve serotipin harfiyle birlikte ardından gelen bir sayıyla adlandırılmışlardır (Örneğin serotip A için BTX-A1, BTX-A2; serotip B için BTX-B1, BTX-B2 v.b) (8). Serotipler içerisindeyse A en güçlü nörotoksin olup bunu B ve F serotipi izlemektedir. İnsanlarda yaygın olarak da A, B ve E serotipleri sistemik botulizm ile ilişkilidir (24). Ülkemizde ve dünyada klinik uygulamalarda çoğunlukla A serotipi kullanılmakla birlikte B serotipi de tedavide kullanılmaktadır (9).

2.2.1. Etki Mekanizması

Tüm Botulinum toksin serotipleri, nöromüsküler kavşakta temel olarak nörotransmitter olan asetilkolin salınımını bloke ederek nöral transmisyonu müdahale eder. İntramüsküler olarak uygulanan botulinum toksini, nöromüsküler kavşakta presinaptik nöronlardan asetilkolin salınımını inhibe eder (25). Botulinum toksini vücutta nöromüsküler kavşakta, otonom gangliyonlarda, postgangliyonik parasempatik sinir uçlarında ve asetilkolin salınımı yapan postgangliyonik sempatik sinir uçlarında olmak üzere dört farklı yerde etkisini göstermektedir (25).

Botulinum toksini etkisini sinir aktivasyonu için gerekli proteinler üzerinden gösterir. İlk olarak nörotransmitter olarak asetilkolini kullanan sinir hücre zarına bağlanır. Toksin bakteriden tek bir zincir olarak salınır, daha sonra kendi proteazları ile bölünerek aktive olur. Polipeptit zinciri, disülfür bağı ile bağlanmış bir ağır (100 kDa) zincir ve bir hafif (50 kDa) zincirden oluşur (26). Ağır zincir seçici ve geri dönüşümsüz olarak presinaptik sinir terminallerine bağlanarak toksin-reseptör

kompleksi oluşturarak toksinin endositoz ile hücreye alınmasını sağlar (7). Vezikül hücrenin içine doğru ilerledikçe ağır zincir tarafından asitleşir ardından hafif zincirin hücre sitoplazmasına geçmesini tetikler (7,26). Hafif zincir hücre sitoplazmanın içine girdikten sonra vezikül füzyonuna aracılık eden ve SNARE (füzyon membran kompleks proteinini) protein ailesinin bir üyesi olan SNAP-25 (sinaptozomal ilişkili protein, 25kDa) hücre zarı proteinine bağlanır. Bu yolla veziküllerin hücre içinden hücre zarına bağlanmasını önler dolayısıyla hücrenin nörotransmitter vezikülleri serbest bırakmasını engellediği için nöron sinyalini durdurur (7,27,28). Farklı botulinum toksin serotipleri SNARE protein ailesinin farklı üyelerini hedef alarak etki göstermektedir (Şekil 9) (29). A, C ve E serotipleri SNAP-25'e bağlanarak, B, D, F ve G serotipleri sinaptobrevin 2'ye (VAMP 2 olarak da adlandırılır) bağlanarak etki gösterir (29). Serotiplerden sadece C spesifik olarak sintaksin'e bağlanmakla birlikte ayrıca SNAP-25'e bağlanarak (birden fazla bölgeye bağlanarak) etkisini göstermektedir (29). Sinaptik vezikül üzerindeki sinaptobrevin, vezikülün hücre içinden hücre zarına bağlanması (füzyonunu) için nöronal zar üzerindeki Sintaksin ve SNAP-25 ile etkileşime girmelidir (29). Botulinum nörotoksin serotipleri bu 3 protein üzerinde spesifik bölgelere peptit bağlarıyla bağlanır (29). Dolayısıyla bu proteinlerden herhangi birinin hedef olması vezikül zarının hücre zarına bağlanmasını önleyerek sinir impuls iletimini önler (29). Bu blokaj, toksin aktivitesini kaybettiğinde ve SNARE proteinleri etkilenen hücre tarafından rejenere edildiğinde yavaşça tersine çevrilir (7).



Şekil 9: Botulinum toksini serotiplerine göre hücre içi etki mekanizması (29)

SNAP: Sinaptozomal İlişkili Protein, Btx: botulinum toksin

Tedavide kullanılan botulinum toksin dozları biyolojik aktivite birimi olarak ünite cinsinden ifade edilmektedir. Bir ünite birim botulinum toksini dişi İsviçre-Webster farelerinde hesaplanan medyan intraperitoneyal öldürücü doza (LD50) karşılık gelmektedir (30). Toksinin etkileri sinaptozomal sürecine bağlı olarak 24-72 saat içinde ortaya çıkar, 4-6. haftalarda maksimum düzeye ulaşır, genellikle de bu etkileri 3-4 ay içerisinde geri döner (9,10).

2.2.2. İmmünolojik Etkileri

Botulinum toksin ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %5-15'inde nötralize edici antikorların geliştiği buna bağlı olarak da ilaca sekonder cevapsızlık bildirilmiştir (31). Tek seansta 200 ünite üzerindeki uygulamalarla, bir ay içinde tekrarlanan enjeksiyonların nötralizan antikor gelişimini artırdığı bulunmuştur (32). Son yıllarda preparatların (BCB 2024) azaltılmış protein yükü sayesinde immünojenitenin azaldığı dolayısıyla nötralizan antikor gelişime riskinin de azaldığı belirtilmiştir, ancak bu durum klinik deneylerle kanıtlanmamıştır (32).

2.2.3. Kullanılan Formları

Botulinum toksinin klinik kullanımına yönelik piyasada serotip A olarak Botox® (onabotulinumtoksinA), Dysport®/Azzalure® (abobotulinumtoxinA), Xeomin® / Bocouture® (incobotulinumtoxinA), Jeuveau® (prabotulinumtoxinA-xvfs), Serotip B olarak ise Myobloc® / Neurobloc® (rimabotulinumtoxinB) bulunmaktadır. Botox® (Allergan, Irvine, Calif) 1991 yılında şaşılık ve blefarospazm tedavisi üzere FDA onayı alarak Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanıma sürülen ilk botulinum toksin preparatıdır. 2009 yılında da Dysport® (Ipsen, Speywood, United Kingdom) glabellar kırışıklık ve servikal distoni tedavisi üzerine FDA onayı alarak kullanılmaya başlanmıştır.

Botulinum toksin preparatları serotip olarak aynı olmalarına rağmen dozaj ve etkileri açısından farklılıklar göstermektedir. Farklı ticari BTX-A preparatlarının dozları eşdeğer olarak kabul edilmemektedir. Daha eski yıllarda bir ünite BOTOX®, yaklaşık 4 ünite Dysport®'la eşit bir potansiyele sahip olduğuna dair bazı yayınlar

bulunmakla birlikte farklı preparatların dozları eşdeğer değildir. Bu farklılığın toksinin; bakteri suşu, hazırlanması, diffüzyon farkı, ve potensi ile ilgili olabileceği belirtilmiştir (33).

2.2.4. Klinik Uygulama Alanları

Botulinum toksin tip-A tedavi amacıyla ilk olarak 1980 yılında şaşılık tedavisinde kullanılmıştır (34). Serebral palsi tanılı çocuklarda kullanımı ile ilgili ilk yayınlar 1993 yılına dayanmaktadır (35). BTX-A özellikle şaşılık, fokal distoniler, spastisitenin tedavisinde önemli rol oynamaktadır (34–36). Ayrıca baş ağrıları, hipersalivasyon, nörojenik mesane, hiperhidroz, akalazya ve cerrahi tedaviye alternatif olarak kronik anal fissürlerin tedavisi gibi geniş kullanım alanı da bulunmaktadır (37–41). 2002 yılında Onabotulinum toksinin yüz kırışıklıklarında kozmetik amaçlı uygulamalara yönelik FDA onayı almasıyla birlikte son yıllarda kullanımı hızla artmıştır (42).

2.2.5. Yan Etkileri

Botulinum toksin uygulamalarının güvenli olduğu kabul edilmekle birlikte, kullanımına bağlı yan etkiler gelişebilmektedir (3,4,10,11,43). Enjeksiyonlar genellikle iyi tolere edilmektedir (44). Yan etkiler doğrudan kasta flask paraliziye bağlı kas güçsüzlüğü ile sınırlı olmayıp enjeksiyon bölgesinde ağrı, ödem, eritem, geçici uyuşma gibi etkilerle birlikte sistemik olarak da baş ağrısı, halsizlik, hafif bulantı, grip benzeri semptomlar, alerjik reaksiyonlar da görülebilmektedir (43,45). Toksinin etkisi, enjeksiyon bölgesinde görülmekle birlikte, komşu kaslara ve diğer dokulara yayılması mümkündür (45,46). En korkulan yan etkisi botulizm tablosunun gelişmesi ve geçici olarak istenmeyen kasların zayıflığı ile ilgili yan etkilerdir (solunum kasları zayıflığı vb.) (45,46). Uygulama alanı dışındaki uzak kaslarda görülen etkilenme muhtemelen toksinin vasküler yolla yayılması ile ilişkilendirilmekte ve sık görülmemektedir (47,48). Sistemik yan etkiler arasında grip benzeri semptomlar ve nadiren brakiyal pleksopati bildirilmekle birlikte bu etkilerin immün aracılıklı olabileceği de düşünülmektedir (49).

1997-2006 yılları arasında FDA yan etkiler veri tabanındaki incelemelerde Botox® ve Myobloc®'a yönelik 16 ölüm (4'ü 18 yaş altı çocuk olmak üzere) ile birlikte 180 yan etki vakasının görüldüğü saptanmıştır (50,51). FDA'nın yaptığı incelemeler sonrası BTX-A ürünleri ile ilişkili çoğu yan etkinin spastisite tedavisinde endikasyon dışı ve yüksek dozda enjeksiyon uygulanan serebral palsi hastası çocuklarda meydana gelmiş olduğu ve ciddi yan etki görülen çocukların hastanede yatarak tedavi gördükleri ve bazılarının da ölümle sonuçlandığını bildirilmiştir (52). Bununla birlikte, yetişkinlerde de ciddi yan etkilerin geliştiği açıklanmıştır (52). Yetişkin vakaların çoğunda ciddi yan etkilerin servikal distonili olgularda ya da endikasyon dışı spastisite tedavisi için kullanıldığında geliştiği bazı hastaların hastanede beslenme tüpü veya ventilatöre ihtiyaç duyduğu bazılarının da ölümle sonuçlandığını bildirilmiştir (52). Ancak ölüm olaylarının nedeninin altta yatan hastalığa mı yoksa BTX-A uygulamalarına mı bağlı olduğunun belirlenmesinin mümkün olmadığı açıklanmıştır (52). 30 Nisan 2009'da FDA toksinin etkilerinin enjeksiyon bölgesinin çok ötesine yayıldığında nadir fakat hayatı tehdit eden yan etkiler geliştirebileceği yönünde uyarıcı olarak ürünlerin üzerinde kara kutu (black box) etiketlemesinin gerekli olduğunu açıklamıştır (52).

2.3. BOTULİNUM TOKSİNİN KAS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

2.3.1 Kas Atrofisi

Botulinum toksin tip-A uygulamaları ile kasta flask paralizi gelişmekte ve bu etki ile hastalarda klinik bulgular ve fonksiyonel olarak olumlu etki sağlanırken, kasta yapısal değişiklikler, atrofi vb. etkileri olduğu da birçok çalışmada bildirilmiştir (53–58). Özellikle uygulamaların uzun dönemde oluşturabileceği etkilerle ilgili endişeler halen bulunmaktadır (59–62).

Kas üzerindeki etkilerle ilgili veriler daha çok hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda enjeksiyon sonrası dönemde ötenaziyi takiben kas kütlesinin ağırlık ölçümüne ve kas dokusu histolojik incelemelerine dayanmaktadır (15–17). Hayvan modelleri üzerinde tek BTX-A enjeksiyonun değerlendirildiği çalışmalarda enjeksiyon sonrası kas atrofisinin %30 – 60 oranında geliştiği bulunmuştur (15–17). Gelişen bu atrofi düzeyininse dozla ilişkili olduğu saptanmıştır (15,63). Uzun

dönemde atrofinin geri dönüşünün tam olmadığı ve değişik sürelerde gelişebildiği ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır (15–17,63). Tekrarlayan BTX-A enjeksiyonların değerlendirildiği bir hayvan çalışmasında atrofinin 6.ayda %40 düzeyinde olduğu saptanmıştır (64). Ancak bir başka çalışmada ise atrofinin düzeldiği belirtilmiştir (65).

İnsanlarda kas atrofisinin değerlendirildiği çalışmalar kasların manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve ultrasonografi (USG) ile ilgili değerlendirmelere dayanmaktadır. Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada 12. ayda kas atrofisinin devam ettiği görüntüleme yöntemleri ile gösterilmiştir (53). Serebral palsi tanılı hastalarda tekrarlayan BTX-A enjeksiyonların değerlendirildiği bir çalışmada USG ile yapılan ölçümlerde 12. ayda atrofinin devam ettiği ancak tek ya da tekrarlayan enjeksiyonlar arasında farklılık saptanmamıştır (57).

2.3.2 Kas Yapısal Hasarının Belirlenmesi

Kas yapısal hasarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar kas liflerinin ışık ve elektron mikroskopi ile değerlendirildiği çalışmalara dayanmaktadır (16,17,53,64,66–68). Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda tek BTX-A enjeksiyonu sonrası histolojik incelemelerde kas kontraktıl elemanlarında kayıp olduğu saptanmıştır (17,67,68). Elektron mikroskop çalışmalarında sarkomerlerin yapısal Z-çizgilerinde düzensizlik olduğu ve kas kontraktıl elemanlarında değişikliklerin saptandığı, bu değişikliklerin 6 ay sonra ise düzeldiği görülmüştür (64).

İnsanlar üzerinde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tek BTX-A enjeksiyonun değerlendirildiği bir çalışmada 6. ayda kas yapısında Z-çizgilerinde düzensizlik ve kontraktıl materyalde değişikliklerin olduğu saptanırken 12. ayda bu bulguların düzeldiği görülmüş (66). Sağlıklı gönüllülerin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise Z-çizgilerinde düzensizlik ve kontraktıl materyalde ki değişikliklerin 12. ayda devam ettiğine yer verilmiştir (53).

Botulinum toksin tip A enjeksiyonlarına bağlı olarak kasta atrofi ve yapısal değişiklikler gösterilmiş olmakla birlikte bu değişikliklerin süresi, şiddeti, uzun dönemde bu etkilerin geri dönüşü açısından sonuçlar henüz kesin olarak bilinmemektedir. İnsan ve deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar farklı kriterler ve

protokollerle gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle çalışmalardan elde edilen veriler oldukça heterojen olup, sonuçlar arasında çelişkiler bulunmaktadır (62).

Botulinum toksin tip A enjeksiyonlarının etkin ve güvenilir olduğu ve kasta yapısal değişiklikler, kalıcı atrofi, kas kasılma proteinlerinde değişimler yapabileceği bilinmekle birlikte bu etkilerin geri dönüşü açısından kesin bir sonuca varılamamıştır. Klinik uygulamalarda hastalara BTX-A uygulamaları 3'er aylık aralıklarla tekrarlayan enjeksiyonlar olarak uygulanmaktadır (10). Dolayısıyla tekrarlayan enjeksiyonların kas yapısında özellikle uzun dönemde etkilerinin bilinmesi önem taşımaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada, tek ve tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının kas yapısı üzerinde erken ve geç dönem etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmada tek ve tekrarlayan (2 ve 3 kez) BTX-A enjeksiyonlardan sonra 1. ve 6. aylarda enjeksiyon yapılan kasta; atrofının gelişip gelişmediği, histolojik olarak kasta meydana gelebilecek değişikliklerin ve kasta apoptozisin gelişip gelişmediği incelenecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK UYGUNLUK VE BÜTÇE

Tez araştırma projesi T.C Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından karar no: 2018-3-28 ile bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür. Araştırmada ihtiyaç duyulan mali destek T.C Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP projesi kapsamında sağlanmıştır.

3.2. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında, 42 adet 12 haftalık erkek Wistar rat ile, tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının kas yapısı üzerine etkisinin değerlendirilmesi üzerine yapılmış randomize kontrollü deneysel bir çalışmadır.

3.3. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER VE ÖZELLİKLERİ

Araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı iş birliği ile yürütüldü. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarına 42 adet 12 haftalık erkek Wistar rat alındı. Çalışma 01.06.2018 – 01.09.2019 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Ratlar her bir kafeste 6 rat olmak üzere 58x38x20 cm boyutunda kafeslerde, 12 saat gündüz/12 saat gece döngüsünde, 22±2 °C, standart sıçan besini ve su ile ad libitum (kısıtlama olmaksızın) beslendi (Şekil 10). Deney gruplarına ait kas dokusu örneklerinde yapılan histolojik incelemeler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.



Şekil 10: Deney gerçekleştirilen Wistar rat grupları

3.4. ARAŞTIRMANIN TASARIMI

Araştırmada 42 adet Wistar rat her grupta 6 rat olmak üzere aşağıdaki gibi 7 gruba ayrıldı. Gruplar;

1. grup: Kontrol grubu 0. günde serum fizyolojik enjeksiyonunu (vehicle control) takiben 6. ayda ötenazisi
2. grup: 0. günde BTX-A enjeksiyonunu takiben 1. ayda ötenazisi
3. grup: 0. günde BTX-A enjeksiyonunu takiben 6. ayda ötenazisi
4. grup: 0. günde ve 3. ayda BTX-A enjeksiyonu, son enjeksiyonu takiben 1. ayda ötenazisi
5. grup: 0. günde ve 3. ayda BTX-A enjeksiyonu, son enjeksiyonu takiben 6. ayda ötenazisi
6. grup: 0. günde, 3. ayda, 6. ayda BTX-A enjeksiyonu, son enjeksiyonu takiben 1. ayda ötenazisi
7. grup: 0. günde, 3. ayda, 6. ayda BTX-A enjeksiyonu, son enjeksiyonu takiben 6. ayda ötenazisi gerçekleştirildi.

3.5. ENJEKSİYON PROTOKOLÜ

Botulinum toksin tip-A enjeksiyonu planlanan ratların sağ gastroknemius kaslarına intramüsküler olarak toplamda 0,15 cc/kg serum fizyolojikle sulandırılan 3 U/kg BTX-A (Botox®, Allergan Inc.) enjeksiyonu yapıldı (1 flakon 100 U Botox® 5 cc serum fizyolojikle sulandırıldı). Toplam doz kas dokusunda diffüzyonun artırılması açısından ikiye bölündü. Sağ gastroknemius kasının medial ve lateral alanlarının orta hattı palpasyonla ve görsel olarak belirlendi. Belirlenen bu 2 bölgeye orta hatta kas dokusunun en belirgin olduğu alanlara Hamilton® 100 µl enjektörüyle toplam doz ikiye bölünerek enjeksiyonlar gerçekleştirildi (Şekil 11).

Grup 1'deki ratlara kontrol grubu olarak 0,15 cc/kg serum fizyolojik enjeksiyonu sağ gastroknemius kasına intramüsküler olarak deney başlangıcında gerçekleştirildi. Enjekte edilen serum fizyolojik'in toplam hacmi, toplam BTX-A hacmiyle aynıydı. Grup 2 ve Grup 3'deki ratlara tek seferlik BTX-A enjeksiyonu uygulanırken, Grup 4 ve Grup 5'deki ratlara başlangıçta ve 3. ayda 2 kez tekrarlayan BTX-A enjeksiyonu, Grup 6 ve Grup 7'deki ratlara ise başlangıçta, 3. ayda ve 6. ayda da olmak üzere toplam 3 kez tekrarlayan BTX-A enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 11: Wistar rat enjeksiyon uygulaması

3.6. ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNDE KULLANILAN DEĞERLENDİRME PARAMETRELERİ

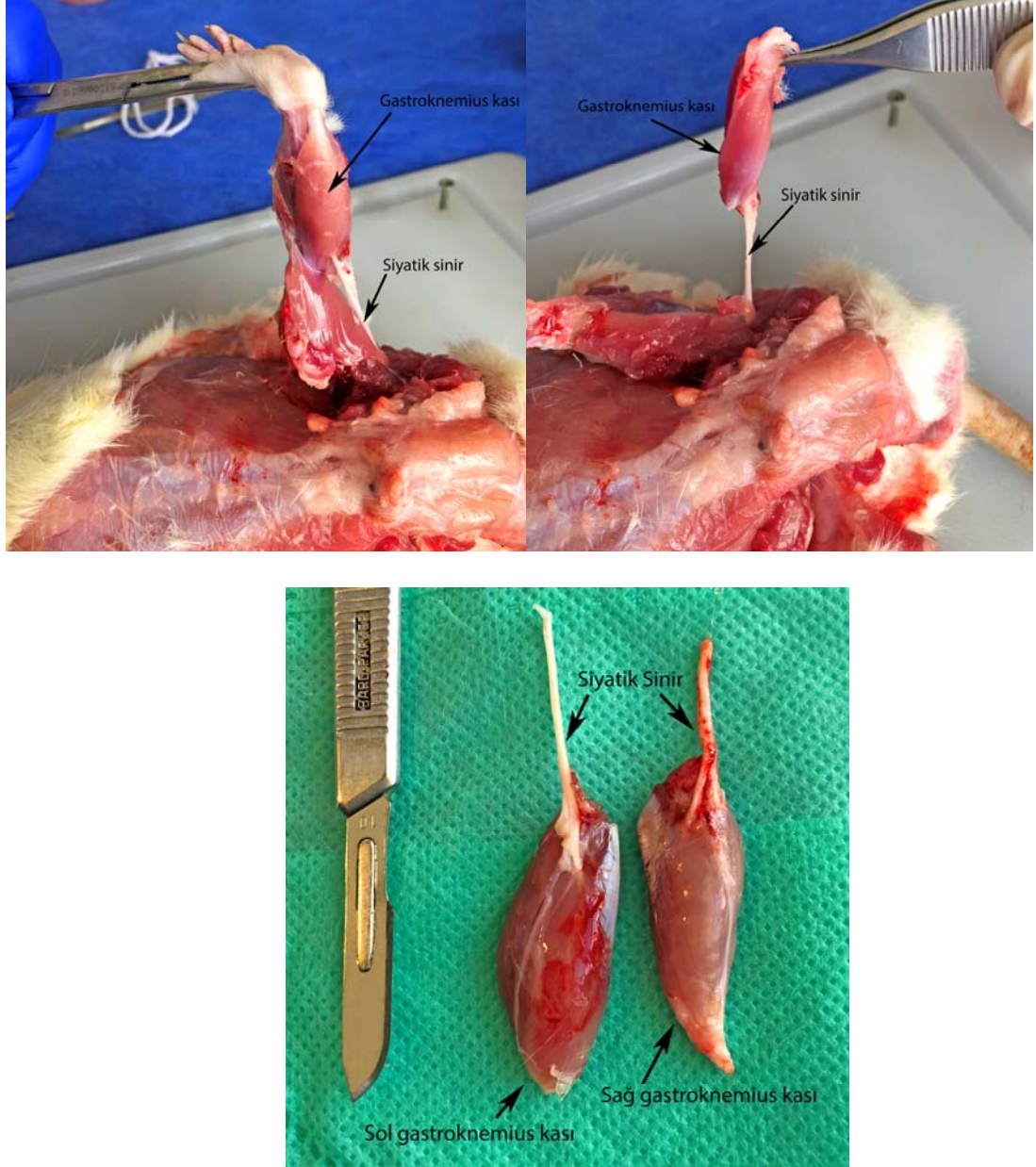
Araştırma süresince ratların ağırlıkları aylık olarak tartıldı. Ayrıca enjeksiyon ve ötenazi öncesi ağırlık ölçümleri yapıldı. Enjeksiyon sonrası ilk hafta her gün, sonrasında ise haftada bir sağlık durumlarında oluşabilecek değişikliklerin saptanmasına yönelik gözlemler yapıldı. Bu amaçla enjeksiyon yapılan bölgede akıntı, kızarıklık, şişme gibi enfeksiyon bulguları yanısıra ayrıca genel güçsüzlük, davranış ve aktivite değişimi, postür kontrolü, dispne, yürüme güçlüğü, günlük gıda ve su tüketiminin değerlendirilmesine yönelik değerlendirmeler yapıldı.

3.7. KAS DOKUSUNUN ALINMASI

Araştırmada ratların sağ gastroknemius kasının incelenmesine yönelik 1, 3, 5 ve 7. gruplardaki ratlar son enjeksiyonları takiben 6. ayda, 2, 4 ve 6. gruplardaki ratlara ise son enjeksiyonları takiben 1. ayda ötenazi yapıldı. Ötenazi için Ketamin (360 mg/kg) + Xylazin (40mg/kg) kombinasyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi. Ötenaziyi takiben sağ gastroknemius kası çevre dokulardan dikkatlice ayrıldı ve kas dokusunun hassas tartıda ağırlık ölçümü yapıldı (Şekil 12). Ratların sağ gastroknemius ağırlığı vücut ağırlığına yüzdeleri hesaplandı.



Şekil 12: Wistar rat ötenazi sonrası gastroknemius kasının çevre dokulardan eksplorasyonu



Şekil 13: Wistar rat gastroknemius kasının ayrılması

3.8. HİSTOLOJİK İNCELEMELER

3.8.1. Işık Mikroskobu (IM) İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar

Deney gruplarına ait kas dokusu örneklerinde yapılan histolojik incelemeler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Doku örnekleri tespit amacıyla %10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonunda 72 saat fikse edildi. Fikse olan doku örnekleri akan çeşme suyu altında

yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla sırasıyla %75, %80, %96 ve %100 olacak şekilde dereceli alkollerden geçirildi. Dokuların şeffaflaştırılması için ksilene alınan örnekler saydamlaştıktan sonra 60°C'lik etüvde sıvı parafınle 3 saat inkübe edildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2125RT) ile 5 µm kalınlığında kesitler lam üzerine alındı ve ışık mikroskobu incelemesi için Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin boyaması için gece boyunca etüvde bekletilen kesitler, ksilene alınarak deparafinize edildi. Deparafinizasyonu takiben kesitler sırasıyla %100, %96 ve %75'lik dereceli alkollerden geçirilerek distile suya alındı ve hidrasyon işlemi tamamlandı. Kesitler hematoksin boyası ile iki dakika boyandı, sonrasında çeşme suyuna alınarak artık boyaların dokunun üzerinden uzaklaştırılması sağlandı. İşlemin ardından eozin solüsyonuna alınan kesitler bir dakika boyandıktan sonra yeniden suya alınarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilende 20 dakika bekletildikten sonra entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

Boyanan preparatlardan hazırlanan kesitler AxioScope A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) marka ışık mikroskobunda morfolojik ve histomorfometrik özellikleri açısından değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Gastrokinemius kası için uygulanan histomorfometrik çalışma

Her bir kas dokusu için H-E ile boyanan enine kas kesitlerinden elde edilen örnekler x200 büyütme kullanılarak beş farklı mikroskop alanında ışık mikroskobu ile incelendi ve bu alandaki her bir kas lifinin enine kesit alanı Axiovision bilgisayar programı kullanılarak ölçüldü.

İnfiltrasyon skoru belirlenmesi

Mononükleer hücre infiltrasyonunun şiddetini belirlemek için; aynı rata ait 3 farklı H-E boyalı kesitte x400 büyütmede gözlemlenen mononükleer hücre görülen alanlar sırasıyla 0: normal (%0), 1: hafif (%1-%33), 2: orta (%34-%66) ve 3: şiddetli (%67-%100) olmak üzere değerlendirildi.

Histolojik hasar skoru belirlenmesi

Histolojik hasar skorunu belirlemek için; aynı rata ait 3 farklı H-E boyalı kesitte x400 büyütmede gözlemlenen kas lifleri dejenerasyon ve disorganizasyon bulgularına göre sırasıyla 0: normal (%0), 1: hafif (%1-%33), 2: orta (%34-%66) ve 3: şiddetli (%67-%100) olmak üzere değerlendirildi.

3.8.2. İmmünohistokimya İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar

Rutin histolojik takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömülen kas dokularından mikrotom ile 4 µm kalınlığında elde edilen kesitler poli-L-lizin kaplı lamalar üstüne alındı. Gece boyunca 60°C'lik etüvde tutuldu ve ksilenle deparafinize edildi. Kesitler sırasıyla %100, %96, %75 etanol serisinde hidrasyon işlemine tabi tutuldu ve distile suda yıkandı. Daha sonra kesitler sitrat buffer solüsyonu ile otoklav içinde muamele edilerek formaldehitin kapattığı epitoplara açılması sağlandı. Sitrat buffer içinden alınan kesitler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) Yöntemi

Deney gruplarında apoptotik hücreleri değerlendirmek için TUNEL yöntemi uygulandı. TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, ROCHE) karışımı ile 37°C'de 60 dakika inkübe PBS ile yıkanan dokular Converter-POD ile 37°C'de 30 dakika tutuldu. DAB kromojen (UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) ile oda ısısında pozitif reaksiyon oluşana kadar bekletildi ve reaksiyon oluşuktan sonra distile su ile reaksiyonun devam etmesi engellendi. Harris' Hematoxylin ile 2 dakika zıt boyama uygulandı. Kesitler sırasıyla %75, %96 ve %100 etanol serisinde dehidrasyon işlemini takiben ksilen ile şeffaflandırdıktan sonra entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

TUNEL değerlendirmeleri için Apoptoz İndeksi kullanıldı. İmmünohistokimyasal olarak dokulardaki TUNEL boyama için immunreaktivite gösteren hücreler AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) ışık mikroskobu ile x 40 büyütmede her bir kesitte 5 farklı alanda sayıldı.

Her grubun Apoptozis İndeksi yüzde (%) olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

Apoptozis İndeksi (%) = (TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı / Total hücre sayısı) x100

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tanımlayıcı istatistikler çeyrekler arası aralık, standart sapma, minimum, maksimum değerleri ile sunulmuştur. Grupların sayısal verileri arasındaki farkın analizinde non-parametrik Kruskal Wallis Testi kullanılmıştır. Analizler SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences) programı ile yapılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Ratların enjeksiyonları Dr. Tuncay Karslı ve Prof. Dr. Şehim Kutlay tarafından yapıldı. Ötenazi işlemi ve takiben kas diseksiyonları gerçekleştirildi (Şekil 12 ve Şekil 13). Enjeksiyon işlemi tüm ratlar tarafından iyi tolere edildi. Araştırma sürecinde 1. grup, 3. grup ve 4. gruptan 1'er rat ötenazi işlemi uygulanamadan kaybedildi. Araştırma süresince ratların sağlık durumlarında herhangi bir değişim saptanmadı.

4.1. RAT AĞIRLIĞI

Çalışmaya dahil edilen ratların vücut ağırlıkları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışma başlangıcında gruplar arasında vücut ağırlığı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,264$).

Tablo 1: Çalışmaya dahil edilen ratların başlangıç vücut ağırlıkları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	P değeri
Rat Ağırlığı	360,00 (68,50) [286-398]	350,50 (63,50) [265-402]	347,50 (78,50) [308-403]	351,00 (33,50) [315-389]	389,00 (18,00) [372-402]	352,50 (38,25) [323-380]	361,50 (52,00) [298-392]	0,264 ^a

Hücreler ortanca (çeyrekler arası aralık) [minimum-maksimum] temsil etmektedir

^agruplar arasında vücut ağırlığı açısından anlamlı fark saptanmadı

4.2. RAT GASTROKNEMİUS/VÜCUT AĞIRLIĞI YÜZDESİ

Grupların sağ gastroknemius ağırlığının vücut ağırlığına yüzdelere ait bulgular Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Grupların sağ gastroknemius ağırlığının vücut ağırlığına yüzdelerinin değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	P değeri
Rat Gastroknemius/ Vücut Ağırlığı	0,58 (0,03)	0,32 (0,12)	0,38 (0,05)	0,24 (0,08)	0,36 (0,05)	0,17 (0,09)	0,35 (0,07)	<0,001 ^a
Yüzdesi	[0,55- 0,59]	[0,25- 0,46]	[0,32- 0,40]	[0,18- 0,32]	[0,30- 0,40]	[0,14- 0,24]	[0,29- 0,43]	

Hücreler ortanca (çeyrekler arası aralık) [minimum-maksimum] temsil etmektedir

^a Grup1-Grup4: p=0.002, Grup1-Grup6: p<0.001

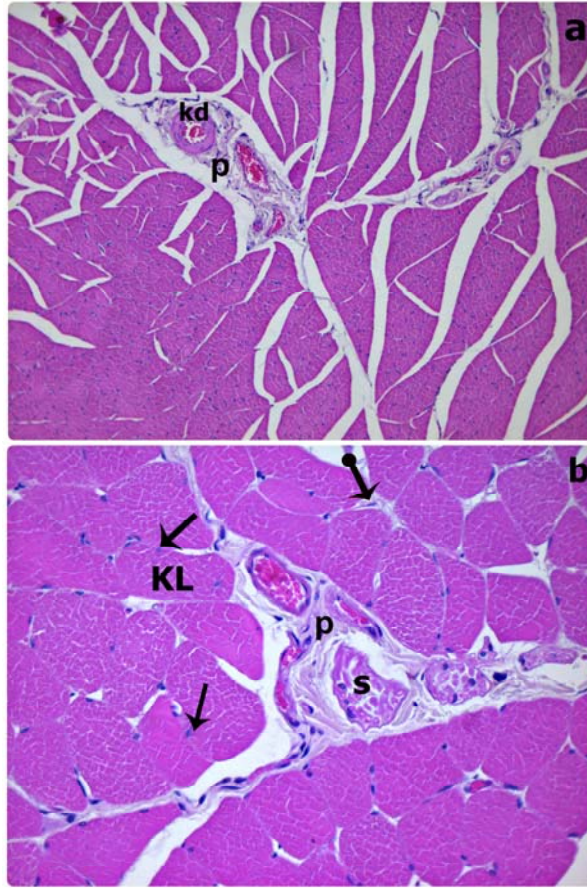
Ratların sağ gastroknemius ağırlığının vücut ağırlığına yüzdeleri karşılaştırıldığında değerlendirme sonucunda; Grup 1 – Grup 4 ($p = 0,002$), Grup 1 – Grup 6 ($p = 0,000$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. İki kez BTX-A enjeksiyonunun tekrarlandığı 4. grup ve 3 kez BTX-A tekrarlandığı 6. grup (son BTX-A sonrası 1. ayda ötenazi) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak anlamlı iken uzun dönem üzerine etkinin değerlendirildiği 5. ve 7. grupta (son BTX-A sonrası 6. ayda ötenazi) bu etki devam etmemiştir.

Ratların sağ gastroknemius ağırlığının vücut ağırlığına yüzdeleri açısından gruplarda değerlere bakıldığında; kontrol grubunda BTX-A uygulanan gruplara göre değerlerin daha yüksek olduğu saptanmıştır. BTX-A'nın tekrarlayan enjeksiyonlarla birlikte erken dönemde (2., 4. ve 6. grup) tekrarın sayısı ile birlikte azalmanın olduğu saptanmıştır (Tablo 2). Ayrıca tekrarlayan enjeksiyonlarla birlikte uzun dönemde de (3., 5. ve 7. grup) tekrar sayısı ile birlikte, azalmanın olduğu saptanmıştır. BTX-A enjeksiyonu uygulanan gruplar erken ve uzun dönem açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında (2. ve 3. grup, 4. ve 5. grup, 6. ve 7. grup) uzun dönemde artış olduğu ancak kontrol grubundan yüksek bulunmadığı saptanmıştır.

4.3. IŞIK MİKROSKOBU İNCELEMELERİ

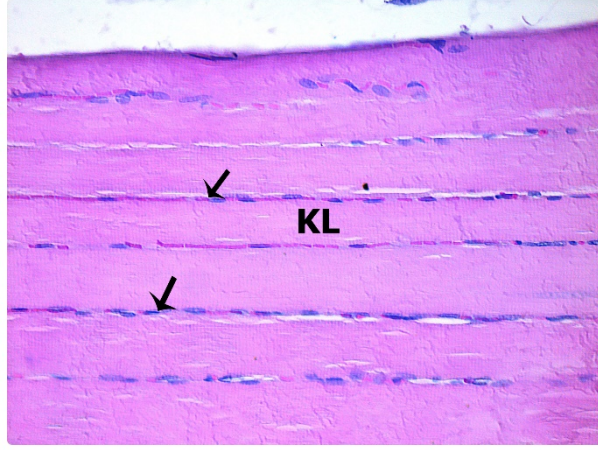
Ratların sağ gastroknemius kas dokusundan hazırlanan kesitler ışık mikroskopunda incelendi.

1. gruba ait kas dokusu örneklerinin ışık mikroskobu incelemelerinde kas liflerinin enine ve boyuna kesitleri normal kas morfolojisiyle uyumlu olarak değerlendirildi. Kas liflerinin çekirdekleri periferik yerleşimli olarak gözlenirken sarkolemmanın hemen çevresinde endomisyum olarak adlandırılan bağ dokusu kılıfına ait kollajen lifler ve fibroblastlara ait çekirdekler görüldü. Kas liflerinin oluşturduğu fasiküllerin perimisyum olarak adlandırılan bağ dokusu kılıf ile çevrelendiği, bu doku içinde kan damarları ve periferik sinir kesitlerinin yer aldığı görüldü (Şekil 14 ve Şekil 15).



Şekil 14: 1. gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri

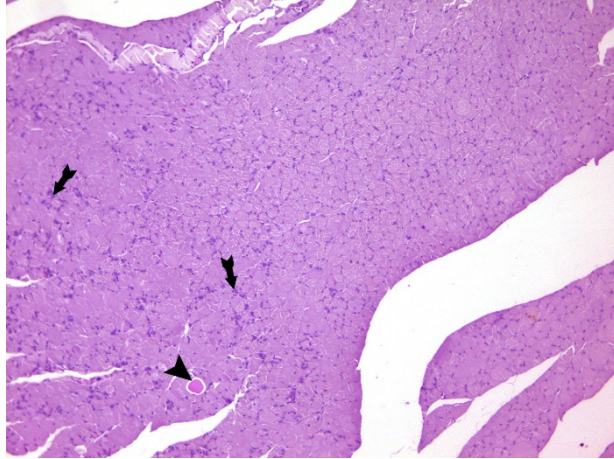
Kas liflerinin çekirdekleri (siyah ok) periferik yerleşimli olup her bir kas lifini çevreleyen endomisyum ve fibroblastlar (daireli ok) normal görünümde izlenmiştir. Kas fasiküllerinin arasındaki perimisyal alanda gevşek bağ dokusu içinde kan damarları (kd) ve periferik sinir lifi (s) kesitleri gözlenmektedir. a: x 10, b; x40 büyütme, Boya: Hematoksilen – Eozin



Şekil 15: 1. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitte kas lifleri

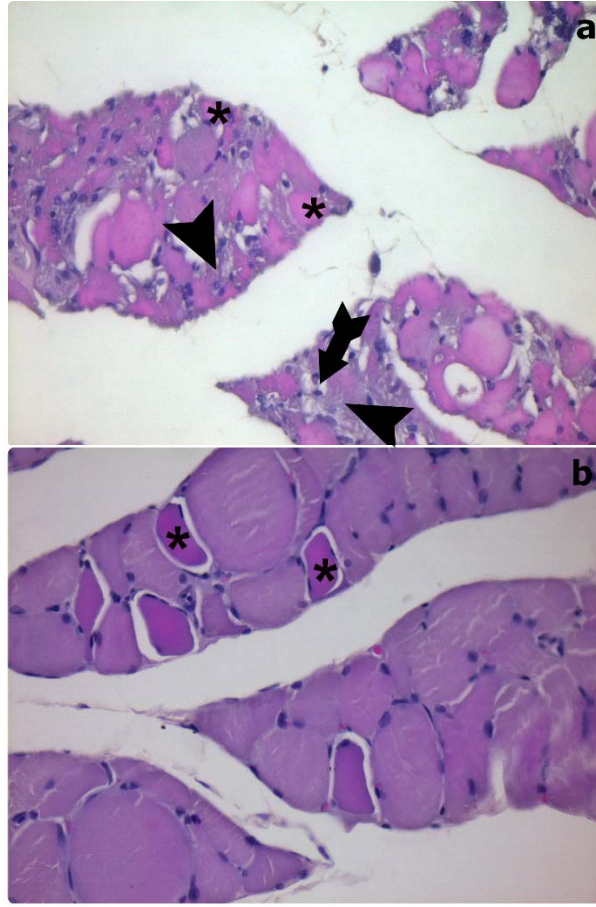
Kas liflerinin (KL) birbirine paralel uzanan boyuna kesitleri izlenmektedir. Kas liflerinin çekirdekleri (siyah ok) periferik yerleşimli olarak gözlenmiş olup kas lifleri boyunca enine çizgilenme görülmektedir. Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen - Eozin.

2. gruba ait kas dokusu örnekleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde endomisyal alanda belirgin hücresel infiltrasyon, kas liflerinde atrofi ve yaygın dejenerasyon saptandı (Şekil 16, Şekil 17 ve Şekil 18).



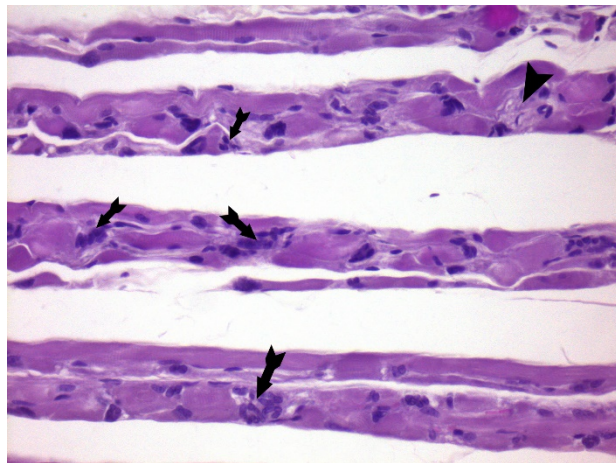
Şekil 16: 2. gruba ait ışık mikrografta enine kesitte kas lifleri, Büyütme: x10

Kas liflerinin arasında endomisyal alanda hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. Bazı kas liflerinde dejenerasyon ve atrofi (ok başı) görülmektedir. Büyütme: x10, Boya: Hematoksilen - Eozin.



Şekil 17: 2. gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri, Büyütme: x40

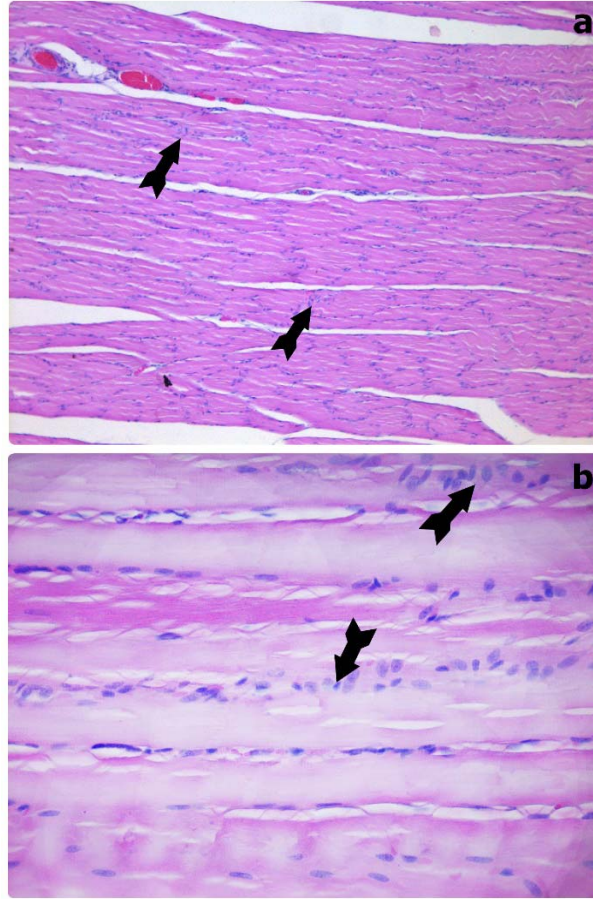
Kas liflerinin arasında endomisyal hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) alanları izlenmektedir. Bazı kas liflerinde atrofi (asteriks) görülürken bazı kas liflerinde hipertrofi (ok başı) gözlenmektedir. Kas lifleri düzensiz çapa sahiptir. a-b; Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen -Eozin.



Şekil 18: 2. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitte kas lifleri

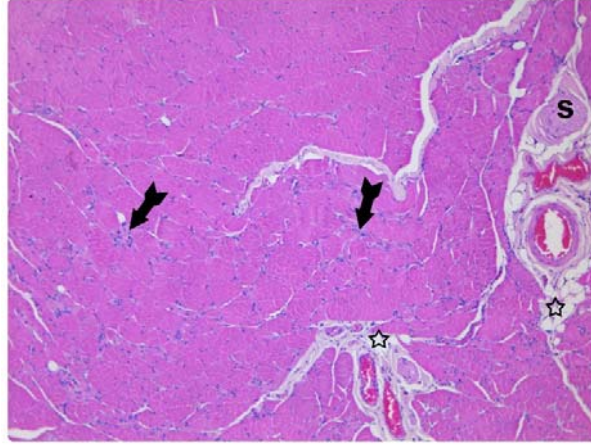
Kas liflerinin boyuna kesitlerinde endomisyal alanda hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) görülmekte, dejenerasyon (ok başı) bulguları izlenmektedir. Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen -Eozin

3. grupta yapılan ışık mikroskobu incelemesinde ise hücresel infiltrasyonun endomisyal alanda devam ettiği, özellikle perifasiküler bölgelerde atrofik ve nekrotik kas lifleri yanında rejenerasyon sürecinde olduğu belirlenen kas liflerinin varlığı dikkat çekmiştir. Ayrıca perimisyal alanda yağ dokusu izlenmiştir (Şekil 19, Şekil 20 ve Şekil 21).



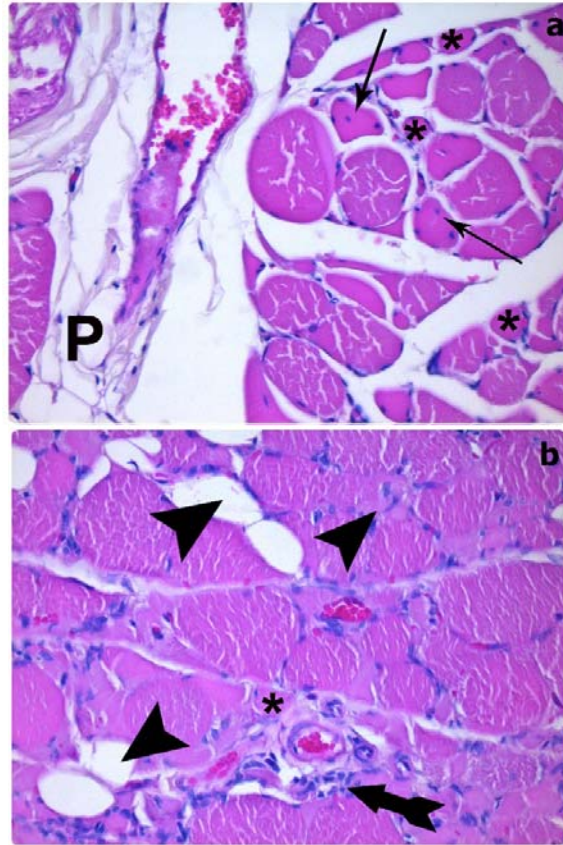
Şekil 19: 3. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitlerde kas lifleri

Kas liflerinin boyuna kesitlerinde hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. a; Büyütme x10, b; Büyütme: x40 Boya: Hematoksilen -Eozin



Şekil 20: 3 gruba ait ışık mikrografta enine kesitte kas lifleri, Büyütme: x10

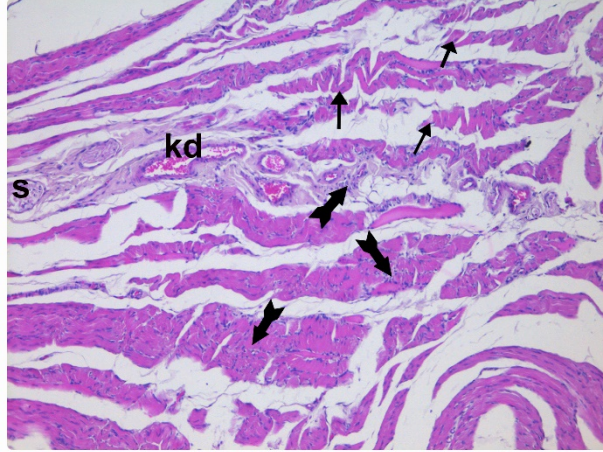
Kas liflerinin arasında endomisyal alanda hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. İnterfasiküler alanda perimisyal bağ dokusu içinde periferik sinir kesiti (s) ve damarlar yakınında yağ dokusu (yıldız) görülmektedir. Büyütme: x10, Boya: Hematoksilen - Eozin.



Şekil 21: 3. gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri, Büyütme: x40

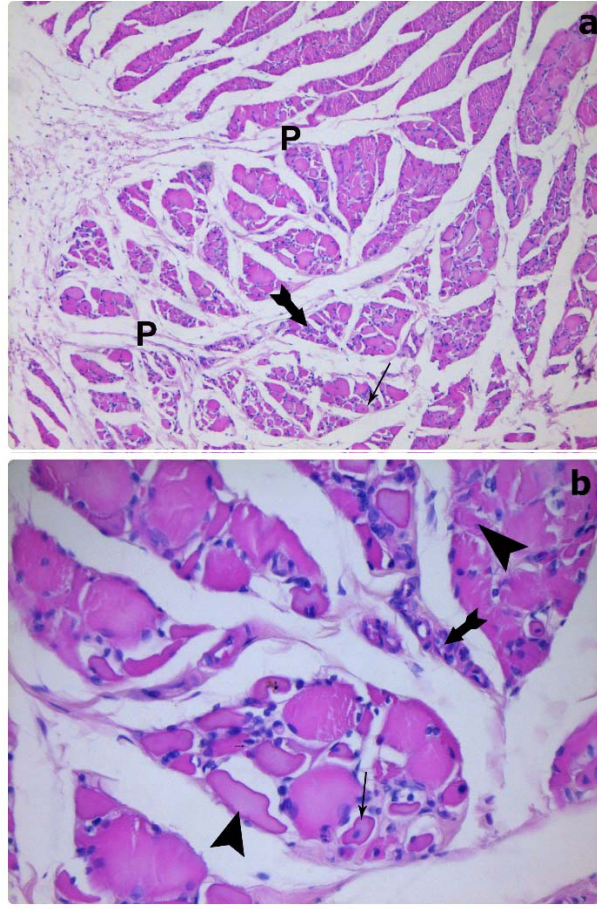
Kas liflerinin arasında endomisyal ve perimisyal alanda (P) hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. Perifasiküler bölgedeki kas liflerinde daha belirgin olmak üzere atrofi (asteriks) görülürken bazı kas liflerinde rejenerasyon (ince ok) gözlenmektedir. Bazı kas liflerinin dejenerasyonun (ok başı) erken ve geç dönem özelliklerini sergilediği görülmüştür. a-b; Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen -Eozin

4. grubun incelemesinde endomisyal alanda hücrel infiltrasyon, immatür kas lifleri ve bazı kas liflerinde sarkolemmal invajinasyonlara bağlı tırtıklı görünüm izlendi. Perifasiküler kas liflerinde atrofi, dejenerasyon bulguları yanında rejenerasyon bulguları da görüldü (Şekil 22 ve Şekil 23).



Şekil 22: 4. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitte kas lifleri

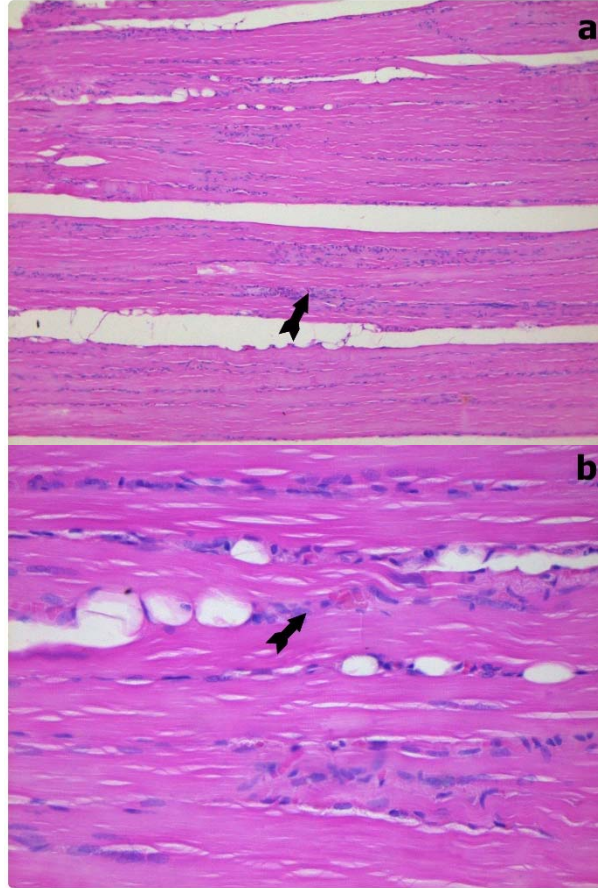
Kas liflerinin endomisyumunda hücrel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. Perimisyal bağ dokusu içine periferik sinir kesiti (s) ve kan damarları (kd) yakınında da infiltrasyon görülmektedir. Bazı kas liflerinin immatür olduğu, sarkolemmaların derin invajinasyonlar oluşturduğu gözlenmiştir (ok). Büyütme: x40 Boya: Hematoksilen - Eozin



Şekil 23: 4. gruba ait ışık mikroyada enine kesitlerde kas lifleri

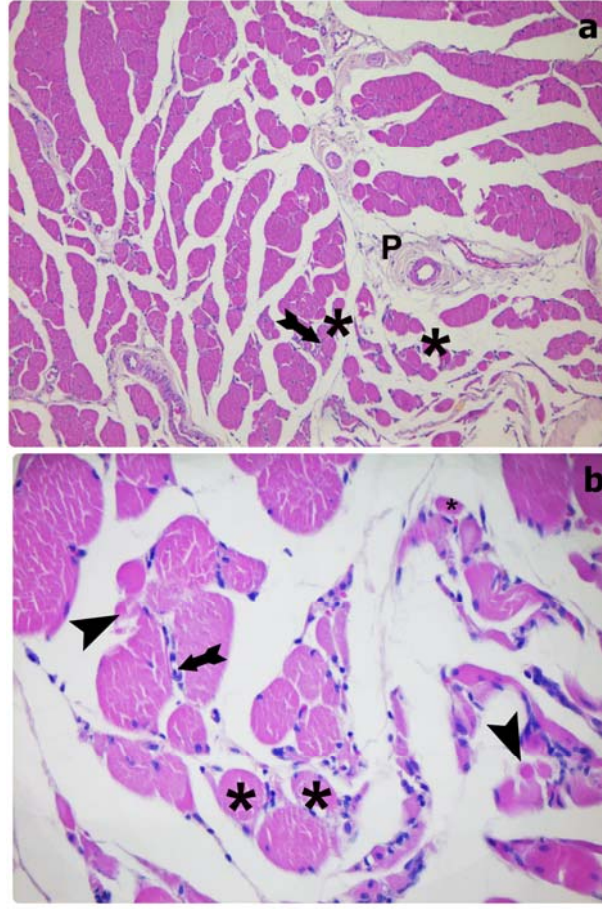
Kas liflerinin arasında endomisyal alanda hücreyel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. Kas liflerinde atrofik ve dejenerasyona uğramış (ok başı), arasında rejenerasyon (ince ok) gösteren kas lifleri de gözlenmektedir. P; perimisyum. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen - Eozin.

5. gruba ait kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildiğinde hücresel infiltrasyonun endomisyal alanlardan daha çok perifasiküler bölgelerde belirgin olduğu, bu bölgede atrofik, dejenere ve nekrotik kas liflerinin bulunduğu görüldü (Şekil 24 ve Şekil 25).



Şekil 24: 5. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitlerde kas lifleri

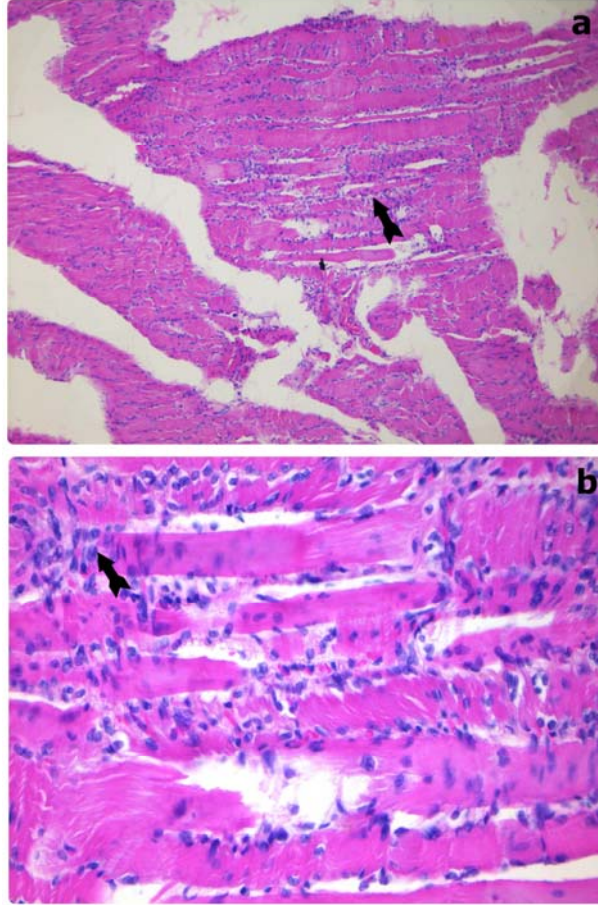
Kas liflerinin boyuna kesitlerinde hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40 Boya: Hematoksilen – Eozin



Şekil 25: 5 gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri

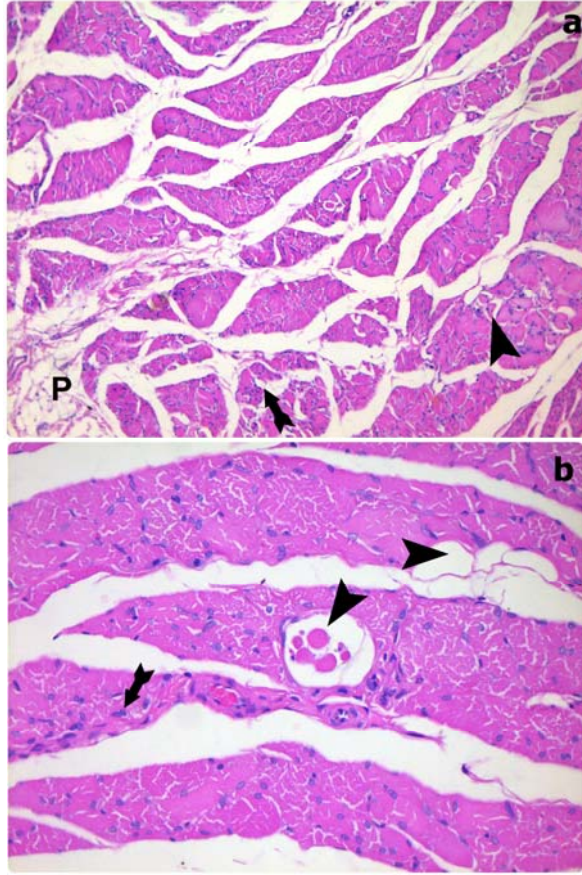
Perifasiküler bölgede kas lifleri çevresinde hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) ve atrofik (asteriks) kas lifleri dikkat çekmektedir. Ok başı; dejenere kas lifleri. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen -Eozin.

6. grupta ise endomisyal bölgede belirgin hücresel infiltrasyon görüldü. Dejenere kas lifi kesitleri ve perimisyal alanda yağ dokusu artışı saptandı (Şekil 26, Sekil 27 ve Şekil 28).



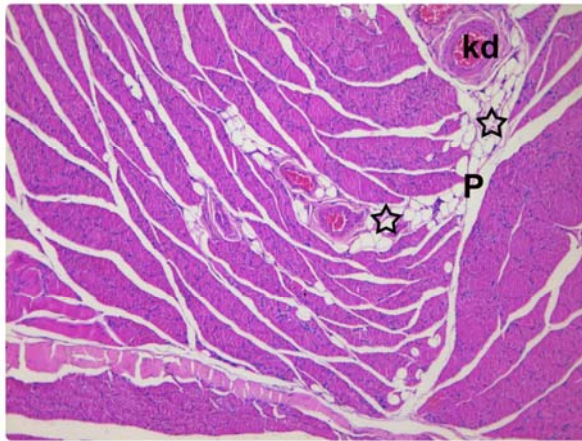
Şekil 26: 6. gruba ait ışık mikrografta boyuna kesitlerde kas lifleri

Kas liflerinin endomisyumunda hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40 Boya: Hematoksilen – Eozin



Şekil 27: 6. gruba ait ışık mikrografta enine kesitlerde kas lifleri, Büyütme: x10 ve x40

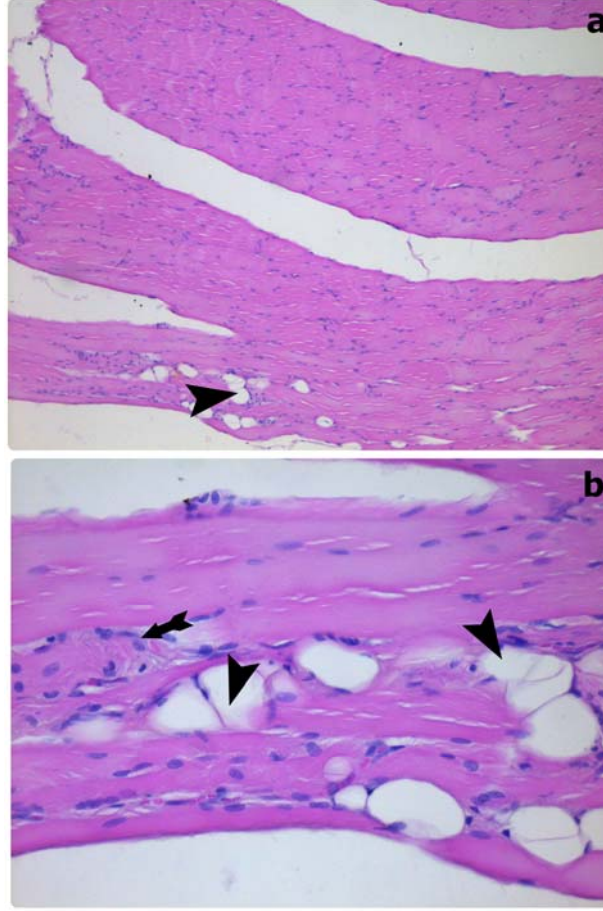
Kas liflerinin endomisyumunda hücresel infiltrasyon (kuyruklu ok) ve atrofik ve dejenerasyona uğramış kas lifleri (ok başı) izlenmektedir. P;perimisyum. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40 Boya: Hematoksilen – Eozin



Şekil 28: 6. gruba ait ışık mikrografta enine kesitte kas lifleri, Büyütme: x10

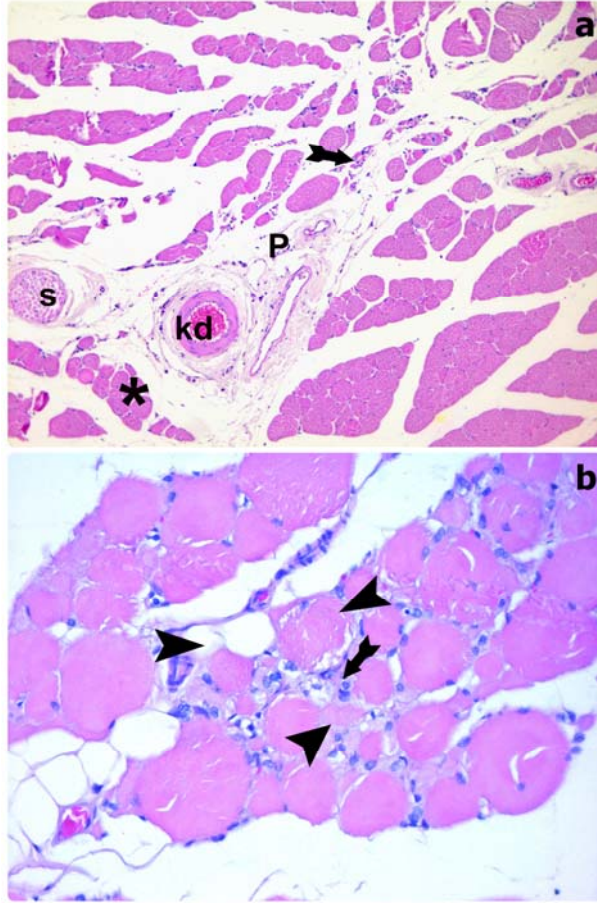
Kas liflerinin perimisyumunda kan damarları (kd) çevresinde yağ dokusu artışı (yıldız) görülmektedir. Büyütme: x10, Boya: Hematoksilen - Eozin

7. grubunda kas liflerinde atrofi ve dejenerasyon bulguları perifasiküler bölgede perimisyal alana komşu kısımda belirgin olarak izlendi (Şekil 29 ve Şekil 30).



Şekil 29: 7. gruba ait ışık mikroyrafta boyuna kesitlerde kas lifleri

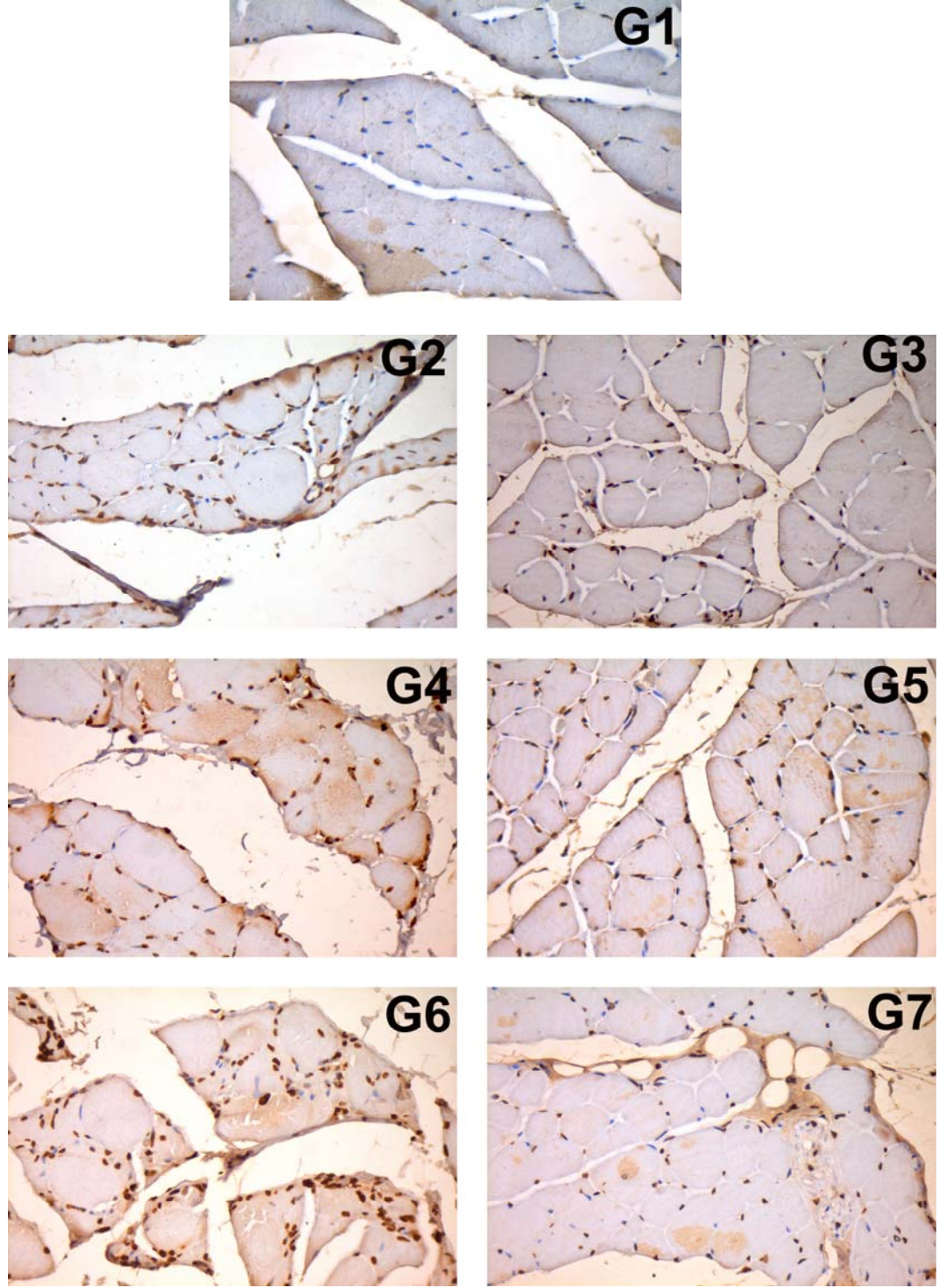
Kas liflerinin arasında hafif derecede hücreyel infiltrasyon (kuyruklu ok) izlenmektedir. Ok başı; dejenere kas lifleri. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40 Boya: Hematoksilen – Eozin



Şekil 30: 7. gruba ait ışık mikroyta enine kesitlerde kas lifleri

Perifasiküler bölgede kas lifleri çevresinde hücreyel infiltrasyon (kuyruklu ok) ve atrofik (asteriks) kas lifleri gözlenmiştir. Ok başı, dejenere kas lifi, s; periferik sinir kesiti, kd: kan damarı, P; perimisyum. a; Büyütme: x10, b; Büyütme: x40, Boya: Hematoksilen -Eozin.

Deney gruplarında apopitotik hücreleri değerlendirmek için uygulanan TUNEL boyamalarına ait kesitlerde apoptotik hücreler kahverengi çekirdek boyanmasıyla tespit edildi (Şekil 31).



Şekil 31: Gruplara ait kasların TUNEL boyamalarına ait görüntüler

Kahverengi çekirdek boyanması Tunel (+) olarak değerlendirilmiştir. G; grup. Büyütme x 40

4.4. KAS LİFİNİN ENİNE KESİTLERDE ALAN ÖLÇÜMÜ

Histolojik olarak kas liflerinin alan ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Histolojik enine kesit alanlarında grupların kas lifi alan ölçümleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	P değeri
Kas Lifinin Enine Kesitlerde Alan Ölçümü	2576 (309) [2275-2811]	2003 (1414,75) [1315-2756]	2567 (2081,25) [1288-3720]	830 (327,25) [472-992]	1819 (1079) [1205-2659]	1151 (1061,25) [326-1773,5]	1578 (848,88) [937-2150]	0,002 ^a

Hücreler ortanca (çeyrekler arası aralık) [minimum-maksimum] temsil etmektedir

^a Grup1-Grup4: p=0,005, Grup1-Grup6: p=0,045

Sağ gastroknemius kaslarından hazırlanan bu kesitlerde histolojik kas atrofisinin değerlendirilmesinde; Grup 1 – Grup 4 ($p = 0,005$), Grup 1 – Grup 6 ($p = 0,045$) arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. Tekrarlayan enjeksiyonların gerçekleştirildiği 4. ve 6. gruplar (son BTX-A sonrası 1. ayda ötenazi) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (1. grup) histolojik açıdan kas atrofisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ancak bu etkinin uzun dönemde değerlendirildiği 5. ve 7. gruplarda (son BTX-A sonrası 6. ayda ötenazi) devam etmediği saptanmıştır. Tek enjeksiyonun yapıldığı (2. ve 3. grup) gruplarsa kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Histolojik enine kesit alanlarında kas lifi alan ölçümlerinde gruplar değerlendirildiğinde; kontrol grubunda BTX-A uygulanan gruplara göre değerlerin daha yüksek olduğu saptanmıştır. BTX-A tekrarlayan enjeksiyonlarının erken dönem üzerine etkilerinin değerlendirildiği gruplarda (2., 4., 6. gruplar) tekrar sayısı ile birlikte değerlerin azaldığı görülmüştür. Ayrıca tekrarlayan enjeksiyonlarla birlikte uzun dönem üzerine etkilerinin değerlendirildiği gruplarda da (3., 5., 7. gruplar) tekrar sayısı ile birlikte değerlerde azalmanın görüldüğü bulunmuştur. BTX-A enjeksiyonu uygulanan gruplar erken ve uzun dönem üzerine etkilerin

değerlendirildiği gruplar aralarında karşılaştırıldığında (2. ve 3.grup, 4. ve 5. grup, 6. ve 7. grup) uzun dönem üzerine etkilerin incelendiği gruplarda değerlerde artış olduğu ancak kontrol grubundan yüksek bulunmadığı saptanmıştır.

4.5. İNFİLTRASYON SKORU

Çalışmaya dahil edilen ratların İnfiltrasyon Skoru değerleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4: Grupların İnfiltrasyon Skoru değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	P değeri
İnfiltrasyon Skoru	0,00 (0,00)	3,00 (1,00)	1,00 (1,00)	3,00 (1,50)	1,50 (1,00)	3,00 (0,25)	2,00 (0,25)	<0,001 ^a
	[0,00-0,00]	[2,00-,00]	[1,00-2,00]	[1,00-3,00]	[1,00-2,00]	[2,00-3,00]	[1,00-2,00]	

Hücreler ortanca (çeyrekler arası aralık) [minimum-maksimum] temsil etmektedir

^a Grup1-Grup2: p=0,002, Grup1-Grup4: p=0,017, Grup1-Grup6: p<0.001

Botulinum toksin tip-A enjeksiyonu yapılan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında BTX-A enjeksiyonu yapılan gruptaki ratlarda erken dönemde (2., 4., 6. gruplar) infiltrasyon skorunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olduğu ancak bu etkinin uzun dönemin değerlendirildiği gruplarda (3., 5., 7. gruplar) olmadığı (geri döndüğü) saptandı.

İnfiltrasyon Skorlarında grupların değerlerine bakıldığında; kontrol grubunda skorun 0 olduğu görülmüştür. Özellikle değerlerin BTX-A’nın erken dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği gruplarda (2., 4., 6. gruplar) daha yüksek saptanmakla birlikte BTX-A sonrasında hem erken hem de uzun dönem üzerine skorun 0 olmadığı görülmüştür.

4.6. HİSTOLOJİK HASAR SKORU

Ratların Histolojik Hasar Skoru değerleri Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Grupların Histolojik Hasar Skoru değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	P değeri
Histolojik Hasar Skoru	0,00 (0,00)	2,00 (1,00)	2,00 (2,00)	3,00 (1,50)	2,00 (0,50)	3,00 (3,00)	2,50 (1,25)	0,001 ^a
	[0,00-0,00]	[2,00-3,00]	[2,00-2,00]	[1,00-3,00]	[1,00-3,00]	[3,00-3,00]	[1,00-3,00]	

Hücreler ortanca (çeyrekler arası aralık) [minimum-maksimum] temsil etmektedir

^a Grup1-Grup2: p=0,08, Grup1-Grup4: p=0,040, Grup1-Grup6: p<0.001, Grup1-Grup7: p:0,048

Ratların sağ gastroknemius kas dokusundan hazırlanan kesitlerde kas liflerinin dejenerasyon ve disorganizasyonun değerlendirilmesine yönelik hesaplanan Histolojik Hasar Skorunda; Grup 1 – Grup 2 (p = 0,08), Grup 1 – Grup 4 (p = 0,040), Grup 1 – Grup 6 (p = 0,000), Grup 1 – Grup 7 (p = 0,048) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. BTX-A enjeksiyonu yapılan gruplardaki ratlarda erken dönemde (2., 4., 6. gruplar) histolojik hasar skorunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olduğu ayrıca bu etkinin 3 kez BTX-A enjeksiyonu tekrarlanan ve geç dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği 7. grupta da devam ettiği saptanmıştır.

Histolojik Hasar Skorunda gruplar değerlendirildiğinde; kontrol grubunda skorun 0 olduğu, BTX-A enjeksiyonu gerçekleştirilen tüm gruplardaysa pozitif değerlerin olduğu skorun 0 olmadığı saptanmıştır.

4.7. APOPTOZİS İNDEKSİ

Grupların Apoptozis İndeksi değerleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6: Grupların Apoptozis İndeksi değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	P değeri
Apoptozis İndeksi	8,00 (10,50)	61,50 (11,75)	29,00 (10,00)	60,00 (26,00)	49,50 (14,50)	54,00 (16,00)	41,00 (6,50)	<0,001 ^a
	[6,00- 21,00]	[46,00- 66,00]	[20,00- 37,00]	[36,00- 63,00]	[38,00- 60,00]	[45,00- 64,00]	[35,00- 44,00]	

Hücreler ortanca (çeyrekler arası aralık) [minimum-maksimum] temsil etmektedir

^a Grup1-Grup2: p=0,001, Grup1-Grup4: p=0,05, Grup1-Grup5: p=0,038, Grup1-Grup6: p: 0,015

Ratların sağ gastroknemius kas dokusundan hazırlanan kesitlerde İmmünohistokimyasal incelemelerde saptanan Apoptozis İndeks değerlendirmesinde; Grup 1 – Grup 2 (p = 0,001), Grup 1 – Grup 4 (p = 0,051), Grup 1 – Grup 5 (p = 0,038), Grup 1 – Grup 6 (p = 0,015) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında BTX-A enjeksiyonunun gerçekleştirildiği gruplarda erken dönemde (2., 4., 6. gruplar) apoptozis üzerine istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken uzun dönemde 5. grup dışında bu farkın devam etmediği saptanmıştır.

Apoptozis İndeksinde gruplar incelendiğinde; kontrol grubunda BTX-A uygulanan gruplardan daha az olmakla birlikte apoptozisin görüldüğü saptanmıştır. BTX-A enjeksiyonu uygulanan erken ve uzun dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği gruplar aralarında karşılaştırıldığında (2. ve 3. grup, 4. ve 5. grup, 6. ve 7. grup) uzun dönem üzerine etkilerin incelendiği gruplarda değerlerde azalma olduğu ancak kontrol grubundan daha yüksek bulunduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının kas kütlesinde ve kontraktıl materyalde azalmayla birlikte, kas liflerinde dejenerasyona, apoptozise ve kas dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonuna yol açtığı görülmüştür.

Kas ağırlığı değerlerine bakıldığında BTX-A tekrarlayan enjeksiyonların uygulandığı ve erken dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı kaybın olduğu görüldü. Ayrıca değerler incelendiğinde kas kütlesindeki kayıp tüm BTX-A uygulanan gruplar vardı. Özellikle tekrar sayısı ile birlikte kas kütlesindeki kaybın artışı uzun dönemde geri kazanım olduğu ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tam sağlanamadığı bulunmuştur.

Tsai ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada tek doz BTX-A enjeksiyonu sonrası kas kütlesinde 58. haftada %89.3 geri kazanımın olduğu, 30 hafta arayla tekrarlayan enjeksiyonlarda tam ve yarım doz ilk BTX-A enjeksiyonu ile birlikte 26. haftada %72.7 ve %83.7, 2. doz BTX-A enjeksiyonu ile birlikte 58. haftada %58.3, ve %70.3 geri kazanımın olduğu görülmüştür (64). Çalışmada BTX-A dozu olarak 1,5 ve 1 ng / kg kullanılmakla birlikte kontrol grubu olarak kontrolateral kas kütlesi değerlendirilmiştir. BTX-A insan letal dozu intravenöz veya intramüsküler olarak 1.3-2.1 ng / kg olarak bilinmektedir (69). Dolayısıyla çalışmada yüksek doz BTX-A uygulamaları yapılmasına karşın sonuçlar bizim çalışmamızı desteklemektedir. Fortuna ve ark. tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada tek, 2 kez ve 3 kez 3'er ay ara ile tekrarlayan BTX-A kas kütlesi üzerine etkisi 6 ay sonra değerlendirilmiş (65). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kas ağırlığı açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. BTX-A dozu 3,5 U/kg olarak alınmasıyla birlikte ışık mikroskopunda ki değerlendirmelerde esas olarak yağ hücrelerinin görüldüğü ve kontraktıl materyaldeki kaybın yağ hücreleriyle dengelendiği dolayısıyla toplam kas kütlesini yaklaşık olarak sabit bulunduğu belirtilmiştir. Çalışmada her ne kadar kas ağırlığı açısından anlamlı farklılık bulunmamış olsa da kas kütlesinde kayıp geliştiğine değinilmiştir. Bu bulgular bizim çalışmamızdaki bulgularla uyumludur. Stone ve ark.'nın fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 1 U/kg, 3 U/kg, 6 U/kg olmak üzere tek doz BTX-A enjeksiyonu uygulanmış uygulama sonrası 4. haftada en yüksek kas

kütlesi kaybı (% 40 kas kütlesi kaybı) görülmekle birlikte 12. hafta kaybın geri döndüğü görülmüştür (15). 1 U/kg BTX-A uygulanan grupta diğer gruplara göre kasta ağırlık kaybının anlamlı olarak daha az olduğu saptanmıştır. Çalışmada tek enjeksiyon uygulanmasıyla birlikte kontrol grubu olarak kontrolateral kas kütlesi değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da 1. ayda anlamlı kas kütlesi kaybı görülmekle birlikte bu çalışmada 12. haftada anlamlı kas kütlesi kaybının görülmemesinin kontrol grubu olarak kontrolateral kas kütlesinin değerlendirilmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ma ve ark. juvenil ratlar üzerine yaptıkları çalışmada BTX-A uygulaması sonrası 2. hafta %32, 3. hafta %24 kas kütlesinde kaybın geliştiği 6. ayda ve 12. ayda %92 ve %96 kas ağırlığının geri kazanıldığı bulunmuştur (16). Çalışmada juvenil ratlara 6 U/kg BTX-A enjeksiyonları uygulanmış kontrol grubu olarak kontrolateral kas kütlesi değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında bizim çalışmamızda da 1. ayda anlamlı kas kütlesi kaybı görülmüştür. Bu çalışmada kontrol grubu olarak kontrolateral kas kütlesinin değerlendirilmesi ve juvenil ratlar üzerine gerçekleştirilmesi nedeniyle olgunlaşmamış kasların muhtemelen toksin enjeksiyonuna yetişkin kaslarından farklı tepki vermesine de bağlı olarak uzun dönem üzerine sonuçlarında bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz kas kaybı kütlesi kaybının görülmemiş olabileceği düşünülmüştür. Frick ve ark ratlar üzerine yaptıkları çalışmada BTX-A sonrası 6. ayda kas kütlesinde anlamlı kaybın olduğu bulunmuştur (63). Çalışmada tek dozaj olarak 0,625 U, 2,5 U ve 10 U BTX-A uygulanmasıyla birlikte kontrol grubu olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan ratlar (ayrıca kontrolateral kas dokusu) değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 200-260 gram ratlar üzerinde gerçekleştirilmiş olup özellikle 0,625 U BTX-A bizim çalışmamızda da kullandığımız BTX-A dozuna (3 U/kg) yakın bir doz olup klinik uygulamalarda kullanılan dozada uymaktadır. Tüm rat gruplarında kas kütlesinde 6. ayda kayıp devam etmesine bağlı olarak bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

İnsanlarda kas atrofisinin değerlendirildiği çalışmalar kasın görüntüleme yöntemleri (MRG ve USG) ile değerlendirilmesine dayanmaktadır (53,57). Schroeder ve ark. tarafından yapılan çalışmada 2 sağlıklı gönüllü üzerinde gerçekleştirilmiş olup BTX-A olarak tek doz 75 U Xeomin® (incobotulinumtoxinA, Merz Pharma, Germany) uygulanan hastayla, serum fizyolojik uygulanan hastanın

kas MRG'leri karşılaştırılmıştır (53). Çalışmanın sonuçları tek hasta üzerinden değerlendirilmiş olmakla birlikte 12. aydaki değerlendirmede kas kütlesinde kaybın devam etmesiyle sonuçları bizim çalışmamızda ki bulgularla uyushmaktadır. Barber ve ark. tarafından Serebral palsi hastalarında gerçekleştirilen çalışmada tek ve 3 kez tekrarlayan BTX-A enjeksiyonları sonrası 12. ayda kas kütlesi USG'le değerlendirildiğinde kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında anlamlı fark bulunmuştur (57). Ancak tek ve tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarında kas kütlesinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmada 6 U/kg BTX-A enjeksiyon yapılmış olup tekrarlayan enjeksiyonlar 4'er ay arayla yapılmıştır. Çalışma sonuçları 12. ayda kas kütlesindeki kaybın devam etmesiyle bizim çalışmamızda ki bulgularla benzerdir. Bizim çalışmamızda tekrar sayısı ile birlikte kas kütlesindeki kaybın giderek arttığı görülmüştür. Bu çalışmada USG'le kas kütlesinin değerlendirilmesi ve BTX-A dozu olarak daha yüksek bir doz olan 6 U/kg uygulanması nedeniyle BTX-A tekrar sayısı ile birlikte sonuçlarda anlamlı farklılığa yol açmamış olabileceği düşünülmüştür.

Dolayısıyla bizim çalışmamızla özellikle ilk BTX-A enjeksiyonu ile birlikte kas kütlesinde kaybın geliştiği bulunmuş olup tekrarlayan enjeksiyonlarla birlikte bu kaybın giderek arttığı ve uzun dönem üzerine etkinin değerlendirildiği 6. ayda etki azalmakla birlikte devam ettiği görülmüştür.

Histolojik enine kesit alanlarında kas lifi alan ölçümleriyle kontraktıl materyal oranı değerlendirildiğinde 2 ve 3 kez tekrarlayan BTX-A enjeksiyonları uygulanan ve erken dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği gruplarda kontrol grubuna göre kontraktıl materyalde anlamlı kaybın bulunduğu saptandı. Bununla birlikte istatistiksel bulgular dikkatle analiz edildiğinde BTX-A tekrar sayısı ile birlikte kontraktıl materyaldeki kaybın giderek arttığı uzun dönem üzerine geri kazanım olduğu ancak kontrol grubuna kıyasla tam sağlanamadığı bulunmuştur. Dolayısıyla BTX-A enjeksiyonları sonucu kas lifi alan ölçümlerine dayanarak kontraktıl materyalde kaybın geliştiği görülmüştür. Tek BTX-A enjeksiyonu yapılan ve uzun dönem üzerine etkinin değerlendirildiği 3. grupta uzun dönem üzerine iyileşme belirtisi (geri kazanım) olarak görülen genişlemiş kas lifi alanlarıysa tekrarlayan BTX-A enjeksiyonu yapılan diğer gruplarda görülememiştir. Dolayısıyla özellikle tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarına bağlı olarak kontraktıl materyaldeki

kaybın giderek arttığı ve geri kazanım üzerine olumsuz sonuçlara neden olduğu yönünde yorumlanmıştır.

Fortuna ve ark. tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada tek, 2 kez ve 3 kez 3'er ay ara ile tekrarlayan BTX-A'nın kasta kontraktil materyal oranı üzerine etkisi 6 ay sonra değerlendirilmiş (65). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında BTX-A uygulanan gruplarda anlamlı kontraktil materyal kaybının olduğu ancak tekrarlayan enjeksiyonların kayıp açısından farka yol açmadığı bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla BTX-A uygulanma sonrası 6. ayda kontraktil materyal kaybının devam ettiğini göstermekle birlikte farklı olarak tekrarlayan enjeksiyonlarda bu etkinin değişmediğine işaret etmiştir. Bu farklılığın da bu çalışmadaki kontraktil materyal oranının tespitinde uygulanan yöntemle bağlı olabileceği histolojik enine kesit alanının en az %50'sinde kontraktil materyal yüzdesinin hesaplanmasının değerlendirme için yeterli olamayabileceği düşünülmüştür. Valentine ve ark. Serebral palsi hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada tek ve tekrarlayan BTX-A enjeksiyonları sonrası farklı zamanlarda alınan kas biyopsilerinde kasta kontraktil materyal oranı değerlendirilmiştir (70). 10 katılımcıdan 6'sında BTX-A sonrası 4 ay ile 3 yıl sonra alınan biyopsilerde kasta kontraktil materyalde kayba yol açtığı saptanmıştır. BTX-A doz olarak 2-6 U/kg uygulanmakla birlikte tüm katılımcılardan biyopsi örneği en erken 3,5 ay sonra alındığı (ortanca 9,5 ay, aralık 3,5-112 ay) belirtilmiştir. Çalışma sonuçları bizim çalışmamızda saptanan kasta gelişen kontraktil materyal kaybını desteklemektedir. Ancak çalışmanın yöntemine bağlı olarak tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının etkisi hakkında yorum yapılamamaktadır. Schroeder ve ark. sağlıklı gönüllüler üzerinde yaptıkları çalışmada kas lifi alanı değerlendirmelerinde BTX-A enjeksiyonu uygulanan hastadan alınan biyopside kontraktil materyal kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 12. ayda % 24 olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur (53). Çalışmanın sonuçları tek hasta üzerinden değerlendirilmiş olup 12. aydaki değerlendirmede kontraktil materyalde kayıp saptanması bizim çalışmamızda ki bulgularla da uyumaktadır.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızla ilk BTX-A enjeksiyonu ile birlikte kasta kontraktil materyalde kaybın geliştiği bulunmuş olup özellikle 3'er ay arayla

tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarıyla birlikte bu kaybın giderek arttığı ve uzun dönemde iyileşme üzerine görülen işaretlerinde kaybolduğu saptanmıştır.

Histolojik kesitlerde kas dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonun şiddetinin değerlendirilmesine yönelik yapılan incelemelerde BTX-A enjeksiyonu yapılan erken dönem etkilerin değerlendirildiği gruplarda infiltrasyon üzerine anlamlı sonuçların olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte gruplardaki ratlar tek tek değerlendirildiğinde kontrol grubunda değerin 0 olduğu, BTX-A enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda mononükleer hücre infiltrasyonu üzerine değerler bulunmakla birlikte özellikle erken dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği gruplarda daha yüksek olduğu görülmüştür.

BTX'in anti-inflamatuar etkilerine yönelik birçok yayın bulunmaktadır (71,72). Özellikle histamin ilişkili kaşıntı, liken simpleks kronikus, alerjik rinit, sedef hastalığına yönelik çalışmalarda BTX'in anti-inflamatuar etkileri bildirilmiştir (71). Bizim çalışmamızda BTX-A enjeksiyonlarıyla birlikte kasta mononükleer hücre infiltrasyonu görülmesiyle inflammatuar etkilerin olabileceği düşünülmüştür. Ausk ve ark. fareler üzerine yaptıkları çalışmada BTX-A enjeksiyonu ile kas felcini takiben kemik iliğinde inflammatuar hücre infiltrasyonu ve osteoinflamatuar sitokin ekspresyonu ile ilgili bir çalışma yapmışlardır (73). Sonuçta BTX-A enjeksiyonu sonrası 24 saat içinde kemik iliğinde inflammatuar hücre infiltrasyonu saptamıştır. Yetmiş iki saat sonra kemik iliğinde osteoklast füzyonu ve pro-osteoklastik inflammatuar gen ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla kemik iliğinde akut inflamasyona yol açtığı sonucuna varılmıştır. Buna bağlı olarak da BTX-A enjeksiyonu sonrası komşu kemik yapısında kas atrofisiyle orantısız olarak şiddetli kemik kaybı görülmesinin mekanizmasının bu yolla olabileceği yönünde yorum yapılmıştır. Bizim çalışmamızda da BTX-A enjeksiyonu uygulanan tüm gruplarda inflammatuar hücre infiltrasyonu görülmüş olup dolayısıyla özellikle BTX-A'nın inflammatuar etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalarla bu konunun daha kesin olarak aydınlatılması gereklidir.

Sonuçta çalışmamızda BTX-A enjeksiyonu ile birlikte özellikle erken dönem üzerine daha belirgin olmak üzere mononükleer hücre infiltrasyonu geliştiği

dolayısıyla gelecekte sitokinlerin de değerlendirildiği çalışmalarla BTX-A'nın inflamatuvar yönünün de araştırılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Histolojik kesitlerde kas liflerinin hasarına yönelik dejenerasyon ve disorganizasyonun değerlendirilmesine yönelik yapılan incelemeler ilgili sonuçlara bakıldığında BTX-A enjeksiyonu sonrası erken dönemde kontrol grubuna göre anlamlı hasarın olduğu saptandı. Ayrıca 3 kez tekrarlayan BTX-A enjeksiyonu uygulanan ve geç dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği grupta da histolojik hasar üzerine anlamlı sonuçların devam ettiği görülmüştür. Bununla birlikte istatistiksel bulgular dikkatle analiz edildiğinde kontrol grubunda histolojik hasar bulunmazken, BTX-A enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda histolojik hasar saptanmıştır. Ayrıca BTX-A enjeksiyon tekrar sayısı ile birlikte uzun dönemde histolojik hasar üzerine etkilerin artarak devam ettiği saptanmıştır.

Fortuna ve ark. tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada tek, 2 ve 3 kez 3'er ay ara ile tekrarlayan BTX-A kas kütlesi üzerine etkisi 6 ay sonra değerlendirilmiştir (65). Çalışmada kas histolojik hasarı gösteren dejenerasyon ve disorganizasyonuna yönelik yorum yapılmamakla birlikte kasta BTX-A enjeksiyonu sonrası atrofi alanlarında yağ hücreleri görülmüştür. Bizim çalışmamızda BTX-A uygulanan gruplarda kasta yağ hücreleri saptanmamış olup çalışmalar arasındaki bu farklılığında Fortuna ve ark. hayvan model olarak tavşan kullanmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Schroeder ve ark. sağlıklı gönüllüler üzerinde yaptıkları çalışmada BTX-A enjeksiyonu uygulanan hastadan 12. ayda alınan kas biyopsisi TEM'de incelendiğinde anormal sarkolemma alanları, dejeneratif değişiklikler tespit edilmiş (53). Çalışmada tek doz BTX-A enjeksiyonu uygulanmakla birlikte uzun dönemde kasta histolojik hasar görülmesiyle sonuçları bizim çalışmamızla da benzerlik göstermektedir. Ma ve ark. maseter hipertrofisi olan hastalar üzerine yaptıkları çalışmada BTX-A enjeksiyonu sonrası 6. ve 12. ayda alınan kas dokusu TEM'de incelenmiştir (66). 6. ayda kontrol grubuna göre kas lifi distorsiyonu, sarkomer boyunda kısalması, H ve M bandında bozulma görülmüş. 12. ayda kasta yapısal dejeneratif değişiklikler gerilese de devam ettiği tespit edilmiştir. Botulinum toksin tip A'nın uzun dönemde kasta histolojik hasar saptanması bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda BTX-A enjeksiyonuyla birlikte kasta histolojik hasar gelişmekle birlikte, özellikle enjeksiyon tekrar sayısı ile birlikte uzun dönemde hasar üzerine bu etkilerin artarak devam ettiği saptanmış olup literatüre tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının etkisi üzerine ışık tutmuştur.

İmmünohistokimya incelemelerde apoptozis üzerine yapılan değerlendirmelerde BTX-A enjeksiyonları uygulanan ve erken dönem üzerine etkilerin değerlendirildiği gruplarda kontrol grubuna göre apoptozis bulunduğu saptandı. Bununla birlikte istatistiksel bulgular dikkatle analiz edildiğinde BTX-A uygulanan tüm gruplarda apoptozisin görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca kontrol grubunda da BTX-A uygulanan gruplardan daha az olmakla birlikte apoptozisin görüldüğü saptanmıştır. Dolayısıyla özellikle ilk yapılan BTX-A enjeksiyonlarının kas yapısı üzerine apoptozis etkisinin daha belirgin olduğu sonucuna varılmıştır.

Watanabe ve ark. ratların mesane detrusor kası üzerinde yaptıkları çalışmada 20U BTX-A enjeksiyonu yapılarak Tunel boyama ile apoptozis araştırılmıştır (74). Ancak çalışma sonucunda apoptozise yönelik anlamlı sonuç bulunmamıştır. Çalışmada değerlendirilen dokunun detrusor kası olması nedeniyle sonuçların bizim çalışmamızla farklı olabileceği düşünülmüştür. Moon ve ark. yaptıkları çalışmada ratların masseter kası üzerine 5 U ve 10 U BTX-A enjeksiyonu yapılmış ve 2 ve 12 hafta sonra alınan biyopsilerde sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırılarak incelenmiştir. İkinci haftada BTX-A uygulanan kaslarda Tunel boyamada kontrol grubuna göre anlamlı apoptozis saptanmıştır (75). 12. haftada Tunel boyamada apoptozis saptanmamakla birlikte 10 U BTX-A yapılan grupta BCL-2 ekspresyonunda anlamlı artışın devam ettiği görülmüştür. BCL-2 ekspresyonunda anlamlı artışın devam etmesinin de kas hücrelerini BTX-A kaynaklı apoptotik strese karşı koruyabileceği yönünde yorumlanmıştır. Sonuçlara bakıldığında bizim çalışmamızda ki erken dönem üzerine apoptozis üzerine anlamlı bulgularla uyuşmakla birlikte 12. hafta anlamlı fark görülmemesi fark yaratmaktadır. Tsai ve ark. ratlar üzerine yaptıkları çalışmada ise BTX-A sonrası kasta apoptozis p-Akt ve Aif (apoptozis indükleyici faktör) düzeyleri değerlendirilerek incelenmiş ve 4. hafta hayatta kalma sinyal yollunda olan p-akt düzeyinde BTX-A grubunda kontrol grubuna kıyasla en yüksek olduğu 8. haftaya kadar anlamlı devam ettiği bulunmuştur (64). Apoptozis indükleyici faktör (Aif) düzeyininse BTX-A uygulanan grupta

artmadığı görülmüştür. Sonuçlara bakıldığında BTX-A uygulamasıyla apoptozis yollarında aktivasyon olmakla birlikte geç dönemde devam etmediği görülmüştür. Bizim çalışmamızda da özellikle erken dönemde görülen apoptozis bulgularıyla benzerlik göstermekle birlikte çalışmada apoptozis sinyal yollarının değerlendirilmesi nedeniyle geç dönem bulgularında farklı sonuca yol açabileceği düşünülmüştür.

Dolayısıyla bizim çalışmamızda da özellikle ilk BTX-A enjeksiyonu ile birlikte kasta apoptozise neden olduğu ve bu etkinin erken dönemde daha belirgin olduğu görülmüştür.

Genel gözlem olarak ayrıca ışık mikroskobu incelemelerinde BTX-A enjeksiyonu sonrası erken dönemde endomisyal alanda görülen infiltrasyon bulguları geç dönemde ağırlıklı olarak perimisyal alanda görüldü. Geç dönemde atrofi, dejenerasyon bulguları perifasiküler bölgede perimisyuma yakın alanlarda daha belirgin olarak izlendi. Özellikle geç dönem bulgularının nekrotizan miyopatilerle uyumlu histopatolojik görüntü sunduğu düşünüldü.

Bu çalışmanın güçlü yönleri arasında her bir grupta 6 hayvan modelin incelenmesiyle birlikte çok sayıda denek üzerinden veri elde edilip sonuçlara ulaşılmıştır. Literatürdeki benzer çalışmalarda genel olarak az sayıda insan ve hayvan ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın bir diğer güçlü yanı olarak da enjeksiyonlarda belirlediğimiz BTX-A doz ve doz aralıklarının insanlarda klinik uygulamalarda önerilen tedavi aralıklarına ve vücut ağırlığına uygun olarak hesaplanıp uygulanmasıdır. Çalışmalarda genellikle BTX-A uygulamalarında doz seçimi ve uygulama aralıklarının insanlarda klinikte önerilen doza uygun olmadığı dolayısıyla sonuçlarda da farklılıklara yol açtığı görülmektedir.

Çalışmamızda bazı kısıtlılıklar bulunmaktadır. Bu çalışmada BTX-A uygulanan ratlarda sadece uygulama yapılan gastroknemius kas dokusu incelemeleri yapıldı. BTX-A toksinin etkisinin, enjeksiyon bölgesinden artan mesafe ile azalmakla birlikte uygulama alanı dışındaki uzak kaslarda da kas zayıflığına yol açabileceği bilinmektedir (45–48). Dolayısıyla gelecekte yapılacak çalışmalarda BTX-A enjeksiyonu yapılan kas dokusuyla birlikte komşu kaslar ve kontrolateral kas dokusunun da değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın bir

diğer kısıtlılığı olarak da enjeksiyon yapılan ratlara enjeksiyon sonrası egzersiz yaptırılmamıştır. Güçlendirme egzersizlerinin kasta hipertrofiyle birlikte kas gücünü artırdığı ve BTX-A tedavisiyle birlikte egzersiz programlarının, kasların gücü ve fonksiyonu üzerine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (76). Dolayısıyla BTX-A enjeksiyonları sonrası kas üzerine görülen olumsuz etkilerin egzersiz ile önlenmesi veya geri döndürölmesi ileriki araştırmalarda aydınlatılması gereken bir nokta olarak çalışılmalıdır.

6. SONUÇLAR

Günümüzde BTX-A birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakla birlikte her geçen gün kullanım alanı da yapılan çalışmalarla artmaktadır. BTX-A etkisi zamanla kaybolmasına bağlı olarak tekrarlayan enjeksiyonlar olarak uygulanmaktadır. Etki mekanizması iyi bilinmesine karşın uygulamaları sonucunda özellikle kas yapısında uzun dönem üzerine yaptığı etkileri net bilinmemektedir. Çalışmamızla tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının kas dokusu üzerine hem 1. ay hem de 6. ay üzerine etkileri gösterilmiş olup literatüre ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara bu yönüyle katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızda BTX-A enjeksiyonunun kas atrofisi, kontraktıl materyal kaybı, histolojik hasar, apoptozis, inflamatuvar hücre infiltrasyonuna yol açtığı görülmüştür. Kasta 1. ay üzerine bu bulgular daha belirgin olmak üzere 6. ayda da kaybolmadığı saptanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarıyla kasta gelişen atrofinin, kontraktıl materyal kaybının, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun, histolojik hasarın, apoptozisin beklenen normal değerlerine dönmek için ne kadar süreceği net görülememektedir. Ayrıca BTX-A'ya bağlı gelişen bu etkilerin geri döndürülebilir olup olmadığı ve kasta ne zaman tam iyileşmenin mümkün olabileceği bilinmemektedir.

BTX-A toksine karşı antikor gelişimini önlemek ve etkisinin zamanla kaybolmasına da bağlı olarak 3-6 ay aralıklarla enjeksiyonları önerilmektedir (10,77). Çalışmamızda ilk BTX-A enjeksiyonu ile birlikte kasta olumsuz etkiler saptanmakla birlikte, 3'er ay arayla tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarıyla kasta atrofi, kontraktıl materyal kaybı, histolojik hasar üzerine etkilerin giderek arttığı hatta geç dönemde de (6. ayda) tekrar sayısı ile birlikte bu etkilerin artarak devam ettiği saptanmıştır. Dolayısıyla 3'er ay arayla BTX-A enjeksiyonlarının tekrarlanması, her bir enjeksiyona bağlı kasta kontraktıl materyal kaybı, histolojik hasar üzerine etkilerinin kısmi olarak iyileşmesine yönelik yeterli bir süre olmadığını düşündürmektedir.

Literatürdeki çalışmaların çoğu BTX-A'nın anti-inflamatuvar etkilerini desteklemekle birlikte çalışmamızla BTX-A uygulamasının inflamatuvar yönünün de olduğu, gelecekte sitokinlerin de değerlendirildiği çalışmalara BTX-A ile

inflamasyon ilişkisine ışık tutulması gerektiği gösterilmiştir. Çalışma sürecinde uzun dönem üzerine etkilerin değerlendirilmesine yönelik enjeksiyon sonrası 6. ayda kas dokusu örnekleri alınmıştır. Gelecekteki çalışmalarda BTX-A enjeksiyonuna bağlı gelişen bu etkilerin geri döndürülebilir olup olmadığı ve geri dönüşümlü ise ne zaman olabileceğine yönelik çalışmalar yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, BTX-A klinikte tedavi uygulamalarında kasta atrofi, kontraktıl materyal kaybı, histolojik hasar, apoptozis, inflamatuvar hücre infiltrasyona neden olduğun bilinmesinin özelliklede sık enjeksiyon uygulamalarından kaçılması uygun olacaktır.

ÖZET

RATLARDA TEKRARLAYAN BOTULİNÜM TOKSİN TİP A ENJEKSİYONLARININ KAS YAPISI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Bu çalışmada tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarının kısa ve uzun dönemde kas üzerine olan etkilerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Yöntem ve Gereçler: Çalışma 42 adet 12 haftalık erkek Wistar rat üzerinde gerçekleştirildi. Her grupta 6 rat olmak üzere 7 grup oluşturuldu. Ratların sağ gastroknemius kasına enjeksiyon yapıldı. BTX-A gruplarına tek, 2 ya da 3 kez olmak üzere 3 ay arayla 3 U/kg BTX-A enjeksiyonu, kontrol grubuna da eşit hacimde serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyon sonrası 1. ve 6. aylarda ötenaziyi takiben sağ gastroknemius dokusu alındı ve ağırlık ölçümü yapıp atrofi açısından değerlendirildi. Kas dokusu ışık mikroskopunda incelenerek kontraktıl materyal, kas liflerinde dejenerasyon, apoptozis ve kas dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonuna yönelik incelemeler yapıldı. Sonuçlarda gruplar arasındaki fark Kruskal Wallis Testiyle analiz edildi.

Bulgular: BTX-A enjeksiyonlarının kas kütlesinde ve kontraktıl materyalde azalmayla birlikte, kas liflerinde dejenerasyona, apoptozise ve kas dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonuna yol açtığı görülmüştür. Enjeksiyon sonrası 1. ayda kasta bu bulgular daha belirgin olmak üzere 6. ayda da kaybolmadığı saptanmıştır. Tekrarlayan BTX-A enjeksiyonlarıyla birlikte kasta atrofi, kontraktıl materyal kaybı, histolojik hasar üzerine etkilerin giderek arttığı hatta geç dönemde de (6. ayda) tekrar sayısı ile birlikte bu etkilerin artarak devam ettiği saptanmıştır.

Sonuç: BTX-A uygulamalarının kasta atrofi, kontraktıl materyal kaybı, histolojik hasar, apoptozis, inflamatuvar hücre infiltrasyona neden olduğu ve bu etkinin tedaviden 6 altı ay sonra da tam olarak düzelmediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Botulinum toksin tip A, kas atrofi, kas hasarı, inflamasyon, apoptozis

ABSTRACT

THE EFFECTS OF RECURRENT BOTULINUM TOXIN TYPE A INJECTIONS ON MUSCLE STRUCTURE IN RATS

Objective: The aim of this study is to reveal the short and long term effects of repeated BTX-A injections on the skeletal muscle.

Materials and methods: The study was performed on 42 male (12 weeks old) Wistar rats. Rats were divided into seven groups, including 6 rats in each group. Injection was made into the right gastrocnemius muscle of rats. BTX-A groups rats received once, twice and three times injections at intervals of 3 months with 3 U/kg BTX-A while control group rats received volume matched saline injections. Right gastrocnemius tissue was taken following euthanasia at the 1st and 6th months after injection thereafter weight was measured and evaluated for atrophy. Muscle tissue was examined under light microscope and investigations were made for contractile material, degeneration in muscle fibers, apoptosis and mononuclear cell infiltration in muscle tissue. Kruskal Wallis Test was used to determine group differences in outcome measures.

Results: It was found that BTX-A injections lead to degeneration of muscle fibers, apoptosis and mononuclear cell infiltration in muscle tissue as well as decrease in muscle mass and contractile material. These results were more pronounced in the muscle in the 1st month after the injection and did not disappear in the 6th month. With repeated BTX-A injections the effects on muscle atrophy, loss of contractile material and histological damage gradually increased even in the long term (6th month). These effects continued to increase with the number of repetitions.

Conclusion: It was determined that BTX-A injections caused muscle atrophy, loss of contractile material, histological damage, apoptosis, inflammatory cell infiltration and this effect did not fully recover within six months of after the treatment.

Keywords: Botulinum toxin type A, muscle atrophy, muscle damage, inflammation, apoptosis

KAYNAKLAR

1. Koman LA, Mooney JF 3rd, Smith BP, Walker F, Leon JM. Botulinum toxin type A neuromuscular blockade in the treatment of lower extremity spasticity in cerebral palsy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. BOTOX Study Group. *J Pediatr Orthop*. 2000;20(1):108–15.
2. Bakheit AM, Pittock S, Moore AP, Wurker M, Otto S, Erbguth F, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and safety of botulinum toxin type A in upper limb spasticity in patients with stroke. *Eur J Neurol*. 2001 Nov;8(6):559–65.
3. Heinen F, Desloovere K, Schroeder AS, Berweck S, Borggraeve I, van Campenhout A, et al. The updated European Consensus 2009 on the use of Botulinum toxin for children with cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2010 Jan;14(1):45–66.
4. Molenaers G, Van Campenhout A, Fagard K, De Cat J, Desloovere K. The use of botulinum toxin A in children with cerebral palsy, with a focus on the lower limb. *J Child Orthop*. 2010 Jun;4(3):183–95.
5. Koman LA, Mooney JF 3rd, Smith B, Goodman A, Mulvaney T. Management of cerebral palsy with botulinum-A toxin: preliminary investigation. *J Pediatr Orthop*. 1993;13(4):489–95.
6. Figgitt DP, Noble S. Botulinum toxin B: a review of its therapeutic potential in the management of cervical dystonia. *Drugs*. 2002;62(4):705–22.
7. Montecucco C, Molgó J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*. 2005 Jun;5(3):274–9.
8. Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev*. 2017 Apr;69(2):200–35.
9. Ward AB, Aguilar M, De Beyl Z, Gedin S, Kanovsky P, Molteni F, et al. Use of botulinum toxin type A in management of adult spasticity--a European consensus statement. *J Rehabil Med*. 2003 Mar;35(2):98–9.

10. Simpson DM, Gracies J-M, Graham HK, Miyasaki JM, Naumann M, Russman B, et al. Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of spasticity (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2008 May;70(19):1691–8.
11. Olvey EL, Armstrong EP, Grizzle AJ. Contemporary pharmacologic treatments for spasticity of the upper limb after stroke: a systematic review. *Clin Ther*. 2010 Dec;32(14):2282–303.
12. Ney JP, Joseph KR. Neurologic uses of botulinum neurotoxin type A. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007 Dec;3(6):785–98.
13. Girlanda P, Vita G, Nicolosi C, Milone S, Messina C. Botulinum toxin therapy: distant effects on neuromuscular transmission and autonomic nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992 Sep;55(9):844–5.
14. Ansved T, Odergren T, Borg K. Muscle fiber atrophy in leg muscles after botulinum toxin type A treatment of cervical dystonia. *Neurology*. 1997 May;48(5):1440–2.
15. Stone A V, Ma J, Callahan MF, Smith BP, Garrett JP, Smith TL, et al. Dose- and volume dependent-response to intramuscular injection of botulinum neurotoxin-A optimizes muscle force decrement in mice. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2011 Nov;29(11):1764–70.
16. Ma J, Elsaidi GA, Smith TL, Walker FO, Tan KH, Martin E, et al. Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection: an animal model study. *Am J Phys Med Rehabil*. 2004 Oct;83(10):773–4.
17. Fortuna R, Vaz MA, Youssef AR, Longino D, Herzog W. Changes in contractile properties of muscles receiving repeat injections of botulinum toxin (Botox). *J Biomech*. 2011 Jan;44(1):39–44.
18. Paulsen DF. *Histology and Cell Biology Examination and Board Review*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010. 131–139 p.
19. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th ed. New

York: McGraw-Hill Education; 2016. 195 p.

20. Ross MH. Histology: With Correlated Cell and Molecular Biology. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2016. 314–351 p.
21. Dongmei Cui M. Atlas of Histology with functional correlations. First. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 102 p.
22. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. Clin Microbiol Rev. 2006 Apr;19(2):298–314.
23. Peck MW. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. Adv Microb Physiol. 2009;55:183–265,320.
24. Nigam PK, Nigam A. Botulinum toxin. Indian J Dermatol. 2010;55(1):8–14.
25. BURGEN AS V, DICKENS F, ZATMAN LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. J Physiol. 1949 Aug;109(1–2):10–24.
26. Li B, Peet NP, Butler MM, Burnett JC, Moir DT, Bowlin TL. Small molecule inhibitors as countermeasures for botulinum neurotoxin intoxication. Molecules. 2010 Dec;16(1):202–20.
27. Sellin LC. The pharmacological mechanism of botulism. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 1985;6:80–2. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165614785900331>
28. Dressler D, Saberi FA, Barbosa ER. Botulinum toxin: mechanisms of action. Arq Neuropsiquiatr. 2005 Mar;63(1):180–5.
29. Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. Emerg Infect Dis. 2005 Oct;11(10):1578–83.
30. Hoffman RO, Helveston EM. Botulinum in the treatment of adult motility disorders. Int Ophthalmol Clin. 1986;26(4):241–50.
31. Münchau A, Bhatia KP. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. BMJ. 2000 Jan;320(7228):161–5.
32. Benedetto A V. The cosmetic uses of Botulinum toxin type A. Int J Dermatol. 1999 Sep;38(9):641–55.

33. Odergren T, Hjaltason H, Kaakkola S, Solders G, Hanko J, Fehling C, et al. A double blind, randomised, parallel group study to investigate the dose equivalence of Dysport and Botox in the treatment of cervical dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998 Jan;64(1):6–12.
34. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1980;17(1):21–5.
35. Koman LA, Iii JFM, Smith B, Ph D, Goodman A, Mulvaney T. Management of Cerebral Palsy with Botulinum-A Toxin : Preliminary Investigation. 1993;
36. Priori A, Berardelli A, Mercuri B, Manfredi M. Physiological effects produced by botulinum toxin treatment of upper limb dystonia. Changes in reciprocal inhibition between forearm muscles. *Brain*. 1995 Jun;118 (Pt 3):801–7.
37. Cuillière C, Ducrotté P, Zerbib F, Metman EH, de Looze D, Guillemot F, et al. Achalasia: outcome of patients treated with intrasphincteric injection of botulinum toxin. *Gut*. 1997 Jul;41(1):87–92.
38. Maria G, Cassetta E, Gui D, Brisinda G, Bentivoglio AR, Albanese A. A comparison of botulinum toxin and saline for the treatment of chronic anal fissure. *N Engl J Med*. 1998 Jan;338(4):217–20.
39. Shelley WB, Talanin NY, Shelley ED. Botulinum toxin therapy for palmar hyperhidrosis. *J Am Acad Dermatol*. 1998 Feb;38(2 Pt 1):227–9.
40. Rollnik JD, Tanneberger O, Schubert M, Schneider U, Dengler R. Treatment of tension-type headache with botulinum toxin type A: a double-blind, placebo-controlled study. *Headache*. 2000 Apr;40(4):300–5.
41. Bhatia KP, Münchau A, Brown P. Botulinum toxin is a useful treatment in excessive drooling in saliva. Vol. 67, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1999. p. 697.
42. Spósito MMM. New indications for botulinum toxin type A in treating facial wrinkles of the mouth and neck. *Aesthetic Plast Surg*. 2002;26(2):89–98.
43. Coté TR, Mohan AK, Polder JA, Walton MK, Braun MM. Botulinum toxin type A injections: adverse events reported to the US Food and Drug

- Administration in therapeutic and cosmetic cases. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Sep;53(3):407–15.
44. Naumann M, Jankovic J. Safety of botulinum toxin type A: a systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin*. 2004 Jul;20(7):981–90.
 45. Yeh Y-T, Peng J-H, Peng H-LP. Literature review of the adverse events associated with botulinum toxin injection for the masseter muscle hypertrophy. *J Cosmet Dermatol*. 2018 Oct;17(5):675–87.
 46. Paget SP, Swinney CM, Burton KLO, Bau K, O’Flaherty SJ. Systemic adverse events after botulinum neurotoxin A injections in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2018 Nov;60(11):1172–7.
 47. Bhatia KP, Münchau A, Thompson PD, Houser M, Chauhan VS, Hutchinson M, et al. Generalised muscular weakness after botulinum toxin injections for dystonia: a report of three cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999 Jul;67(1):90–3.
 48. Bakheit AM, Ward CD, McLellan DL. Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: a report of two cases. Vol. 62, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1997. p. 198.
 49. Glanzman RL, Gelb DJ, Drury I, Bromberg MB, Truong DD. Brachial plexopathy after botulinum toxin injections. *Neurology*. 1990 Jul;40(7):1143.
 50. Narayanan UG. Botulinum toxin: does the black box warning justify change in practice? *Dev Med Child Neurol*. 2011 Feb;53(2):101–2.
 51. Hm O, Sc R. Botulinum Toxin Deaths: What is the Fact? *J Cutan Aesthet Surg*. 2008 Jul;1(2):95–7.
 52. Kuehn BM. FDA Requires Black Box Warnings on Labeling for Botulinum Toxin Products. *JAMA* [Internet]. 2009 Jun 10;301(22):2316. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2009.780>
 53. Schroeder AS, Ertl-Wagner B, Britsch S, Schröder JM, Nikolin S, Weis J, et al. Muscle biopsy substantiates long-term MRI alterations one year after a

single dose of botulinum toxin injected into the lateral gastrocnemius muscle of healthy volunteers. *Mov Disord.* 2009 Jul;24(10):1494–503.

54. Van Campenhout A, Verhaegen A, Pans S, Molenaers G. Botulinum toxin type A injections in the psoas muscle of children with cerebral palsy: muscle atrophy after motor end plate-targeted injections. *Res Dev Disabil.* 2013 Mar;34(3):1052–8.
55. Koerte IK, Schroeder AS, Fietzek UM, Borggräfe I, Kerscher M, Berweck S, et al. Muscle atrophy beyond the clinical effect after a single dose of OnabotulinumtoxinA injected in the procerus muscle: a study with magnetic resonance imaging. *Dermatologic Surg Off Publ Am Soc Dermatologic Surg [et al].* 2013 May;39(5):761–5.
56. Williams SA, Reid S, Elliott C, Shipman P, Valentine J. Muscle volume alterations in spastic muscles immediately following botulinum toxin type-A treatment in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2013 Sep;55(9):813–20.
57. Barber L, Hastings-Ison T, Baker R, Kerr Graham H, Barrett R, Lichtwark G. The effects of botulinum toxin injection frequency on calf muscle growth in young children with spastic cerebral palsy: a 12-month prospective study. *J Child Orthop.* 2013 Nov;7(5):425–33.
58. Alexander C, Elliott C, Valentine J, Stannage K, Bear N, Donnelly CJ, et al. Muscle volume alterations after first botulinum neurotoxin A treatment in children with cerebral palsy: a 6-month prospective cohort study. *Dev Med Child Neurol.* 2018 Nov;60(11):1165–71.
59. Albavera-Hernández C, Rodríguez JM, Idrovo AJ. Safety of botulinum toxin type A among children with spasticity secondary to cerebral palsy: a systematic review of randomized clinical trials. *Clin Rehabil.* 2009 May;23(5):394–407.
60. Barrett RS. What are the long-term consequences of botulinum toxin injections in spastic cerebral palsy? *Dev Med Child Neurol.* 2011 Jun;53(6):485.

61. Gough M, Fairhurst C, Shortland AP. Botulinum toxin and cerebral palsy: time for reflection? *Dev Med Child Neurol*. 2005 Oct;47(10):709–12.
62. Mathevon L, Michel F, Decavel P, Fernandez B, Parratte B, Calmels P. Muscle structure and stiffness assessment after botulinum toxin type A injection. A systematic review. *Ann Phys Rehabil Med*. 2015 Dec;58(6):343–50.
63. Frick CG, Richtsfeld M, Sahani ND, Kaneki M, Blobner M, Martyn JAJ. Long-term effects of botulinum toxin on neuromuscular function. *Anesthesiology*. 2007 Jun;106(6):1139–46.
64. Tsai F-C, Hsieh M-S, Chou C-M. Comparison between neurectomy and botulinum toxin A injection for denervated skeletal muscle. *J Neurotrauma*. 2010 Aug;27(8):1509–16.
65. Fortuna R, Vaz MA, Sawatsky A, Hart DA, Herzog W. A clinically relevant BTX-A injection protocol leads to persistent weakness, contractile material loss, and an altered mRNA expression phenotype in rabbit quadriceps muscles. *J Biomech*. 2015 Jul;48(10):1700–6.
66. Ma F, Zhai Z, Zhu S, Tang S. Ultrastructural changes in human masseter muscles after botulinum neurotoxin a injection. *Muscle Nerve*. 2018 Jan;57(1):96–9.
67. Dodd SL, Selsby J, Payne A, Judge A, Dott C. Botulinum neurotoxin type A causes shifts in myosin heavy chain composition in muscle. *Toxicon*. 2005 Aug;46(2):196–203.
68. Legerlotz K, Matthews KG, McMahon CD, Smith HK. Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve*. 2009 Apr;39(4):472–9.
69. Arnon SS, Schechter R, Inglesby T V, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001 Feb;285(8):1059–70.
70. Valentine J, Stannage K, Fabian V, Ellis K, Reid S, Pitcher C, et al. Muscle

histopathology in children with spastic cerebral palsy receiving botulinum toxin type A. *Muscle Nerve*. 2016 Mar;53(3):407–14.

71. Han SB, Kim H, Cho SH, Chung JH, Kim HS. Protective Effect of Botulinum Toxin Type A Against Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *Dermatologic Surg Off Publ Am Soc Dermatologic Surg* [et al]. 2017 Apr;
72. Wang L, Wang K, Chu X, Li T, Shen N, Fan C, et al. Intra-articular injection of Botulinum toxin A reduces neurogenic inflammation in CFA-induced arthritic rat model. *Toxicon*. 2017 Feb;126:70–8.
73. Ausk BJ, Worton LE, Smigiel KS, Kwon RY, Bain SD, Srinivasan S, et al. Muscle paralysis induces bone marrow inflammation and predisposition to formation of giant osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017 Nov;313(5):C533–40.
74. Watanabe T, Masago T, Miyagawa I. Apoptotic action of botulinum toxin on detrusor muscle in rats. *Urol Int*. 2010;84(3):341–6.
75. Moon Y-M, Kim M-K, Kim S-G, Kim T-W. Apoptotic action of botulinum toxin on masseter muscle in rats: early and late changes in the expression of molecular markers. *Springerplus*. 2016;5(1):991.
76. Williams SA, Elliott C, Valentine J, Gubbay A, Shipman P, Reid S. Combining strength training and botulinum neurotoxin intervention in children with cerebral palsy: the impact on muscle morphology and strength. *Disabil Rehabil*. 2013 Apr;35(7):596–605.
77. Graham HK, Aoki KR, Autti-ra I, Boyd RN, Delgado MR, Gaebler-spira DJ, et al. Recommendations for the use of botulinum toxin type A in the management of cerebral palsy. 2000;11:67–79.