



**MERAM
TIP FAKÜLTESİ**

**T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA POLİDİOKSANON İP, HYALURONİK ASİT DOLGU VE
BOTULİNUM TOKSİN-A UYGULAMALARININ DERİ VE BAĞ DOKUSU İLE
FOTOYAŞLANMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. KORAY DURMAZ

UZMANLIK TEZİ

KONYA

2020

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA POLİDİOKSANON İP, HYALURONİK ASİT DOLGU VE
BOTULİNUM TOKSİN-A UYGULAMALARININ DERİ VE BAĞ DOKUSU İLE
FOTOYAŞLANMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. KORAY DURMAZ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. RECEP DURSUN

KONYA,2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm, saygıdeğer hocam ve tez danışmanım

Prof. Dr. Recep Dursun'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve mesleki deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen, çalışmaktan büyük memnuniyet duyduğum hocalarım anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Şükrü Balevi'ne, Prof. Dr. Recep Dursun, Doç. Dr. Arzu Ataseven, Doç. Dr. Munise Daye ve Dr. Öğr. Üyesi İlkay Özer'e,

Tezime PCR çalışmasında katkıda bulunan Doç. Dr. Gül Dursun ve Araş. Gör. İlknur Çınar'a,

Histopatolojik incelemede katkıda bulunan Doç. Dr. Sıddıka Fındık ve teknik personele,

Tezimin istatistiksel analizine katkılarından ötürü Öğr. Görevlisi Sinan İyisoy'a,

KONÜDAM deneysel tıp merkezinden Dr. Rahim Kocabaş'a,

Sevgili asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin tüm hemşirelerine, personellerine ve sekreterlerine,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, hayatım boyunca sevgi, şefkat ve desteklerini esirgemeyen yaşama sebebim canım anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından 191518006 proje numarası ile ve Türk Dermatoloji Derneği tarafından uzmanlık tezi bursu ile desteklenmiştir.

DR. KORAY DURMAZ TEMMUZ 2020



Başkomutan Mareşal Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e

ÖZET

SIÇANLARDA POLİDİOKSANON İP, HYALURONİK ASİT DOLGU VE BOTULİNÜM TOKSİN-A UYGULAMALARININ DERİ VE BAĞ DOKUSU İLE FOTOYAŞLANMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Koray Durmaz, Uzmanlık Tezi, Konya 2020

Amaç

Bu projede polidoksanon (PDO) ip, hyaluronik asit (HA) dolgu ve botulinum toksin-A (BTX-A) uygulamaları tek ve kombin kullanım yoluyla değerlendirilmiş olup, deri ve derialtı dokuda oluşturdıkları olumlu ya da olumsuz değişimler, kombine uygulamalarında birbirleri üzerindeki sinerjistik ya da antagonistik etkileri, ultraviolet (UV) maruziyetiyle oluşan fotohasar ve fotoyaşlanma süreçlerinde bu etkilerin nasıl değişeceği incelenmiştir. Bu sayede insan derisindeki yaşlanmada seçilecek yöntemle karar verilmesi için bakış açısı oluşturulması hedeflenmiştir.

Yöntem

Projemizde Wistar albino sıçanlar (2-5 aylık, 200-250 g ağırlığında, erkek, 20 adet 10'arlı 2 grup) çalışmaya alınmıştır. Sıçanların bakım ve beslenmeleri Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Tüm sıçanların sırt derisi 5 eşit parçaya bölünüp 1-2-3-4-5 olarak numaralandırılmış ve sırt bölgeleri tıraşlandıktan sonra uygun anestezi ajanla genel anesteziye alınmışlardır. 1 nolu alan kontrol alanı olup buraya ip'siz iğne derialtına uygulanıp çıkarılmıştır. 2.alana PDO ip uygulaması deri altında Panniculus carnosus (PC) bölgesine uygulanmıştır. 3.alana HA maddesi intradermal dolgu olarak 0.02 ml uygulanmıştır. 4.alana PDO ip uygulaması ve aynı seansta HA 0.02 ml uygulaması yapılmıştır. 5.alana ise PDO ip ile beraber aynı seansta HA 0.02 ml ve BTX-A 1U olarak uygulanmıştır. İkinci gruptaki 10 sıçana ise aynı işlemler yine tek seferlik uygulanıp 320-400 nm dalga boyunda UVA, 138 mJ/cm² ve 290-320 nm dalga boyu olan UVB 130 mJ/cm² haftada 3 gün olmak üzere 12 hafta boyunca uygulanmıştır. Her 2 gruptaki sıçanların genel durumu haftalık olarak kontrol edilmiştir. Uygulama bölgeleri (ip aksında) ve çevresini de kapsayan doku örnekleri, transvers kesit histolojik değerlendirme ve PCR ekspresyon analizi için 5 mm punch biyopsi işlemi ile başlangıçta, 4. ve 12. haftalarda elde edilmiştir. Histopatolojik olarak epidermis ve dermis

kalınlıkları, dermisteki kollagen ve elastinin kalitatif düzeyleri ve dizilimleri, neokollagenez ve yeni elastin sentezi, yabancı cisim granulomları, fibröz kapsül yapısı, histiosit ve dev hücre formasyonu, fibroblast sayıları, inflamatuvar hücreler incelenmiş ve kıyaslamalı olarak değerlendirilmiştir. Kollagen 1 (Col1A1), Kollagen-3 (Col3A1), elastin, matriks metalloproteinaz (MMP) 2 ve 9, Nüklear faktör kappa B (NF-κB), interlökin-6 (IL-6) değerleri RT-QPCR ile ölçülmüştür. İstatistiksel hesaplamalarda histopatolojik değerlendirme için SAS University Edition 9.4 programı kullanılarak yapılmış ve RT-qPCR analizi için web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programı kullanılmıştır. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışma 18 sıçanla tamamlanmıştır. Histopatolojik olarak solar elastoz UV alan grupta anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Tüm uygulama alanlarında kollajenin kalitatif düzeyi ve organizasyonu kontrol alanı olan 1. alana kıyasla yüksek bulunmuştur. UV alan deney grubunda UV almayan kontrol gruba kıyasla kollajen histopatolojik olarak daha az ve daha dezorganize saptanmıştır. PCR incelemede Col1A1 ve Col3A1 düzeylerinde UV uygulamasının etkisiyle anlamlı düşüşler gözlenmiştir. İnflamasyon ve vaskülarizasyonda kontrol alana göre materyal uygulanan alanlarda anlamlı artışlar gözlenmiştir. Histopatolojik olarak kapsül yapısı, dev hücre granülomu ve yabancı cisim reaksiyonu da madde uygulanan alanlarda gözlenmiş ve gösterilmiştir.

Sonuç

Çalışma neticesinde yaşlanma ve fotoyaşlanmada etkili olabilecek PDO ip uygulama, HA dolgu maddesi ve BTX-A'nın deri ve derialtı dokuda meydana getirdikleri reaksiyonlar neticesinde kollajen liflerinin organize düzenlenmesi ve ekspresyonlarını artırması gösterilmiştir. Fotoyaşlanmayı gösteren solar elastozda ve NF-KB ekspresyonunda artış, tip 1 ve tip 3 kollajen düzeylerinde ise azalış anlamlı olarak gösterilmiştir. UV uygulanan grupta (fotoyaşlanma) tek başına dolgu uygulamasının, UV almayan grupta (fizyolojik yaşlanma) ip+dolgu kombine uygulamasının kronik dönemde (12.hafta) antiaging olarak daha efektif sonuçlar getirdiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polidioksanon İp; Botulinum Toksin, Tip A; Dermal Dolgular; Ultraviyole Işınları; Wistar Ratlar; Deri Yaşlanması

Proje No:191518006

Destek Veren Kuruluş: Türk Dermatoloji Derneği

ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF POLYDIOXANONE THREAD, HYALURONIC ACID FILLER AND BOTULINUM TOXIN-A TREATMENTS ON THE RATS SKIN, CONNECTIVE TISSUE AND PHOTOAGING

Dr. Koray Durmaz, Master Thesis, Konya 2020

Objective

This project evaluates polydioxanone (PDO) thread, hyaluronic acid (HA) injection and botulinum toxin type A (BTX-A) practices via single and combined use and analyzes their positive or negative effects on skin and subcutaneous tissue, the synergistic or antagonistic impacts they have on each other during combined application and how these impacts may change during photo damage and photo aging processes caused by UV exposition. It is aimed to create a perspective to make a decision about the method on aging of human skin.

Materials and Methods

Our project includes Wistar albino rats (2-5 months, weighing 200-250 g, male, and 2 groups consisting of 10). The rats were taken care of and fed in Experimental Medicine Application and Research Centre (KONUDAM) in Necmettin Erbakan University. The skin on the back of all rats were separated into 5 equal parts and given numbers from 1 to 5. After shaving their backs, general anesthesia was induced through a suitable anesthetic agent. Area No. 1 is the control area and thread without needle was applied under the skin and removed from this location. On the Area No. 2, PDO thread application was realized on panniculus carnosus (PC) area of the rats. On the Area No. 3, HA material was applied as 0.02 ml intradermal injection. On the Area No. 4, both PDO thread application and HA 0.02 ml application during the same session were realized. PDO thread and HA 0.02 ml and BTX-A 1U was applied on the Area No. 5 within the same session. The same procedures were applied on 10 rats in the second group only once and then 320-400 nm wavelength UVA 138 mj/cm² was applied 3 times per week, with combination of 290-320 nm wavelength UVB 130 mj/cm² for 12 weeks. The general conditions of the rats in both groups were checked on a weekly basis. The tissue samples including the areas of and around the application will initially be obtained during the 4th and 12th weeks through 5 mm punch biopsy for the histological evaluation of transverse section. Histopathologically epidermis and dermis thickness, qualitative levels and alignment of collagen and elastin in

dermis, neocollagenesis and new elastin synthesis, foreign body granulomas, fibrosis capsule structure, histiocyte and giant cell formation, fibroblast counts, inflammatory cells were examined and comparatively evaluated. Collagen 1, Collagen 3, elastin, MMP-2, MMP-9, NF- κ B, IL-6 gene expression levels were measured. In the statistical analysis, SAS University Edition 9.4 for the histopathological assessments and “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” for the RT-qPCR analysis were used. $p < 0.05$ value were accepted significant.

Results

The study was completed with 18 rats. Histopathologically, solar elastosis was significantly higher in the group receiving UV. The qualitative level and organization of collagen in all application areas were found to be higher compared to the control area 1. In the experimental group receiving UV, collagen was less histopathologically less and more disorganized than the non-UV control group. In the PCR examination, significant decreases were observed in Col1A1 and Col3A1 levels due to the effect of UV application. In inflammation and vascularization, significant increases were observed in the areas where the material was applied compared to the control area. Histopathologically, capsule structure, giant cell granuloma and foreign body reaction were also observed and demonstrated in the areas where the substances were applied.

Conclusion

As a result of the study, it has been shown that PDO thread application, HA filler and BTX-A, which may be effective in aging and photoaging, increase the organized regulation and increase the expression of the collagen fibers. An increase in solar elastosis and NF-KB expression, which shows photoaging, and a decrease in type 1 and type 3 collagen levels were shown to be significant. It was observed that the application of filler alone in the UV treated group (photoaging), and the combination of the application of thread + filler in the non-UV receiving group (physiological aging) brought more effective results in the chronic period (week 12) as antiaging.

Keywords: Polydioxanone thread; Botulinum Toxins, Type A; Dermal Fillers; Ultraviolet Rays; Rats, Wistar; Skin Aging

Project number: 19151800 **Supporting organization:** Turkish Society of Dermatology

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	ixx
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	15
2. GENEL BİLGİLER.....	17
2.1. TARİHÇE.....	18
2.1.1. Dolgunun tarihçesi.....	19
2.1.2. Botulinum toksin tarihçesi.....	20
2.1.3. İp uygulama tarihçesi.....	21
2.2. ETİYOPATOGENEZ.....	22
2.2.1. Yaşlanma fizyolojisi.....	22
2.2.2. Bağ dokusu.....	22
2.2.3. Kollajen.....	22
2.2.4. Proteoglikan.....	23
2.2.5. Elastin ve elastik lifler.....	24
2.2.6. Fibrillinler.....	24
2.2.7. Fibronektin.....	24
2.2.8. Laminin.....	24
2.2.9. Deri yaşlanması sürecinde bağ dokunun yeri ve önemi.....	24
2.2.10. UV hasarı ve fotoyaşlanma.....	26
2.2.11. Işık ve Deri ilişkisi.....	26
2.3. REJUVENASYON UYGULAMALARINDA DOLGU, BOTULİNUM TOKSİN VE İPLE ASKILAMA YÖNTEMLERİ.....	29
2.3.1. Dolgu Uygulama ve HA Dolgu Maddesi.....	29
2.3.2. Botulinum Toksin-A Uygulaması ve Antiaging Üzerine Etkileri.....	30

2.3.3.	İp Uygulama, Deri ve Bağ Dokusu Üzerinde PDO ipin etkileri.....	31
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
3.1.	Çalışmanın dizaynı ve etik onay süreci.....	33
3.2.	Çalışmada kullanılan hayvan, malzeme ve teknik ekipmanlar.....	34
3.2.1.	Sıçanlar (Ratlar).....	34
3.2.2.	Anestezik ajanlar ve anestezi yöntemi.....	37
3.2.3.	Dolgu.....	37
3.2.4.	Botulinum toksin-A.....	37
3.2.5.	İp.....	38
3.2.6.	UV Düzenegi.....	38
3.2.7.	Mikroskop Sistemi.....	39
3.2.8.	Histokimyasal boyalar.....	39
3.3.	DENEYİN UYGULANMA AŞAMASI.....	39
3.3.1	Sıçanların belirlenmesi ve hazırlanması.....	39
3.3.2.	Yapılan uygulamalar ve prosedür.....	40
3.3.3.	Doku Örneklerinin Elde Edilmesi ve Laboratuvar Ortamına Transportu.....	41
3.3.4.	Dokunun Patoloji Laboratuvarında Hazırlanması ve İncelenmesi.....	42
3.3.5.	PCR sistemi ve Gen Ekspresyon Analizi.....	43
3.3.5.1.	Dokudan Total RNA İzolasyonu.....	43
3.3.5.2.	Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması.....	43
3.3.5.3.	cDNA Sentezi.....	44
3.4.	İSTATİSTİK ve ANALİZ.....	45
3.4.1.	Histopatolojik Değerlendirme.....	45
3.4.2.	RT-qPCR Analizi.....	45
4.	BULGULAR.....	47
4.1.	Histopatolojik Değerlendirme.....	47
4.1.1.	Epidermal Kalınlık ve Dermal Kalınlık.....	47
4.1.2.	Solar Elastoz.....	48
4.1.3.	Kollajen içeriği ve düzeni.....	49
4.1.4.	İnflamasyon varlığı ve şiddeti değerlendirmesi.....	53
4.1.5.	Vaskülarizasyon varlığı ve şiddeti değerlendirmesi.....	55

4.1.6.	Dev Hücre ve Yabancı Cisim Granülomu.....	57
4.1.7.	Kapsül Benzeri Yapı Oluşumu	58
4.1.8.	MMP-2, MMP-9, IL-6, NF-KB Gen Ekspresyonlarının PCR analiziyle değerlendirilmesi.....	58
5.	TARTIŞMA.....	67
6.	Limitasyonlar.....	72
7.	SONUÇ.....	73
8.	Kaynaklar.....	74



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1	: Hedef ve referans genlerin primer dizileri
Tablo-2	: Histopatolojik kollajen düzeyi analizi
Tablo-3	: UV'ye göre histopatolojik kollajen düzeyleri analizi
Tablo-4	: Col1A1 ekspresyon analizi sonuçları
Tablo-5	: Col1A1 ekspresyonunda UV etkisi
Tablo-6	: Col3A1 ekspresyon analizi sonuçları
Tablo-7	: Col3A1 ekspresyonunda UV etkisi
Tablo-8	: MMP-2 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)
Tablo-9	: MMP-9 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)
Tablo-10	: NF-KB ekspresyon sonuçları (kat değişimi)
Tablo-11	: IL-6 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Resim-1	: Deneyde kullanılan Wistar albino sıçanlar
Resim-2	: Sıçanların barındırıldığı plastik kafesler
Resim-3	: UV düzeneği
Resim-4	: Sıçan sırtında uygulama alanları
Resim-5	: Dokuların elde edilmesi
Şekil-1	: Fotoyaşlanma modeli
Resim-6	: 0 ve 12. haftalardaki 1 nolu kontrol alanı histopatolojileri
Resim-7	: 4. ve 12. haftaya ait histopatolojik örneklerde fibrozis alanları
Şekil-2	: Col1A1 ekspresyonu (grafik)
Şekil-3	: Col3A1 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)
Resim-8	: 4 ve 12. haftalarda gözlenen inflamatuvar değişiklikler.
Resim-9	: 0, 4 ve 12. haftalarda vaskülarizasyondaki değişimler.
Resim-10	: Kapsül formasyonu ve granülom yapısının 4 ve 12. haftalardaki görünümü.
Şekil-4	: Agaroz jelde hedef gen dizilimi
Şekil-5	: MMP2 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)
Şekil-6	: MMP9 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)
Şekil-7	: NFkB ekspresyonunda UV etkisi (grafik)
Şekil-8	: IL-6 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)
Şekil-9	: Fotoyaşlanma modeli

SİMGELER VE KISALTMALAR

BTX-A	: Botulinum toksin-A
HA	: Hyaluronik asit
PDO	: Polidioksanon
UV	: Ultraviolet
PC	: Panniculus carnosus
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NF-κB	: Nüklear faktör kappa B
IL-6	: İnterlökin-6
Col1A1	: Kollajen-1
Col3A1	: Kollajen-3
ECM	: Ekstrasellüler matriks
GAG	: Glikozaminoglikan
ROR	: Reaktif oksijen radikalleri
PLLA	: Poli-L-laktik asid
TGF-B	: Transforming growth factor beta
COX	: Siklooksijenaz
LOX	: Lipooksijenaz
AP-1	: Aktivatör protein-1
SNARE	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
VAMP	: Vezikül ilişkili membran protein
SNAP-25	: Sinaptozom ilişkili protein
PLA	: Poli-laktik asit
SMAS	: Süperfisyel Müskülo-Aponörotik Sistem
H&E	: Hematoksilen&Eozin
MTK	: Masson Trikrom
EVG	: Elastika Von Gieson
Hx	: Hafta x
Ax	: Alan x
Rx	: Rat x

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri yaşlanması dermis ve epidermisteki incelme ile inflamasyon ve destek yapıdaki kaybın da bulunduğu kompleks, fizyolojik bir süreçtir. Dermal kollajen, HA ve elastinin zamanla azalması ile derinin elastikiyetinde kaybolma meydana gelir. Bu intrinsek yaşlanma sürecini sigara kullanımı, güneş hasarı gibi dış faktörler hızlandırır ve sonuçta yüz çizgileri ve kırışıklıklar meydana gelir. Fotoyaşlanma, bu süreci hızlandıran eksternal bir faktör olup, projemizde de bu amaçla kullanılmaktadır. Yüz ifadelerinin oluşumuna yarayan kaslardaki kasılma da dinamik kırışıklıkların oluşmasına zemin hazırlar. Antiaging de amaç deriyi sıkılaştırma, gerginleştirme, deri tonusunu koruma, parlaklığını artırma ve deride hücresel yenilenmeyi sağlamadır (1).

Son yıllarda deri gençleştirilmesinde ve kozmetik dermatolojide PDO ip, HA dolgu maddesi ve BTX-A uygulamaları popüler hale gelmiştir. PDO, dokuda eriyebilir bir ip materyali olup derinin kalitesini artırmak, kollajen üretimini artırmak, lifting/asma etkisi oluşturmak amacıyla yaşlanma karşıtı olarak kullanılmaktadır. Yerleştirilen iplerin çevresinde çapraz köprüler halinde kollajen oluşmakta ve fibröz köprüleme meydana gelmektedir. HA, dermal ekstrasellüler matrikste (ECM) bulunan, deriye yapısal destek ve besin sağlayan, derinin su tutma kapasitesini artırarak dolgunluk veren bir glikozaminoglikan (GAG) dır. Derideki kırışıklık ve kıvrımları doldurmak, statik kırışıklıkları gidermek amaçlı kullanılır (2). HA'in dermal yeniden şekillenme (remodelling) deki etkilerine yönelik literatürde az sayıda çalışma olup HA'in yalnızca dermiste bulunmasının değil aynı zamanda kollajen ve elastin üzerinde de sayı ve organize dizilim açısından anlamlı etkisini gösteren bulgular vardır (3). BTX, gram (+) anaerobik bir bakteri olan C.botulinum tarafından üretilir. Tedavi amaçlı en sık kullanılan serotip A'dır. BTX-A enjekte edildiği bölgede nöromusküler kavşakta presinaptik nörondan asetilkolin salınımını engeller ve geçici paraliziye yol açar. Yüzün özellikle üst 1/3'ünde meydana gelen ve mimik kaslarının kullanımına bağlı oluşan dinamik kırışıklıkların tedavisinde kullanılan BTX-A'nın dermal alandaki etkilerini gösteren az sayıda çalışma olup kollajen liflerin dizilimini iyileştirdiğine dair bulgular mevcuttur (4).

Yaptığımız bu çalışmada PDO ip uygulama, PDO ip + HA uygulama ve PDO ip + HA + BTX-A uygulamalarının sıçan derisi ve bağ dokusu üzerindeki etkinliklerini makroskopik ve histopatolojik olarak gözlemlemek, oluşturdukları dermal değişimleri incelemek ve UVA+UVB ile indüklenen fotohasar ve fotoyaşlanma süreçlerinde de olası

etkinliklerini saptamak, UV maruziyeti ve sonucunda oluşan fotohasar ve fotoyaşlanma sũrecinin de bu değişime olan iyi yũnde ya da olumsuz etkisinin de gũzlenmesi amaçlanmıştır. Bahsedilen ũç metod insanlarda zaten uygulanmakta olup bu projede karşılaştırmalı çalışması yapılarak hangi yũntem ya da kombinasyonun daha faydalı sonuç vereceği elde edilmek istenmektedir. Bu çalışmadan elde edilecek verilerin insanda yapılacak tedaviler için bir ũngũrũ oluşturması açısından ũnemlidir.



2. GENEL BİLGİLER

Deri yaşlanması, zamanın (intrensek) ve çevresel faktörlerin (ekstrensek) hücrel ve ekstrasellüler yapı üzerindeki etkilerinin kümülatif bir kombinasyonu ile oluşan fizyolojik bir süreçtir. İntrensek ve ekstrensek süreçler, deri yapısını ve işlevini aynı anda etkileyen, klinik ve biyolojik olarak iki bağımsız süreç olup ortak mekanizmaları, yeni yaşlanma karşıtı (antiaging) terapiler geliştirmek için benzersiz fırsatlar sağlayabilir (5, 6). İntrensek yaşlanma, biyolojik saate bağlıdır ve tıpkı diğer iç organlar gibi derimiz de bundan etkilenerek yavaş ve geri dönüşsüz doku dejenerasyonuna girer. İntrensek yaşlanmada telomer kısalmasının ve metabolik oksidatif hasarın major rol oynadığına inanılmaktadır (7). Ekstrensek yaşlanma derinin güneş ışınları gibi UV radyasyona maruziyetine ve çevresel kirliliğe bağlı gelişen bir süreçtir. Deride fotoyaşlanmaya bağlı olarak incelik, kuruma, kırışıklıklar, irregüler pigment değişiklikleri, telenjektaziler, solar elastoz ve çeşitli benign ve malign neoplazmlar görülebilmektedir. Fotoyaşlanmış deriye kıyasla intrensek yaşlı bir deri daha ince, daha eşit dağılımlı pigmentasyon gösteren ve daha yüksek laksiteli bir görünüme sahiptir (8). Hücrel düzeyde, deri yaşlanmasının en önemli göstergelerinden biri dermal ECM atrofisidir. ECM; kollajen lifler, mikrofibril ve elastik lif gibi üç ana yapısal bileşen ile proteoglikan ve GAG' lardan oluşan, derinin mimari temelini oluşturan bir yapı olarak işlev görür. Kollajen içeriğindeki azalma, deri hacmi ve derinin gerim kuvvetinde kayba yol açar, kırışıklıkların ortaya çıkmasıyla kendini gösterir. Elastik liflerde ve mikrofibrillerde azalma, deride gevşemeye ya da laksiteye yol açar. Proteoglikan ve GAG'larda azalma da derideki yaşlanma, hidrasyon kaybı ve hücre içi sinyal iletiminde bozulma gibi süreçlerde beklenir. Bu ECM değişiklikleri sırayla, her biri derinin fiziksel görünümüne zarar verebilecek olan hücrel yaşlanma, reaktif oksijen radikallerinin (ROR) ve proteolitik enzim üretimindeki artışa yol açarak deri yaşlanması sürecini tetikler (9).

2.1.TARİHÇE

İnsanlık her zaman ölüm ve yaşlılıktan endişe duymuştur ve bu, yaşamda kaçınılmaz bir şeydir. Yaşlandıkça canlılığımızı, zihinsel kapasitemizi ve güzelliğimizi kaybederiz. İnsanların yaşlanmaya (aging) veya yaşlanmayı tersine çeviren (antiaging) çözümlere odaklanıp araştırması tarih boyunca varolan ve şaşırtıcı olmayan bir süreç olmuştur. Efsaneler milattan önce (M.Ö.) 5. yüzyıla (yy) kadar uzanmaktadır. Yunan tarihçi Herodot, o zamanlarda Makrobiyenlerin ülkesinde özel bir su türü içeren bir çeşmeden bahsetmiş ve onlara olağanüstü uzun ömür verdiğini belirtmiştir. Yine efsaneye göre; 16. yy da, İspanyol kaşif Juan Ponce de León (1474-1521) yaşlanma sürecini tersine çevirebilen ve hastalığı iyileştirebilen büyülü bir su kaynağı olan Gençlik Çeşmesi'ni ararken Florida'yı keşfetmiştir. Ancak ne yazık ki gerçekte gençlik çeşmesi mevcut değildir. Yüzyıllar boyunca süregelen sayısız arayışlar ve çözüm yolları, insanların antiaging teknikler olarak adlandırılan yüz gençleşmesini (rejuvenasyon) sürdürmelerine ve hatta iyileştirmelerine yardımcı olmuştur. Temel olarak, yüz rejuvenasyonunda kozmetik / tıbbi tedaviler; diğer bir deyişle kremler, merhemler, kimyasal soyma, dermabrazyon, dolgu işlemleri veya invaziv cerrahi prosedürlerden faydalanılabilmektedir. Nispeten yakın bir dönemde piyasaya sürülen radyofrekans ve lazer uygulama gibi teknolojiye bağlı seçenekler de mevcuttur (10). Bebeklikten yaşlılığa kadar değişimsel anlamda evrim geçiren yüz anatomisi ve fizyolojisinde gençleştirmeyi amaçlayan cerrahi ve cerrahi olmayan teknikler, tarihsel olarak çoğunlukla ampirik olmuştur (11).

Yüzyıllar boyunca, sadece fizyolojik yaşlılıkta değil, güneşe aşırı maruz kalmanın bir sonucu olan yüz kırışıklıklarının düzeltilmesinde de antik Mısır dönemine dayanan sığla sakızı içeren mum bazlı bir karışım, moringa yağı, öğütülmüş Kıbrıs otu ve fermente bitki suları gibi tek başına veya kombinasyon halinde kozmetik amaçlı maddelerin kullanımı hakkında çok şey yazılmıştır. Rönesans'ta, İtalyan doktor Giovanni Marinelli (16. yy) tamamen kadınların güzelliğine ve bu güzelliğin kremler, merhemler ve diğer ilaçlarla nasıl korunacağına adanmış ilk ders kitabını yayımlamıştır. G.Marinelli, yüz kırışıklıkları için bakla ile karıştırılmış geyik boynuzu tozunun kullanılmasını önermiştir. Birkaç yıl sonra, Prof. Girolamo Mercuriale (1530-1606), kozmetik üzerine De Decoratione'yi yazmış ve burada vücudun görünümünü ve güzelliği iyileştirmenin nasıl mümkün olduğunu anlatmıştır. İngiliz doktor John Bulwer (1606-1656) ise kadın yüzünün mükemmelliğini takdir ederken, her türlü kozmetik tedaviye ve vücudun değiştirilmesine

karşı bir tavır sergilemiştir. 1653 yılında yayımlanan “Antropometamorföz...” adlı kitabı ise, insan zihninin kibirlilikten dolayı aptallığını göstermeye çalışan sayısız illüstrasyonla doludur (10).

2.1.1 Dolgunun Tarihçesi

Bazen trajik, genellikle de felaketle sonuçlanan enjekte edilebilirlerin (enjeksiyon) bir formu olan dolgunun tarihçesine bakıldığında, önemli bir Alman kimyager olan Baron Carl von Reichenbach (1788-1869) tarafından 1830'da keşfedilen parafin mumu, modern zamanlarda kullanılan ilk enjeksiyon malzemeydi. Parafini Viyanalı doktor Robert Gersuny (1844-1924), sifilizde sık görülen kıkırdak reabsorbsiyonuna sekonder sele burun deformitesinin düzeltilmesinde kullanmıştır. Ayrıca derin nasolabial kıvrımlarda, alın çizgilerinde, boyun kırışıklıklarında da uygulanmıştır. Bu süreçten sonra, parafin çeşitli kozmetik ve fonksiyonel uygulamalarda popülerite kazanmıştır. Bu malzemenin hazırlanması aşamasında kullanılan balmumu, yağ ve vazelin nedeniyle gelişen “parafinoma” olarak adlandırılan yabancı cisim reaksiyonu ve granülatöz reaksiyonlar tetiklenmiş, doku nekrozu, pulmoner emboli ve enfeksiyon tabloları gelişmiştir. Böylelikle ortaya çıkan komplikasyonlarla yeni mucize sönmeye başlamıştır. Parafin 1960'lara kadar burun, yüz ve memeye enjekte edilmeye devam etmiştir.

1893'te Neuber, kolladan aldığı yağ dokusunu yüz defektlerine transpante etmiştir. İlk kozmetik cerrahlardan biri olan Charles C. Miller (1880–1950), 1926'da *Cannula implants* kitabında dolguları ele almış ve Gutta-percha, selüloit veya kauçuk süngerlerin bir değirmende öğütüldükten sonra ısıtılarak çöküntülerin, kaz ayaklarının, nasolabial olukların ve eyer burunun düzeltilmesinde kullanımını önermiştir. Malzemeleri deri altına enjekte edebilmek için ise özel bir şırınga kullanmıştır. “Silikonların babası” olarak bilinen Amerikalı kimyager James Franklin Hyde (1903-1999), düşük toksisiteleri nedeniyle, saf silikonların kullanımına öncelik vermiştir. Kolayca sterilize edilebilen inert bir malzeme olarak kabul edilen, likit silikon dudakların dolgunluğunu arttırmak veya nazolabial kıvrımları düzeltmeden doğrudan kullanılmış olup ayrıca göğüs büyütmede de uygulanmıştır. Yine bu sürecin sonrasında renk değişikliği, enfeksiyon, migrasyon, “silikonoma” olarak adlandırılan granulom formasyonu oluşumu, dokularda sertleşme gibidramatik komplikasyonlarla karşılaşmıştır. Sıvı silikon 30 yılı aşkın bir süredir yumuşak doku artışı için Almanya, İsviçre ve Japonya'da kullanılmaktaydı. Yüz bölgesinde özellikle dudaklarda, alın çizgilerinde, kaz ayakları ve yanaklarda kullanımını

belgeleyen çok sayıda literatür mevcuttur. 1992 yılı Ocak ayında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından sıvı silikon enjeksiyonunun kullanımı durdurulmuştur.

1980'lere gelindiğinde sığır kollajeninin dolgu maddesi olarak kullanımıyla dolguda önemli bir aşama katedilmiştir (12). Son yıllarda ise dolgu maddeleri kullanılarak gençleştirme uygulamaları, hastaların da hızlı iyileşme ve minimal invaziv prosedür beklentisinin yükselmesiyle önemli derecede artış göstermiştir. Bu süreçte daha güvenli madde arayışlarıyla kollagen, poli-L-laktik asit (PLLA), hidroksiapatit, HA gibi dolgu malzemesi seçenekleri de ortaya çıkmıştır. Günümüzde, estetik yüz uygulamalarında dolgu maddeleri, en popüler minimal invaziv kozmetik prosedürlerden birini temsil etmektedir (10).

2.1.2 Botulinum Toksin Tarihçesi

“Mucize toksin” olarak da adlandırılan BTX, *Clostridium botulinum* bakterileri tarafından üretilen bir nörotoksin olup kasları geçici olarak felç ederek etki göstermektedir. Toksin, presinaptik nöronlardan asetilkolin salınımını bloke eder, böylece kas kasılmasından sorumlu sinir uyarılarını önleyerek paralizi oluşturur. Bu toksin tehlikeli bir gıda zehirlenmesi formu olan botulizmden sorumlu olup bugüne kadar sekiz farklı serotipi tanımlanmıştır (A, B, C1, C2, D, E, F ve G). A ve B tipi toksinler, insanda hastalığa neden olabilmektedir ve terapötik olarak da kullanılmaktadır. Bu iki serotip güzellik ve kozmetoloji alanında yoğun bir şekilde incelenmiş ve kullanılmıştır. BTX, glabellar çizgileri ve derin alın kırışıklıklarını, kaz ayaklarını ve perioral dudak çizgilerini azaltmak için estetik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Yine nasolabial oluklarda da bir seçenek olabilir (13).

BTX zehirlenmesi çok eski zamanlardan beri insanlığı etkilemiş gibi görünmektedir. Hint tarihi, Maharajas'ın sosislerden çıkarılan “zehir” i kullanarak düşmanlarını öldürdüğünü gösterir. Botulizmin ilk tarihsel tanımı 1735'e dayanır ve 1793'te Almanya'da, birkaç kişi pişmemiş sosis yedikten sonra ölmüştür. Bu gıda zehirlenmesinin, kan ve baharatlarla doldurulmuş domuz midesinden yapılan popüler bir yerel gıda olan “Blunzen” tüketiminin sonucunda olduğu kanısına varıldı. Alman doktor Justinus Christian Kerner (1786-1862) botulizmi ilk inceleyen kişiydi ve yeni toksini “sosis zehri” olarak adlandırdı. 1895'te Bakteriyojji Profesörü Emile Van Ermengem (1851–1932) *Clostridium botulinum* bakterisini jambondan ve kurbanların cesetlerinden izole etti. Latince sosis anlamına gelen “Botulus” kelimesine “Bacillus Botulinus” toksini adını verdi. Yirminci yüzyılın

başlarında, gıda konserve endüstrisi patlama yaşıyordu ve bununla birlikte BTX zehirlenme riskinde artış meydana gelmişti. 1944'te biyokimyacı Edward Schantz (1908-2005) *Clostridium botulinum*'u kültürde üretti ve toksini izole etti. Ek olarak, daha sonra toksinlerin farklı serotipleri keşfedildi (13). 1949'da Burgen'in grubu toksinin nöromüsküler iletimi engellediğini keşfetti. II. Dünya Savaşı yıllarında Carl Lamanna ve James Duff'un yaptığı araştırmalar, toksinin konsantrasyon ve kristalizasyon tekniklerinin keşfedilmesine yol açtı. FDA tarafından 1989'da BTX tip A 12 yaşından küçük çocuklarda şaşılık, blefarospazm ve hemifasiyal spazmı tedavi etmek için onayladı. FDA 2002 yılında, 1990'lı yıllarda estetik amaçlı çift kör çalışmalarda denenen BTX in glabellar çizgilerin görünümünü iyileştirmek için kozmetik amaçlı kullanımını onayladı; temmuz 2004'te de aksiller hiperhidrozun tedavisinde kullanımı kabul edildi. 2013 yılında FDA kaz ayağı çizgilerinin tedavisinde kozmetik amaçlı kullanım için BTX tip A'ya onay vermiştir; ayrıca kaş kaldırma ve depresyonunda, temporomandibular eklem bozukluklarında endikasyon dışı kullanımı mevcut olup günümüzde, bu toksin yaşlanma karşıtı tedavide uygun bir seçenektir. Aynı zamanda lazerler, cerrahi prosedürler ve dolgu maddeleri gibi diğer yaşlanma karşıtı prosedürlerle karşılaştırıldığında, daha hızlı ve dramatik sonuçlar veren, daha az invaziv, uygulaması daha kolay ve daha hızlı bir prosedürdür (13).

2.1.3 İp uygulama tarihçesi

İp uygulamasıyla yüzde askılama işlemi, küçük komplikasyonları olan güvenli bir prosedür olup standart ritidektomi cerrahisine göre sınırlı yara izi, hızlı iyileşme, minimal komplikasyonlar ve daha az maliyetle gençleşme umuduyla ortaya konmuştur. Kılçıklı (barbed) ipler, yüz pitozisinin düzeltilmesi amacıyla 1992 yılında Durham'dan araştırmacı Ruff ve 1996 yılında da Moskova'dan Sulamanidze ve ark. tarafından kullanılmıştır. Ruff'un tek yönlü, kılçıklı, polipropilen sütürlerinin 2004 yılında FDA tarafından yüz ve boyun bölgesi pitozisinde lifting etkisiyle kullanımı onaylanmıştır. Sulemanidze ve ark. sütürleri ve antipitotik iplikleri mavi propilenden ve çift yönlü kılçıklı olarak yapmışlardır. Bu sutürler dermise sabitlenerek lifting etkisini göstermektedir (14). Sulemanidze'nin literature kazandırdığı Aptos ip uygulamalarını Woffles ip uygulamaları, Waptos sutür uygulamaları, Isse indirek dikenli ip uygulamaları ve Silhouette soft ip uygulamaları takip etmiştir (15). Günümüzde fasiyal rejuvenasyonda çeşitli materyallerden yapılan ve farklı özelliklere sahip ip malzemeleri kullanılmaktadır.

2.2.ETİYOPATOGENEZ

2.2.1 Yaşlanma Fizyolojisi

Yaşlanma, kaçınılmaz, kompleks, doğal bir fizyolojik süreç olup hücrel aktivitenin azalması, rejenerasyon kabiliyetinde azalma, detoksifikasyon yeteneğinin yavaşlaması ve immünitede zayıflamayı içermektedir. Deri vücudumuzun en büyük organı olup, fizyolojik yaşlanma prosesinde diğer organ ve sistemlerle beraber deride ve bağ dokuda da yaşlanma meydana gelmektedir. Deri yaşlanması basitçe iki gruba ayrılabilir: kronolojik yaşlanma ve fotoyaşlanma (16).

2.2.2 Bağ Dokusu

Yaşlanma sürecinin bir parçası olarak, bağ dokusu hücreleri tarafından üretilen ekstrasellüler matriksin (ECM) çeşitli bileşenlerinin sentezinde artış meydana gelmektedir (ör: fibronektinin, gen ürünü olarak doğrudan sentezinde artış veya postsentez modifikasyon yoluyla ekspresyonunda artış) (17). Bağ dokusu yaşlanması süreci fibronektin ve elastaz upregülasyonu ile laminin ve kollajende modifikasyon gibi protein ekspresyonunu ilgilendiren basamakları kapsamaktadır (18).

2.2.3 Kollajen

ECM'nin yapısal proteinlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan kollajenin şu ana kadar bilinen en az 28 alt tipi mevcuttur. Her bir kollajen, yapısal olarak benzersiz bir alfa (α) zincirin birbiri üzerine sarılarak trimerik yapı oluşturmasıyla meydana gelir (ör: Kollajen tip 1 $\alpha 1$ olan CollA1 proteini iki $\alpha 1$ ve bir tane $\alpha 2$ zincirlerinden oluşan heterodimerik bir yapıya sahiptir.) . α zincirlerin her biri glisin amino asidinin 3. konuma yerleştiği tekrarlayan amino asit üçlülerinden oluşur. Diğer amino asitler zincirin ve dolayısıyla kollajenin spesifik tipini belirleyebilmektedir. Glisin amino asidinin yerleşimi, kollajenler için karakteristik üçlü sarmal yapı oluşumu için çok önemlidir (19). Posttranslasyonel modifikasyonla lizil oksidaz enzimi sayesinde kollajen fibrillerinin kovalent çapraz bağ oluşumu da proteolitik degradasyona direnç anlamında kollajen stabilitesinde oldukça önemlidir (20). Kollajen proteini üretiminde en güçlü uyaran Transforming growth factor β (TGF- β) olarak dikkat çekmektedir. Bu büyüme faktörü aynı zamanda yaşlanma prosesindeki basamaklarda esansiyel olup patolojik bir süreç olan fibroziste de önemli bir rol üstlenmektedir (21).

Kollajen alt tiplerinden tip 1 ve tip 3 fibriler kollajen grubunda yer alır ve tendonların, bağların omurgasını oluşturur. Tip 2 kollajen ise daha ziyade kıkırdakta yer alır. Fibriler kollajenler prokollajen olarak salgılanır ve çeşitli proteazlar tarafından işlendikten sonra aktif kollajen formuna dönüştürülür. Fibril yapısı oluşumu ve organizasyonu belirli proteoglikanlar tarafından düzenlenir (ör: decorin, fibromodulin, lumican). Çapraz köprüleşme, kollajenin fibriler yapısının stabilitesinde oldukça önemlidir. Bunun dışında ECM'nin entegrasyonu ve stabilitesinde de kollajen, proteoglikanlar, fibronektin ve diğer glikoproteinlerin etkileşimleri önemli yer tutmaktadır (17). Embriyonik dönemde baskın olan tip 3 kollajen, erişkin bir insanda total kollajenin %10 kadarını oluşturur. Postnatal erken dönemde tip 1 kollajen sentezindeki hızlanma sonucu erişkin dönemde tip1/tip3 kollajen oranı yaklaşık 8/1 olur (22).

Yüz yaşlanmasının kritik bir bileşeni olarak hacim kaybının daha iyi anlaşılması ve hacim değişiminin cerrahi ve cerrahi olmayan terapötik algoritmaya entegrasyonu, muhtemelen yüz rejuvenasyonu alanındaki en önemli basamaklardanır. Yüzün tüm yapısal doku katmanlarında zaman içindeki kümülatif değişiklikler, tüm yüzün morfolojisinde şekil, orantılar ve topografya açısından bir değişikliğe yol açar. Yüz anatomisinde geleneksel bölgesel yaklaşım; yüzün üst, orta ve alt üçte ikisini dikkate almaktadır (11). Yaşlı derinin önemli bir özelliği, çoğunlukla uzun dalga ultraviyole ışıktan dışsal yaşlanma nedeniyle ortaya çıkan dermal kollajen matriksinin parçalanmasıdır. Fibroblastlar, kollajen ve kollajeni parçalayan enzimlerin normal, dengeli üretimi için kritik olan gerilmeyi önleyerek parçalanmış kollajene bağlanamazlar. Bu dengesizlik yaşlanma sürecini kendi kendini devam ettiren, hiç bitmeyen zararlı bir döngüde ilerletir (11). Fibriler yapısı ve bolluğu nedeniyle, tip I kollajen, kozmetik endüstrisi tarafından üretilen çeşitli yaşlanma karşıtı ve kırışıklık karşıtı kremlerde en yaygın olarak kullanılan kollajen tipidir (23).

2.2.4. Proteoglikan

Proteoglikanlar, kendisine bağlı bir veya daha fazla GAG zincirine sahip bir protein çekirdeğinden oluşan karmaşık moleküllerdir. ECM'nin organizasyonu ve stabilitesi, hücre proliferasyonu, büyüme faktörleri ile etkileşimler ve tümör hücresi büyümesi dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynarlar (24). Agrekan ve versikan iki önemli proteoglikan olup, hyaluronan ile non kovalent bağlanma yaparlar. Çok sayıda kondroitin ve keratan sülfat zinciri agrekan çekirdek proteinine bağlanır. Bu, agrekan içeren ECM'nin su çekmesine ve esneklik

kazanmasına yardımcı olur. Bu, kıkırdak ve tendon gibi diğer dokularda ve aterosklerotik kan damarlarının duvarlarında özellikle önem kazanır. Versikan ise dermiste, aort medyasında ve tendonlarda elastik fibrillerle bir arada bulunur. Agrekana benzer şekilde, versikan tendonun yeniden modellenmesi için önemlidir, dermiste versikan varlığı deri yaşlanması sürecinde önemli rol oynar (17). Fetal deri en yüksek miktarda versikan içerir, içeriği postnatal olarak düşer (25).

2.2.5. Elastin ve Elastik Lifler

Elastin, elastik liflerin ana bileşeni olan bir yapısal proteindir. Hidrofobik amino asitlerin yüksek içeriği (özellikle valin, prolin ve glisin) elastini elastik ve çok dayanıklı hale getirir. Alternatif hidrofilik alanlar, çapraz bağlanarak elastik mikrofibrilleri stabilize eden lizin içerir. Elastik lifler çoğunlukla doku gelişimi sırasında sentezlendiğinden, eski dokular gençlere göre daha az miktarda ve parçalanmış elastik lifler içerir(17).

2.2.6. Fibrillinler

Elastik dokudaki mikrofibrillerin çekirdeğini oluştururlar, burada elastik fibriller ve lifler oluşturmak için tropoelastin ile ve ayrıca çeşitli dokuların ECM'sindeki integrinlerle etkileşirler. Fibrillinler, elastik dokularda iskeleler inşa etmeye katılır ve birçok organın yapısal bütünlüğüne katkıda bulunur (26).

2.2.7. Fibronektin

Fibronektin, büyük bir glikoprotein olup (230-270 kD molekül ağırlığı), hem ECM'de hem de plazmada çok sayıda izoformu bulunur. Hücre zarı reseptörlerine (integrinler) ve ECM bileşenlerine (kollajenler, proteoglikanlar, fokal yapışma molekülleri) eş zamanlı olarak bağlanabilme özelliği sayesinde fibriler kollajenlerin, trombospondin-I ve fibrillin-I dahil mikrofibrillerin organizasyonunu düzenlemede görev alır (26).

2.2.8. Laminin

Bir başka önemli glikoprotein olan lamininlerin (500-800 kD) varlığı; integrinlere, distrofoglikan veya sülfatlanmış glikolipitlere bağlanarak hücrelere yapıştıkları bazal membran ile sınırlıdır. Bu, lamininlerin hücrelere yapışma, farklılaşma, yer değiştirme, fenotip stabilitesi ve apoptoza karşı direnç göstermesini sağlar. Tip 4 kollajen ve fibronektinin upregülasyonundan sorumlu olup bazal membran stabilitesini sağlayan bir görev üstlenir (26).

2.2.9. Deri yaşlanması sürecinde bağ dokunun yeri ve önemi

Yaşlanmanın en belirgin ve görünür belirtilerinden biri, hem epidermiste hem de epidermal atrofi şeklinde ve dermisin ECM'sinde meydana gelen sayısız değişikliğin bir sonucu olan deri kırışıklıkları ve sarkmasıdır (27). Dermal kollajenin %80'i tip I kollajen

ve geri kalan %20'si çoğunlukla tip III kollajen ile temsil edilir (19). Yaşlanan derideki temel değişiklik, fibriler kollajendeki ve bu kollajenin sentezinde görev alan deri fibroblastlarındaki azalmadır. Bu fibril demetleri aynı zamanda yaşlılıkla beraber incilir ve parçalanır. Güneş veya UV hasarına maruz kalan deride bu değişiklikler abartılı biçimde fazla görülür (28). Carrino ve ark., deride en bol miktarda bulunan proteoglikanlar olan decorin ve versikanın ekspresyonlarının yaşlanma sürecinde değiştiğini göstermiştir (25, 29, 30). Dekorin tip 1 kollajene bağlanıp, kollajen fibrillerinin organizasyonunda etkili olduğundan decorin yapısında ve konformasyonundaki herhangi bir değişikliğin kollajen diziliminde, biyomekanik özelliklerinde, derinin gerilim kuvvetinde ve kırışıklık formasyonu oluşumunda etkileri olmaktadır (17). Dekorinin katabolik fragmanı olan decorunt deri yaşlanması sürecinde intakt decorinin yerini alarak birikim gösterir. Dekorin ve decorunt, kollajen fibrillerle birlikte ECM'de yer alır. Decorunt, kollajen için bağlanma bölgesinden yoksun olduğundan, decorinin kollajen fibrillere düzgün bağlanmasındaki azalmanın, kollajen fibrillogenезinin bozulmasına ve dolayısıyla decorinden yoksun farelere benzer şekilde, derinin gerilme kabiliyetinde azalmaya neden olduğu varsayılmaktadır (30, 31). Bir diğer deri proteoglikanı olan versikanın kondroitin sülfattan yoksun V3 splice varyantı elastogenezi stimule etmektedir. Versikanın bir bileşeni olarak kondroitin sülfat bulunduğu zaman elastik liflerin oluşumu engellenir. Elastik lifler derinin esnekliğinde önemli rol alır ve bu liflerde meydana gelebilecek yapısal değişiklikler, fibulin-5'te (mikrofibril içeren tropoelastinle ilişkilendiren bir moleküldür) kısmi düşüşe yol açarak deri yaşlanması sürecine katkıda bulunur.

HA (hyaluronan), N-asetil-glukozamin ve glukuronik asit birimlerinin çok sayıda disakkaritinden oluşan büyük bir sülfatlanmamış glikozaminoglikandır (32). Herhangi bir çekirdek proteine kovalent olarak bağlı değildir, ancak bir bağlayıcı protein vasıtasıyla agrekan ve versikana bağlanır. Dermiste bol miktarda bulunur, anti aging etkisi higroskopik özelliğinden kaynaklanır (33). Bir başka ifadeyle, hyaluronan büyük miktarda su tutma kapasitesine sahiptir ve bu sayede derinin hidrate olmasını sağlar. Hyaluronan varlığı kollajen lifler arasındaki sürtünmeyi azaltır (34). Yaşlanma veya UV kaynaklı hasar sırasında azalan hyaluronan varlığı, fragil deri yapısına, gecikmiş yara iyileşmesine, senil purpuraya, stellat pseudo-skarlara ve deri atrofisine yol açar (35).

Yaşlanan deride MMP- 1, 2 ve 3'ün upregülasyonunun kaybedildiği kaydedilmiştir (34). Yapılan çalışmalar, MMP aktivitesinin, yaşlanma sürecinin kendisinden ziyade güneş UV radyasyonu ile ilişkili oksidatif metabolizma ve oksidatif olaylarla uyarıldığını göstermektedir (19).

Yaşlanmayla beraber deri yapısındaki dermal değişiklikler, derinin biyomekanik parametrelerinde, deri sertliğinin artışında ve esneme kabiliyetinin azalmasında önemli etki gösterirler. Bu biyomekanik bozulmayı aynı zamanda kollajen, elastin ve proteoglikan içeriğindeki azalma, çapraz bağlı kollajen lifleri ve matriks proteinlerinin glikasyonunda artış ve kollajen liflerinin parçalanması da tetikler (36). Yaşa bağımlı elastin ve kollajen lif degradasyonunda artışla dermal elastisite ve dermal fibroblastların işlev yeteneğinde azalmalar meydana gelmektedir. Parçalanmış kollajen ile inflamatuvar süreçlerin uyarılması, sadece deride yaşlanma değişikliklerini hızlandırmakla kalmaz, aynı zamanda inflamatuvar mediatörlerin sistemik dolaşıma girmesi ve diğer organlara ulaşması üzerine organizmanın genel yaşlanmasına katkıda bulunabilir (19).

2.2.10. UV hasarı ve fotoyaşlanma

Fotoyaşlanma (dermatoheliyozis), kronik UV maruziyetine bağlı özellikle güneşe maruz kalan deride oluşan kompleks deri değişiklikleri sürecidir. Deri tipi (Fitzpatrick deri tipi 1, 2, 3 olan açık tenli kişiler; deri tipi 4, 5, 6 olanlara göre fotoyaşlanmaya daha çok meyillidirler), etnik köken (örneğin Kuzey Avrupa ırkları), yaşam şekli alışkanlıkları, dış ortamda yapılan meslekler ve yaşanılan coğrafyaya (yüksek rakım, ekvatora yakınlık gibi) göre bu süreç çeşitlilik göstermektedir. Bireyin UV ışınına maruz kalma sıklığı, güneş koruyucu krem kullanımı, fiziksel korunma da fotoyaşlanmanın şiddetini belirleyen faktörlerdendir. Kümülatif olarak toplam maruz kalınan UV miktarı fotoyaşlanmada direkt belirleyici rol üstlenir (37).

2.2.11. Işık ve Deri İlişkisi

Işığın dalga ve foton adı verilen partikül özellikleri bulunur. Fotonların deri yüzeyine teması üç seçenекle sonlanabilmektedir: yansiyabilirler, saçılabilirler ya da derideki kromoforlar tarafından emilebilirler. Yansıma deri yüzeyinde gerçekleşir ve deriden yansıyan ışık, tedaviden ziyade tanıtıcı amaçlı kullanılır. Saçılmada ışık, deride yayılma yönünü ve ne kadar derine gideceğini belirler. Çoğunlukla saçılan foton, kollajenin varlığından dolayı dermiste bulunur. Saçılmada ışığın dalga boyu da rol oynar; örneğin UVB (290-320 nm) gibi kısa dalga boyları daha çok saçılarak genel olarak epidermiste ve üst dermiste absorbe olurken; UVA (320-400 nm) gibi daha uzun dalga boyları daha derine penetre olarak absorbe olurlar. Emilen fotonlarda ise ısı oluşturma veya fotokimyasal reaksiyon ortaya çıkar. Farklı kromoforlar değişik dalga boylarından etkilenir, bu yolla çeşitli kutanöz etkiler oluşur (38). Derideki kromoforun fotonu absorbe etmesiyle,

kromofor uyarılmış geçici bir forma değişir. Daha sonra tekrar sabit forma geçerken ise ışık ya da ısı olarak enerji yayılır. Bu sayede kromofor kimyasal değişim geçirir ve enerjiyi başka bir moleküle transfer etmiş olur (39).

Kronolojik yaşlanmada hücrelerin doğal yaşlanma süreci rol oynarken fotoyaşlanma ve fotohasarda UV maruziyeti gibi dış faktörler de tetikleyici olmaktadır. Fotoyaşlanmış deri dokusunda epidermis daha kalın olup dermiste ise daha derine penetre olan UVA ışınları nedeniyle daha kronik hasar söz konusudur. UVA yalnızca daha derine penetre olmaz; keratinositlere etki ederek DNA, protein ve lipidlerin hasarlanmasına neden olan ROR'lerin oluşumuna, hücre membran yağ asitlerinin salınımına, bu yağ asitlerinin metabolize edilerek siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LOX) yolları aracılığıyla eikosanoidlere dönüşümüne ve bu sayede fotoyaşlanmayı tetikleyen sitokinlerin ve büyüme faktör reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur (40). Bunlar da sırasıyla transkripsiyon faktör aktivatör protein-1 (AP-1) ve NF- κ B'yi uyarırlar. AP-1'in uyarılması ile aktive olan MMP'lar kollajen yıkımına öncülük eder. MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'un birlikte degrade edici etkisiyle tip 1 ve tip 3 kollajenin yapısı bozulur (41). Ayrıca AP-1 dermisteki tip1 ve tip 3 prokollajen gen ekspresyonunu da azaltarak kollajen üretimini inhibe eder. ROR yoluyla aktive edilen NF- κ B; interlökin-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinler de UV hasarının artışına katkıda bulunurlar (37, 42). Dermiste en yoğun miktarda bulunan tip 1 kollajen ile deriye elastikiyetini veren tip 3 kollajen, UV maruziyeti sonucu uyarılan matriks metaloproteinazlar (MMP) ile dejenere olmaya başlar. Fotoyaşlanmış deride tip1 ve tip 3 prokollajen sentezi azalır, kollajen fibrilleri düzensizleşmeye ve bozulmaya başlar (38, 43, 44). Fotoyaşlanmış deride tip 3/tip 1 kollajen oranı azalır ve elastin artış gösterir. Tip 1 kollajen seviyesinin düşüklüğü, fotohasarn derecesiyle korelasyon gösterir. Erken dönemde arttıkları için tenascin ve tip1 prokollajenin fotoyaşlanmanın en erken oluşan göstergeleri olabileceği, ilerleyen dönemde artmaları nedeniyle de elastin ve tip 3 prokollajenin fotoyaşlanmanın geç evrelerine işaret olabileceği düşünülmüştür (45).

Fotoyaşlanma sürecinde UVA ve UVB birlikte rol almaktadır (16). UVA, UVB'ye göre yeryüzüne daha fazla ulaşıp dermisin daha derinlerine kadar etki göstermektedir. UVB temel olarak epidermiste hücresel DNA tarafından absorbe edilmesi neticesinde siklobütan pirimidin dimerlerinin oluşumuna yol açarak deride hasar yapar. UVB hasarıyla güneş yanıkları, fotokarsinogenez, fotoyaşlanma ve immünsüpresyon meydana gelir (37). Fotoyaşlanmanın oluşumundan intra veya interselüler mediyatörler (TNF α -R, EGFR ve IL1-R), intraselüler sinyal kaskadı aktivasyonu (AP-1, NF- κ B gibi), MMP 'ler yoluyla

kollajen dejenerasyonu ve inflamatuvar infiltratların yaptığı hasarlanmalar sayılabilir (41). Ancak, fotoyaşlanmanın detaylı mekanizması halen kesin olarak bilinmemektedir. Epidermal bariyer fonksiyonu için gerekli olan ve stratum korneumun ekstraselüler lipidlerinden biri olan seramidin, UV maruziyeti ile keratinositlerden sentezi artmaktadır. UV maruziyeti ile ayrıca dermal fibroblastlardaki bir ekstraselüler matriks komponenti olup derinin su tutmasında temel rol oynayan hyaluronan sentezi de artar. Sonuçta UV maruziyetiyle deride bariyer fonksiyonu ve su tutma kapasitesi artar. Ancak paradoksal olarak fotoyaşlanmış deri kurudur ve ince kırışıklıklar içerir (38). Fotoyaşlanma, immunitenin ve inflamatuvar duyarlılığın düzensizleşmesi ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda yaşlı kişilerde deri örneklerinde keratinositlerdeki COX2 ekspresyonu ve sonucunda PGE2 konsantrasyonunda belirgin artış gözlenmiştir ve bu artış kronolojik yaşlanmaya göre fotoyaşlanma sürecinde çok daha yüksek konsantrasyonlarda saptanmıştır (16, 46).

Fotoyaşlanan deride intrensek yaşlanmanın üzerine kronik UV maruziyetinin etkisiyle, deri elastikiyet kaybına uğrar. Kuru ve sert bir hal alarak düzensiz pigmentasyonla beraber kaba kırışıklıklar şeklinde görünür (47). Fotoyaşlanmış epidermis genç epidermisten çok daha kalındır. Ancak son evrelerde ise atrofiye bağlı epidermal incelme gözlenir. Fotoyaşlanmış insan derisinde klinik olarak kırışıklık, deri yapısında kabalaşma, yamalı pigmentasyon, lentigo, telenjiyektazi, şeffaflık kaybı ve mat görünüm, deri turgoru ve elastikiyetinde azalma, ciddi atrofi, açık komedonlar, milia, elastoizisten kaynaklı kaldırım taşı görüntüsü, aktinik purpura gibi bulgular görülür. Histopatolojik olarak kronolojik yaşılanan bir deride fibroblast ve kollajen içeriğinde azalma gözlenirken, fotoyaşlanan deride süreç daha kompleks olup epidermis ve dermiste değişiklikler beklenmektedir. Epidermiste spinal katta incelme, dermoepidermal rete uzantılarında düzleşme ve beraberinde atrofi, epidermal kalınlaşma ve akantoz gözlenebilir. Elastik liflerin dejenerasyonu sonucu anormal kalınlaşmış fragmente amorf bir materyal birikimi şeklinde gözlenen solar elastoiz fotoyaşlanmanın tipik dermal bulgusudur. Dermiste kollajen liflerde azalma ve düzensizleşme görülür. Melanosit ve keratinositlerde artış gözlenebilir (37, 45).

2.3. REJUVENASYON UYGULAMALARINDA DOLGU, BOTULİNÜM TOKSİN VE İPLE ASKILAMA YÖNTEMLERİ

2.3.1. Dolgu Uygulama ve HA Dolgu Maddesi

Dolgu uygulamaları, cerrahi prosedürlere göre muayenehanede uygulanabilmesi ve daha ekonomik olması nedeniyle son yıllarda giderek artan bir popüleriteye kavuşmuştur. Yüz estetiğinde, kırışıklıkların azaltılması, skar alanları ve atrofinin giderilmesi, deri üzerindeki küçük defekt ve hacim kayıplarından oluşan asimetrisinin düzeltilmesinde dolgu maddelerinden faydalanılmaktadır. Yüz estetiği dışında meme, kalça, penis dolgu uygulamaları da yapılmaktadır (48). İdeal bir dolgu maddesi, immunojenik, teratojenik, karsinojenik, enfeksiyöz ve gezici olmamalıdır. Dolgu maddeleri dokudaki kalıcılık sürelerine göre kalıcı olmayan dolgu maddeleri, yarı kalıcı dolgu maddeleri ve kalıcı dolgu maddeleri olarak 3 sınıfa ayrılırlar. Yan etki ve güvenlik açısından kalıcı olmayan dolgu maddeleri bir yıldan az süre dokuda kalarak öncelikli seçenek olurken, rezorbe olmaksızın 2 yıldan uzun süre dokuda kalabilen kalıcı dolgular güvenlik kaygısı, komplikasyon gelişimi ve yan etki profili açısından risk oluşturmaktadır.

HA, deri ve bağ dokusunda en yüksek konsantrasyonlarda bulunan endojen bir polisakkarit olup kalıcı olmayan bir dolgu maddesidir. Kozmetik uygulamalar ve yüz rejuvenasyonunda uygun güvenlik profili ile de sıklıkla tercih edilmektedir. Dolgu maddeleri, etki mekanizmalarına göre de sınıflandırılırlar ve bazıları dokuda uyarıcı etki gösterip uzun süreli kollajen depolanmasını uyarırlarken bazıları hacim artırıcı etkileri sayesinde işlev görürler. HA, dokuda hacim artırıcı etkiye sahiptir (2, 49).

Yaşla viskoelastisitede meydana gelen kayıp, beraberinde kırışıklıkların ortaya çıkmasına yol açarak deri yaşlanmasında aktif rol üstlenir. HA bazlı dolgu maddeleri, kırışıklıkları doldurmak ve hacim kaybını telafi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Son klinik gözlemlerde dolgu etkisinin, dolgu maddesinin biyolojik mevcudiyetinden daha uzun süre devam ettiği gösterilmiştir. Çapraz bağlı HA ile yeni kollajen sentezinin uyarılması ve elastinin upregülasyonu deneysel olarak desteklenmiştir. Fragmented kollajenin yerini alan çapraz bağlı HA, ECM'in yeniden dizaynını ve fibroblastların aktivitesine sekonder kollajen ve elastin sentezini arttırmaktadır. Ancak bu verimliliğin elde edilebilmesi için aylık seanslar olarak tekrarlayan tedavi uygulaması gerekmektedir (50). HA enjeksiyonunun doku kollajen anabolizması üzerindeki etkilerinin, mekanik stresin indüklenmesi ile ilişkili olduğu ve deri fizyolojisinde biyokimyasal değişikliklere neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu stresin ECM sentez/bozunma dengesini modüle eden

hücre içi sinyal yollarını aktive ettiği görülmektedir. Deri yapısının biyomekanik performansı esasen ECM bütünlüğüne bağlıdır. Yaşla birlikte ECM içeriğindeki kollajende densite ve oryantasyon olarak reorganizasyon meydana gelir, sonuçta ECM'teki kollajen ve proteoglikan içeriğinde azalma, denatüre ve degrade kollajende artış olur (51). Bu değişiklikler matrix volumünde kayba, hücre metabolizması ve biyomekanik özelliklerin bozulmasına yol açar (52).

2016'da Brezilya'da Fitzpatrick deri fototipleri III ila IV ve Glogau skalasında foto hasarlı deri II ila III olan 40-50 yaş aralığındaki 20 hastanın dahil edildiği prospektif çalışmada HA dolgu maddesinin morfolojik ve morfometrik analizleri test edilmiştir. HA dolgusu (24 mg/mL), yüzün 0.5% klorheksidinle sterilizasyonu sonrası, tek seansta hastaların dermisine (bilateral nazolabial oluklara 0.8 mL ve preauriküler kıvrımlara 0.2 mL) enjekte edilmiş ve sonuçları preauriküler alandan alınan 3 ve 9. aydaki deri biyopsileriyle ve 1, 3, 6, 9 ve 12. aylardaki fotoğraflarla değerlendirilmiştir. Çalışmayı tamamlayan 16 kadın hastada 12 ay süresince anlamlı klinik yanıt alınmıştır. Histopatolojik incelemesi yapılan 20 hastada da 3. ve 9. ayda kollajen liflerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmada, HA'in doku üzerindeki antiaging etkisinin sadece jel varlığı ile değil, aynı zamanda enjeksiyon sonrası uyarılan dermal remodelling ile de açıklanabildiği vurgulanmış ve fotohasarlı yüz derisinde HA dolgu enjeksiyonu sonrası dermal remodelling'in uzun takipli değerlendirildiği ilk çalışma olduğu belirtilmiştir (3).

Çeşitli hayvan çalışmalarında da dolgunun deri ve derialtı dokuda remodelling üzerindeki etkileri incelenmiştir. Japonya'dan Yoneda M. ve ark.(53) HA dolgusunun kültür ortamında fare dermal fibroblastlarındaki etkisine bakmış ve fare derisi dermal fibroblastlarının primer kültürlerinde logaritmik hücre sayısı artışıyla orantılı olarak HA konsantrasyonunda da artış saptamıştır. Deneysel çalışmanın sonucunda eksojen olarak eklenen veya endojen sentez artışıyla sağlanan HA'in, fare dermal fibroblast proliferasyonunda bir modülatör olarak görev yapabileceği önerilmiştir.

2.3.2. Botulinum Toksin-A Uygulaması ve Antiaging Üzerine Etkileri

Gram (+) bir bakteri olan *C.botulinum* tarafından üretilen BTX 8 farklı subtip içermekte olup tedavi amaçlı en sık kullanılan alt tipi A'dır. BTX'in etki mekanizması, bulunduğu bölgedeki periferik sinir sistemine ait nöromusküler kavşakta presinaptik nöronlardan asetikolin salınımını bloke ederek geçici bir paraliziye yol açmasıdır, tedavi amaçlı kullanımda da bu etki mekanizmasının avantajlarından yararlanılır (54, 55). Bu

blokaj sırasında asetilkolin veziküllerinin hücre membranına füzyonu ve buradan salınması için gerekli kompleks oluşmasında görevli SNARE (soluble NSF F [N-ethyl maleimide-sensitive factor] attachment protein receptor) kompleksi de BTX tarafından hedef alınır. SNARE; vezikül ilişkili membran protein (VAMP, sinaptobrevin), sinaptozom ilişkili protein (SNAP-25) ve sintaksinden oluşur. Tip A bu üç proteinin tersiyer iletişimlerine etki etmese de, kompleksi destabilize ederek etki gösterir (54, 56). BTX enjeksiyonunu takiben çizgili kasta 2-5 gün içinde parezi gelişmekte olup 2 haftada bu etkinlik maksimum düzeye çıkmaktadır. BTX' in etkisi 2-3 ay sürmekte ve sonrasında yavaş yavaş azalmaktadır. Tip A'da nöromusküler iletimin yeniden sağlanması ve asetilkolin salınımının başlaması için geçen süre yaklaşık 91 gündür. Bu etkinlik süresi ve terapötik etki toksine karşı antikor gelişimi olduğunda azalmaktadır. Parezinin derecesi ve etkinliğin süresi, uygulanan toksin miktarı ile korele olup, bu ilişki düşük dozlarda rölatif olarak gözlenmektedir. BTX güvenilir bir ajandır (57). Günümüzde BTX, özellikle üst 1/3 yüz bölgesinde ve boyun bölgesinin hiperdinamik kırışıklıklarının tedavisinde başta olmak üzere tüm yüzde estetik amaçlı güvenle kullanılmaktadır (58).

BTX-A, yüz kırışıklıklarının azaltılmasında yıllardır kullanılmaktadır ve yapılan bazı çalışmalarda kullanım sonrası histolojik ve immünohistokimyasal değişiklikler ortaya konmuştur. El-Domyati M. ve ark., 16 gönüllü insanda yüz bölgesi kırışıklıklarında tek doz BTX-A enjeksiyonun dokuda yaptığı değişiklikleri incelemişlerdir. Periorbital bölgedeki kaz ayaklarına her bir noktaya 2-3 U olmak üzere toplam 2-4 noktada, 6-12U olarak BTX-A enjekte etmişlerdir. Enjeksiyon öncesi ve enjeksiyondan 3 ay sonra biyopsi ile doku örnekleri elde edilmiş ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Enjeksiyondan sonraki 3. ayda makroskobik olarak kırışıklığın enlemesine genişlediği, mikroskobik olarak da granüler tabakada artış, immünohistokimyasal olarak kollajen tip 1 ve tip 3'te artış anlamlı olarak saptanırken; elastinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. BTX enjeksiyonunun sadece kalitatif düzeyde kollajen artışına değil, kollajen liflerinin düzenli oraganizasyonunda da rol aldığı belirtilmiştir (59).

2.3.3. İp Uygulama, Deri ve Bağ Dokusu Üzerinde PDO ipin etkileri

Yüz rejuvenasyonunda son dönemde minimal invazif yöntemler popüler hale gelmiştir. Yüz konturlerinin düzeltilmesi ve yüz şekillendirmede, kırışıklıkların azaltılması, derinin kalitesinin artırılması, kollajen üretiminin stimule edilmesi ve askı (lifting) etkisi elde edilmesinde PDO eriyebilir ipler göreceli uzun etkileri ile öne çıkmaktadır. Bu ipler, 3-10 mm arasında bir askılama etkisi sayesinde dokuda lifting etki oluşturur ve sarkmaları

önlemede rol üstlenir (60). Oldukça düşük komplikasyon riski ve güvenli bir profil taşımaktadırlar. Dolgu, mezoterapi, BTX, lazer uygulama ve diğer uygulamalarla kombine edilebilir. Kaş düşüklüğü, çene kontür belirginleşmesi, derin nazo-labyal oluklanmanın düzeltilmesinde minimal invazif bir teknikle PDO ip uygulama kullanılır. Vidalı (screw), kancalı (cog) ve kılçıklı (barbed) gibi çeşitleri vardır. Bu ip türlerinin; iplerin uzunluğu, kalınlığı ve sarmal yapıları gibi birbirinden farklı özellikleri bulunmaktadır. Yine doku tarafından parçalanıp atılım sürelerine göre kalıcı ve geçici olarak ikiye ayrılır. Geçici ipler, vücut tarafından absorbe edilen ve 6 ay-2 yıl içinde vücuttan atılan iplerdir. PDO ip de geçici gruptadır. PDO ipin etki mekanizmasında, implante edildiği bölgede gelişen ve çevreleyen alanı da kapsayan inflamatuvar hücrelerle fibroblastlardan oluşan doku reaksiyonu (yaklaşık 1.ayın sonunda en güçlü) ile yeni kollajen oluşumu yer alır. SMAS (Süperfisyal Müskülo-Aponörotik Sistem), deri yaşlanmasında yapılan lifting tedavilerinde önemli bir bölgedir ve invazif ve yarı-invazif operasyonların hedefidir (15, 61). PDO ip uygulama da insan derisinde SMAS ve hemen üzerinde yer alan subkütan yağ dokusuna implante edilerek yapılır. Uygun anatomik bölgeye yerleştirilen ipler bölgede bırakılarak kollajen üretimi stimülasyonu, 6. hafta itibarıyla de mekanik olarak lifting etkisi başlatılmış olur. Neokollagenezis, lifting etki üzerinde additif etkiyle artırıcı rol üstlenir. Kollajen oluşumu yalnızca iplerin çevresinde değil, ip aralarında da çapraz köprüler halinde de (fibröz köprüleme adı verilir) meydana gelmektedir (62). Yüz şekillendirmede minimal invazif ve güvenli bir yöntem olan PDO ip uygulama tekniği, iz bırakmadan ve düşük kanama profili ve komplikasyon riskine de sahip olup, 100% oranda biyo-uyumludur (63).

İp uygulamanın antiaging etkisini gösteren çeşitli hayvan deneyleri mevcuttur. Farklı iplerin insan ve rat sırt derisinde karşılaştırmalı uygulanmasını araştıran bir çalışmada (64); cog, monofilamant ve multifilamant ipler kadavrada ve rat sırt derisindeki PC tabakasında uygulanmıştır. Gerim kuvveti tensiyometre ile ölçülmüş, kapsül çevresindeki doku kalınlığı, myofibroblastlar histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Maksimum gerim kuvveti, kapsül çevresindeki doku kalınlığı ve myofibroblastlar; kadavra derisinde sıçan derisine kıyasla daha yüksek ve diğer iplere kıyasla en yüksek cog iple elde edilmiş ve anlamlı bulunmuştur. Shin JJ. ve ark.(65) tek ve çok zincirli (stranded) PDO iplerin rat sırt derisinde uygulanması ve sonuçlarını içeren bir deneysel çalışma raporlamışlardır. Bu çalışmada farklı sayıda zincir içeren PDO iplerin rat derisinde histopatolojik ve kollajen üretimi üzerindeki etkileri araştırılmış ve PCR'la da konfirme edilmiştir. Rat sırtı 5 ayrı alana ayrılmış ve her bir alana ayrı ayrı 4 farklı PDO iple (mono,

bi, quad, spring), monofilamant poli-laktik asit (PLA) ip yerleştirilmiştir. Doku örnekleri 1, 2 ve 12. aylarda alınmış histopatolojik inceleme ve PCR analizine tabi tutulmuştur. Sonuçta, çoklu zincirli PDO ipleri ile 2. haftada daha fazla kollajen üretimi saptanmıştır. 12. haftada kollajen miktarı keskin bir düşüş göstermiştir. Histopatolojik değerlendirmede ise yerleştirilen iplerin çevresinde kapsül benzeri fibröz yapı gözlenmiştir. Çoklu zincirli PDO iplerin, tek zincirlilere kıyasla ve artan ip sayısı ile paralel olarak daha çok kollajen üretimi tespit edildiği vurgulanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın dizaynı ve etik onay süreci

Bu tez projesi çalışmasında, kontrollü deneysel çalışma uygulanmış olup hayvan deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması öncesinde 3 ay süresince 4 sıçan üzerinde etik kurul onayıyla bir ön çalışma yapılmış olup aynı uygulama metodlarını ve işlemleri içeren bu ön çalışma sayesinde uygulanacak olan maddeler ve UV düzeneği hayvanlar üzerinde denenmiş ve standardize edilmiştir. Ayrıca alınan doku örneklerinin uygun koşullarda saklama ve transport yöntemleri test edilmiştir. Dokuların histopatolojik olarak boyanması ve uygun kitler temin edilerek PCR’da ekspresyon analizi yöntemleri öğrenildikten sonra ön çalışma başarıyla tamamlanmıştır ve ana proje için çalışma izni alınmıştır. Etik kurul tarafından proje, deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesindeki ilgili maddeler gereğince “Etik Kurullara Uygunluk Esası” dikkate alınarak hazırlandığı ilgili kurulca belirlenmiştir ve projeye 2019-02 sayılı kararla etik onay verilmiştir. İşlemler esnasında herhangi bir tehlikeli madde kullanılmamış olup deneyin sonunda sıçanlarsakrifiye edilmemiş, deney sırasında ölen 7 ve 12 nolu sıçanlar hariç deney, 18 sıçanla tamamlanmıştır.

3.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN HAYVAN, MALZEME VE TEKNİK EKİPMANLAR

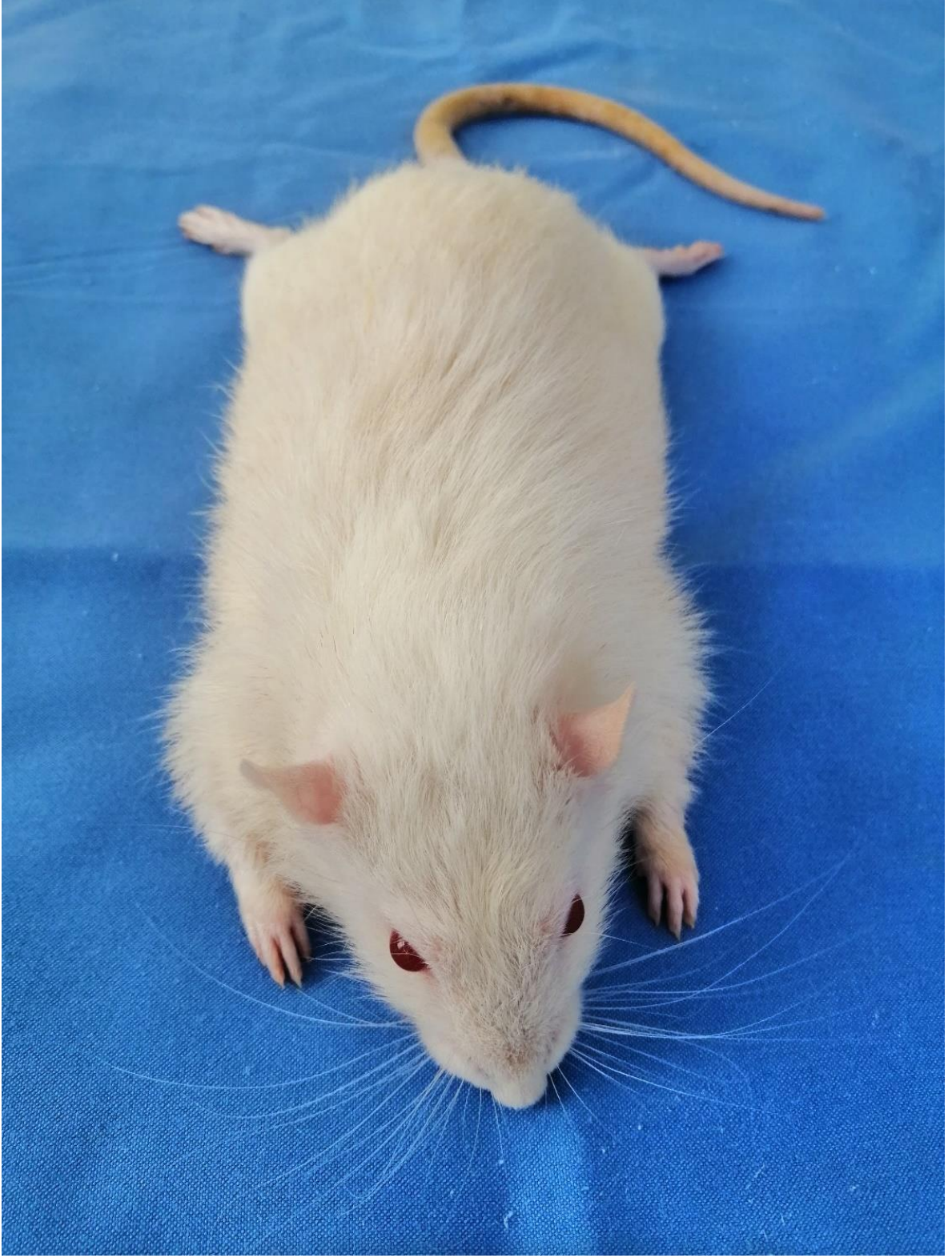
3.2.1. Sıçanlar (Ratlar)

Sıçanlar; tıbbi araştırmalar ve farmakoloji, gıda endüstrisi, davranış bilimleri gibi alanlarda kullanılmaktadır. Boyları kuyruk uzunluğu dahil olmak üzere yaklaşık 20-25 cm arasında değişmektedir. Wistar albino sıçanların tüyleri renksizdir ve gözleri ışığa duyarlıdır. İskelet sistemleri; kafatası, omurga, sternum, pektoral kuşak, pelvik çatı ve iki çift ekstremiteden oluşur (66). Sıçanların derisi yapısal olarak epidermis ve dermis tabakalarından oluşur (67). Dermis içinde yağ bezleri ve yer yer subkutan katmana uzanan kıl follikülleri bulunmasına rağmen ter bezi bulunmamaktadır (68). Sıçan derisi de tıpkı insan derisi gibi vücudun farklı bölgelerinde farklı spesifik özelliklere sahiptir. Sıçanlarda en fazla farklılık ayak ve kuyruk kısmında olmak üzere epidermis hücre kinetiği vücudun değişik bölgelerinde farklılık gösterir (69). Ortalama epidermal kalınlık doğumdan sonraki 4. haftaya kadar azalırken, 4.haftadan sonra fizyolojik olarak sabit kalır (70). Wistar albino sıçanların sırt derisi epidermis kalınlığı ortalama 70,15 µm olup bu değer ayak tabanında ortalama 75,3 µm ve calcanean bölgede ise ortalama 85 µm olarak bildirilmiştir (68, 71). Sıçan derisinde dermal kalınlıkta ise doğum sonrasındaki ilk 3 hafta içinde hızlı bir artış (yaklaşık 166%) gerçekleşir. Ancak sonrasında 1 yaşına kadar dermal kalınlıkta 55% oranında bir azalma gözlenir ve daha sonra dermal kalınlık sabit olarak yaşamın sonuna kadar devam eder (70). Birçok canlıdakine benzer şekilde sırt bölgesi, Wistar albino sıçanlarda da dermisin en kalın olduğu deri bölgesidir (yaklaşık 842,60 µm) (72). Wistar albino sıçanlarda pekçok memelide (kemirgenler, kediler, köpekler, atlar ve balinalar gibi) olduğu gibi interstisyel bağ doku ve dermal beyaz yağ dokusu arasında ince bir çizgili kas tabakası olan PC yer almaktadır. Bu kas tabakası posterior ekstremitelerde, sırtta, abdomen ve göğüste yer alır (73). PC, altta bulunan kas tabakasına esneklik ve hareket kabiliyeti sağlar (74). PC, insanda bulunmamasına rağmen farklı anatomik bölgelerdeki farklı kas grupları filogenetik olarak PC kalıntısı olarak kabul edilmektedir. Skalpte yer alan oksipitofrontal kas, aurikula kasları, platisma kası ve elde bulunan palmaris brevis kası bu kas grubuna örnektir (75).

Bu projede wistar albino sıçanlar (2-5 aylık, 200-250g ağırlığında, erkek, 20 adet) (resim-1) çalışmaya alınmıştır. Sıçanların bu çalışmada seçilme sebebi, deri yapısı, deri kalınlığının ve yüzey alanı genişliğinin uygulanacak maddeler ve gözlem açısından uygun olmasıydı. Sıçanların bakım ve beslenmeleri Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM

Deneyisel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde standartlara uygun koşullarda yapılmıştır. Sıçanlar rahatça hareket edebilecekleri, yem ve su kaplarının olduğu plastik kafeslerde barındırılmış (resim-2), yem ve suları ad-libitum olarak verilmiştir. Kafeslerin temizliği haftalık olarak yapılp, altlık olarak talaş kullanılmıştır. Hayvanlar standart laboratuvar şartlarında 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda ve oda sıcaklığında (22 ± 1 °C) muhafaza edilmiştir.





Resim-1: Deneyde kullanılan Wistar albino sıçanlar



Resim-2: Sıçanların barındırıldığı, rahatça hareket edebildikleri, yem ve su kaplarının ad-libitum olarak sağlandığı plastik kafesler

3.2.2. Anestezik ajanlar ve anestezi yöntemi

Sıçanlar ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) ve ketamin hidroklorid (90 mg/kg) aracılığıyla prosedür öncesi genel anestezi altına alınmış ve anestezi derinliği parmak kısırtma yöntemi ile her 30 dakikada bir olarak kontrol edilmiştir. Prosedür sonrası izofluran gaz anestezisi yöntemiyle inhalasyon yoluyla sıçanlarda analjezi ve sedasyon sağlanmıştır.

3.2.3. Dolgu

Hyaluronik asit (Perfectha Derm®), (20 mg/mL) çapraz bağlı dolgu materyali 30 Gauge(G)'lık enjektör ile kullanılmıştır.

3.2.4. Botulinum toksin-A

BTX tip-A (Botox®) (100 IU/flakon) 26G enjektör ile uygulanmıştır.

3.2.5. İp

PDO screw (Cara®) ip materyali deri altına (PC) implante edilmek suretiyle kullanılmıştır (76).

3.2.6. UV düzeneği

UV düzeneği, 2 adet UVA (PHILIPS® ACTINIC BL TL40W/10 1SL) ve 2 adet UVB (PHILIPS® NBUVB TL20W/01 RS SLV/25) lambasından oluşmuş ve üzerine monte edilen anahtar vasıtasıyla hem UVA lambaları hem de UVB lambaları ayrı ayrı aktif/pasif hale getirilecek şekilde tasarlanmıştır, bu kombine sistem yükseklik ayarlı bir demir çubuk yardımıyla üzerine kafesin konulacağı bir sehpanın yanına konumlandırılmıştır (resim-3).



Resim-3: Yükseklik ayarlı, kombine 2 adet UVA ve 2 adet UVB lambasıyla donatılmış düzenek.

3.2.7. Mikroskop sistemi

Elde edilen dokuların histopatolojik incelemesinde ışık mikroskobu (OLYMPOS®, BX53) kullanılmıştır.

3.2.8. Histokimyasal boyalar

Çalışma kapsamında Hematoksilen&Eozin (H&E) , Masson Trikrom (MTK), Elastika Von Gieson (EVG), Weigert Rezorsin Fuksin ve Herovici's Collagen Stain histokimyasal boyaları histopatolojik inceleme kapsamında kullanılmıştır.

3.3. DENEYİN UYGULANMA AŞAMASI

3.3.1. Sıçanların belirlenmesi ve hazırlanması

Sıçanlar herbiri 10'arlı olmak üzere grup 1 ve grup 2 olarak 2 alt gruba ayrılmışlardır. Ayrıca her bir sıçanın sırt derisi zedelenmeden tıraşlanarak, 3.0 polipropilen emilmeyen ip ile sütur atılarak 5 eşit parçaya bölünmüştür. Bu alanlar da 1-2-3-4-5 olarak numaralandırılmıştır (resim-4).



Resim-4: Her bir sıçanın sırt derisi tıraşlanarak 1-2-3-4-5 olarak numaralandırılmıştır. Sınırları belirli uygulama alanları elde edilmiştir. Sıçanlar karıştırılmamak için kuyruklarında kalemle işaretleme yapılmıştır.

3.3.2. Yapılan uygulamalar ve prosedür

Sırayla genel anesteziye alınan her bir sıçanda henüz başka bir müdahale yapılmadan, başlangıç aşamasında 1 adet histopatolojik inceleme, 1 adet de PCR analizi için olmak üzere 2'şer adet 5mm punch aleti ile kontrol biyopsisi alınmıştır. Ardından aşağıda sıralanan işlemler uygulanmış ve bir sıçandaki işlem bitince diğer sıçana geçilerek aynı basamaklar tekrar edilmiştir. Bu işlemler yirmi sıçanın tamamına uygulanmıştır.

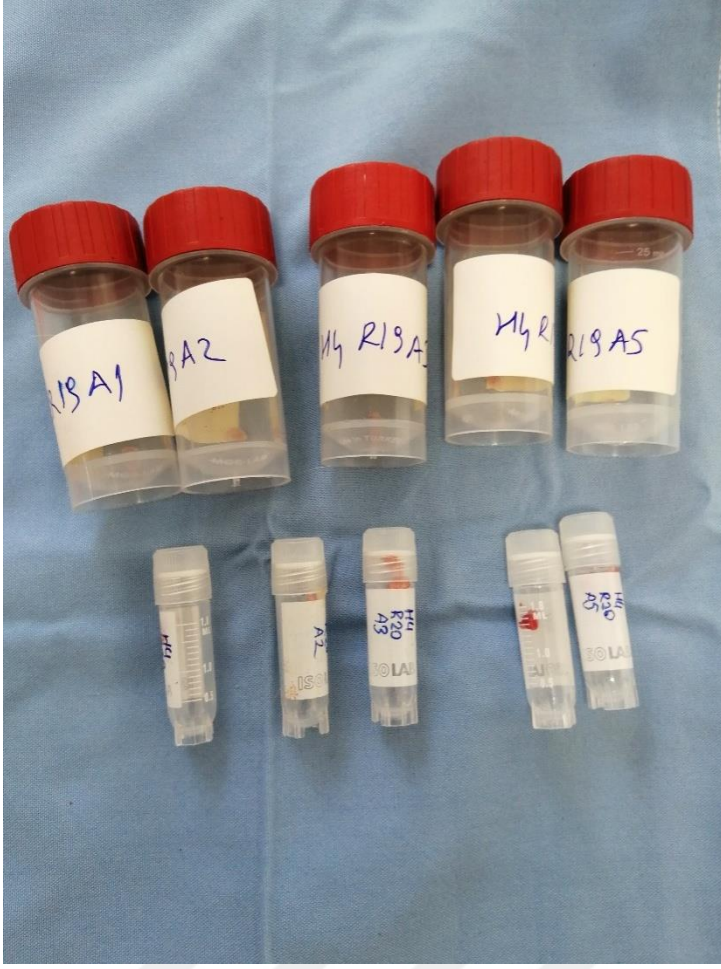
- 1 nolu alan kontrol alanı olup buraya ip'siz iğne derialtına uygulanıp çıkarılmıştır (64).
- 2.alana PDO ip uygulaması sıçanda PC bölgesine uygulanmıştır (64).

- 3.alana HA maddesi intradermal dolgu olarak 0.02 ml uygulanmıştır (77).
- 4.alana PDO ip uygulaması ve aynı seansta HA 0.02 ml uygulaması yapılmıştır.
- 5.alana ise PDO ip ile beraber aynı seansta HA 0.02mL ve BTX-A 1U olarak uygulanmıştır.

Grup 2'deki 10 adet sıçan bu işlemler uygulandıktan sonra, grup 1'den farklı olarak 20 cm yükseklikten UV düzeneği ile, 320-400 nm dalga boyunda UVA, 138 mj/cm² ve 290-320 nm dalga boyu olan UVB 130 mj/cm² haftada 3 gün olmak üzere 12 hafta boyunca uygulanmıştır (78-80).

3.3.3. Doku Örneklerinin Elde Edilmesi ve Laboratuvar Ortamına Transportu

Sıçanların sırtlarında işaretlenen 5 adet uygulama alanı içindeki uygulama bölgelerini kapsayan doku örnekleri, transvers kesit histopatolojik değerlendirme ve PCR'da ekspresyon analizi için 4. ve 12. haftalarda 5 mm. punch biyopsi işlemi ile elde edilmiştir. Böylelikle her bir sıçandan histopatolojik inceleme ve PCR ekspresyon analizi için; başlangıçta kontrol amaçlı 1 adet histopatolojik inceleme, 1 adet PCR ekspresyon analizi için olmak üzere 2'şer adet, 4. haftada 5 adet histopatolojik inceleme, 5 adet PCR ekspresyon analizi için olmak üzere 10'ar adet ve 12. haftada 5 adet histopatolojik inceleme, 5 adet PCR ekspresyon analizi için olmak üzere 10'ar adet olmak üzere toplam 22'şer adet doku örneği alınmıştır. Doku örnekleri punch biyopsi ile alınırken skar dokusu gelişmesi nedeniyle, doku örneğinin yine aynı uygulama alanı içinde ancak bir önceki alınan noktadan alınmamasına özen gösterilmiştir. Alınan doku örnekleri histopatolojik inceleme için 10% formalin çözeltisinde saklanmış ve laboratuvara transport edilmiştir, PCR analizi için ise önce kapaklı plastik deney tüplerine atılıp, tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra da içinde -196°C sıvı azot gazı bulunan tank içine konularak laboratuvar ortamına doku örnekleri bozulmadan transportu sağlanmıştır (resim-5).



Resim-5: Ratlardan elde edilen doku örnekleri. Histopatolojik inceleme için formol içeren kırmızı kapaklı tüplere konarak patoloji laboratuvarına transport edilmiştir. İçi boş, şeffaf, plastik kapaklı tüplere konarak PCR analizi için biyoloji laboratuvarına azot gazı içeren tankta transportu sağlanmıştır.

3.3.4. Dokunun Patoloji Laboratuvarında Hazırlanması ve İncelenmesi

Formalin (10%) içerisinde patoloji laboratuvarına ulaştırılan punch biyopsiler makroskobik olarak ikiye bölünerek kasetlendi. Alınan örnekler rutin doku takibinden sonra parafin bloklara gömüldü. H&E ve histokimyasal boyamalar için 4-5 μ 'luk kesitler alındı. Histokimyasal boyama için kesilen lamalar 1 gece etüvde 50-55°C 'de bekletildi. Daha sonra deparafinize edilen dokulara MTK, EVG, Weigert Rezorsin Fuksin ve Herovici's Collagen Stain boyaları uygulandı. H&E ve histokimyasal boyalı lamalar ışık mikroskopunda Olympus BX 53 ile tek patolog tarafından değerlendirildi.

Histopatolojik olarak mikroskopla milimetrik epidermis ve dermis kalınlıkları ölçülmüş, yabancı cisim granülomları, fibröz kapsül yapısı, histiosit ve dev hücre formasyonu var/yok olarak değerlendirilmiştir.

İnflamasyon, fibroblast, solar elastoz ve vaskülarizasyon varlığı ve derecesi yoksa 0, gözlemlendiyse de 1, 2, 3 şeklinde derecesine göre literatürdeki bazı histopatolojik skorlama sistemleri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir (81, 82).

Dermisteki kollagen ve elastin'in kalitatif düzeyleri ve dizilimleri, neokollagenezis ve neoelastogenezis preparatlarda birbirleriyle kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

3.3.5. PCR sistemi ve Gen Ekspresyon Analizi

3.3.5.1. Dokudan Total RNA İzolasyonu

Gen ekspresyon analizi için dokudan RNA izolasyonu, NucleoZOLreagent ile gerçekleştirilmiştir. Her bir doku örneğinin yer aldığı tüplerin içerisine 1000 µL NucleoZOL ilave edilmiş ve homojenizasyon sağlanmıştır. Ependorf tüpün üzerine 200 µl klororoform ilave edilerek 15 saniye boyunca vortekslelendikten sonra tüm örnekler 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 4 C⁰'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından oluşan en üstteki faz karıştırılmadan otomatik pipet yardımıyla, yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan fazın üzerine 500 µl izopropanol eklendikten sonra önce birkaç kez alt üst edilmiş ve ardından da 4 C⁰'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırılarak kalan pelletin üzerine 1 mL %70'lik alkol ilave edildikten sonra, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pelletin kuruması için ependorf tüpleri 10-15 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ependorflara, 35 µl nükleaz içermeyen su eklenerek pelletin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. İzole edilen RNA'ların kalitelerinin ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için her bir örnekten 1 µl RNA alınarak nanodrop cihazında 230, 260 ve 280 dalga boylarında ölçümleri gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin kalitesinin belirlenebilmesi için her bir örnekten 1 µg RNA, 6X yükleme boyasıyla karıştırılarak agaroz jelde yürütülmüştür. Görüntüleme işlemi ise UV jel görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.3.5.2.Genomik DNA'nın uzaklaştırılması

Elde edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması için, DNase-I enzim (ThermoScientific) uygulaması üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için 1µg RNA, 1 µl 10X reaksiyon tamponu (MgCl₂), 1 µl DNase-I (RNase-free) enzimi ve nükleaz içermeyen su ile 10 µl'ye tamamlayacak şekilde

200 µl'lik RNase içermeyen PZR tüpünün içerisinde karıştırıldıktan sonra 37 C⁰'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda tüpün içerisine 1 µl 50 mM EDTA ilave edilerek 65 C⁰ 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.3.5.3.cDNA sentezi

DNase-I enzimi muamelesi ile genomik DNA'nın uzaklaştırılması işleminin ardından, her bir örneğin total RNA'sının cDNA sentezi için iScript™ cDNA sentez kiti (BIO-RAD, USA) kullanılmıştır. Bu işlem için, cDNA sentez kitinin içerisinde yer alan komponentlerden 5X iScript reaksiyon mix'den 4 µl, iScript reverse transkriptaz enziminden 1 µl, DNase enzimi ile muamele edilmiş her bir örnek RNA'sından 1 µg alınarak RNase içermeyen PCR tüpleri içerisinde toplam hacim 20 µl'ye tamamlanacak şekilde nükleaz içermeyen su ilave edilmiş ve tüpler hafif bir spin işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler thermal cycler cihazında başlangıç için 25 C⁰'de 5 dakika, reverse transkripsiyon için 46 C⁰'de 20 dakika, RT inaktivasyonu için 95 C⁰'de 1 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir örneğin cDNA'ları elde edilmiştir. Örneklerin cDNA'ları RT-qPCR'da çalışılana kadar -80 C⁰'de muhafaza edilmiştir.

3.4. İSTATİSTİK VE ANALİZ

3.4.1.Histopatolojik Değerlendirme

Nümerik değişkenler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma, nominal değişkenler için frekans ve yüzde değerleri verildi. Nümerik ve nominal sonuç değişkenlerinin analizinde geliştirilmiş doğrusal karma etki modelleri (generalised linear mixed effects models) kullanıldı. Bu modellerde sonuç değişkenleri üzerine grup (UV), zaman (0, 4 ve 12. hafta) ve alan (1, 2, 3, 4 ve 5. alanlar) etkileri incelendi. İstatistiksel hesaplamalar SAS University Edition 9.4 programı kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4.2.RT-qPCR Analizi

Col1A1, Col3A1, MMP2, MMP9, NF- κ B, IL-6 hedef genlerinin mRNA ekspresyonlarının kantitatif analizi için 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR master Mix Plus (ROX) (Solis Bio Dyne) kullanılmıştır. RT-qPCR reaksiyonu için 4 μ l master mix, 10 pmol/ μ l forward primer, 10 pmol/ μ l reverse primer, 5,5 μ l nükleaz içermeyen su ve kalıp olarak cDNA'dan da 4 μ l 8'li strip tüpler içerisinde karıştırılarak, Biorad CFX Connect cihazında, başlangıç aktivasyon basamağı (95 C°'de 12 dakika), 40 döngü amplifikasyon basamağı (95 C°'de 15 sn 60 C°'de 20 sn 72 C°'de 20) ve 65-95 C°'ye kadar 0,2 C°'lik kademeli ısı artışıyla melting curve (erime eğrisi) basamağından oluşan PCR koşulları uygulanmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında, hedef gen ifadeleri kat değişikliklerinin istatistiksel analizleri için web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programı kullanılmıştır. Deney üç tekrarlı çalışılmış, hedef genlerin qRT-PCR ile analizinde normalizasyonu için YWHAZ ve CYPA referans genleri kullanılmıştır (tablo-1). Sonuçlarda $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

Hedef Genleri		
Gen Adı	Primer Dizisi	Amplikon Büyüküğü (bp)
Col1A1	F:5- CCAATGGTGCTCCTGGTATT -3 R:5- GTTCACCACTGTTGCCTTTG-3	111
Col3A1	F:5- GTGTGATGATGAGCCACTAGAC-3 R:5- TGACAGGAGCAGGTGTAGAA-3	95
MMP2	F:5- CACCAAGAACTTCCGACTATCC-3 R:5- TCCAGTACCAGTGTCAGTATCA-3	94
MMP9	F:5- CGCTGGGCTTAGATCATTCTT-3 R:5- GGTTTAGAGCCACGACCATAC-3	130
NF-κB	F:5- GCTCAAGATCTGCCGAGTAAA-3 R:5- GTCCCGTGAAATACACCTCAA-3	113
IL-6	F:5- GAAGTTAGAGTCACAGAAGGAGTG-3 R:5- GTTTGCCGAGTAGACCTCATAG-3	105
Referans (Housekeeping) Genler		
YWHAZ	F: 5-CGTCTCGAGTATTGAGCAGAAG-3 R: 5- ACAGTACGTCGTTGCAGATG -3	120
CYPA	F: 5-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3 R: 3-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3	126

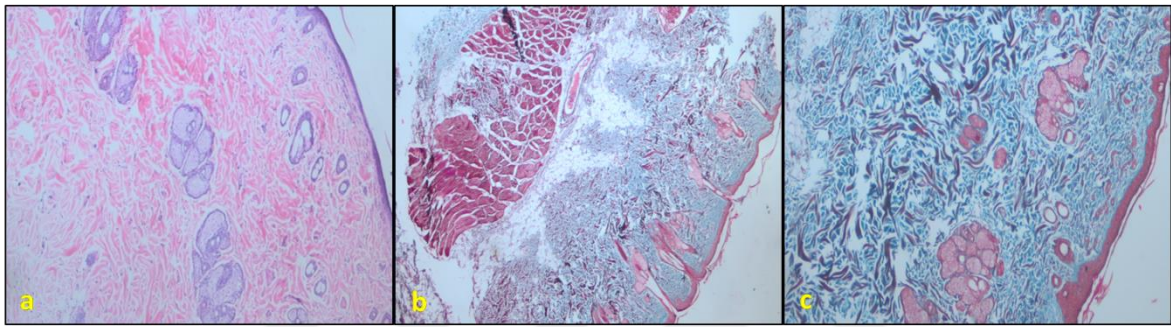
Tablo-1: RT-qPCR analizi için kullanılan hedef ve referans genlerin primer dizileri.

4. BULGULAR

Yapılan hayvan deneyi sırasında ölen 7 ve 12 nolu sıçanlar hariç çalışma, 18 sıçanla tamamlanmıştır. Deneyin sonunda sıçanlar sakrifiye edilmemiş, alınan doku örnekleri laboratuvar ortamında histopatolojik olarak incelenmiş ve PCR'da gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

4.1. Histopatolojik Değerlendirme

Yapılan mikroskopik görüntülemelerde normal doku örnekleri kayda alınmış ve diğer kıyaslamalara, bu örneklerle göre karar verilmiştir (resim-6).



Resim-6: 0 ve 12. haftalardaki 1 nolu kontrol alanı histopatolojileri. a-H&E x40, H0R1A1. İnflamasyon ve vasküler proliferasyon yok. b-MTK x20 H12R1A1. MTK boyamada fibrozis yok. c- MTK x40 H0R2A1. MTK boyamada fibrozis yok.

4.1.1. Epidermal Kalınlık ve Dermal Kalınlık

Epidermal ve dermal kalınlıklar mikroskopta milimetrik ölçümlerle her bir sıçan ve alan için değerlendirilmiştir ve bulguları şöyledir:

Epidermal kalınlıkta

- UV alan deney grubunda kontrol gruba kıyasla 0.002 birimlik azalma mevcuttur ancak anlamsızdır.
- Alan etkisine bakıldığında 1.alan olan kontrole kıyasla **en çok ip+dolgu** uygulanan 4. alanında olmak üzere (0.04 birim, **p<0.05**) **tüm alanlarda azalma** mevcuttur. **İp+dolgu+BTX-A** uygulanan 5. alanda 0.03 birimlik (**p<0.05**), **dolgu** uygulanan 3.alanda 0.02 birimlik (**p<0.05**) ve sadece ip uygulanan alanda 0.007 birimlik (**p>0.05**) azalmalar saptanmıştır.
- Hafta etkisine bakıldığında 0.hafta bazale göre 4. haftada 0.01 birimlik azalma ve 12. haftada 0.01 birimlik artış vardır ve iki değer de anlamsızdır.

Dermal kalınlıkta ise

- **UV** alan deney grubunda UV almayan kontrol gruba kıyasla 0.26 birimlik **azalma** mevcuttur ve **anlamlıdır (p<0.05)**.
- Alan etkisine bakıldığında 1.alan olan kontrole kıyasla ip uygulanan 2. alanda 0.03 birimlik azalma saptanmıştır ve anlamsızdır. 3. alanda 0.04 birimlik, 4.alanda 0.04 birimlik, 5.alanda 0.03 birimlik artışlar saptanmıştır ve anlamsızdır.
- Hafta etkisine bakıldığında 0.hafta bazale göre 4. haftada 0.01 birimlik ve 12. haftada 0.08 birimlik azalma vardır ve iki değer de anlamsızdır.

4.1.2. Solar Elastoz

Solar elastoz değerlendirmesinde

- **UV** alan deney grubunda UV almayan kontrol gruba kıyaslaodds değeri 32.58 kat (95% güven aralığı 3.55-298.22) olmak üzere **anlamlı fazla** tespit edildi(**p<0.05**).
- Alan etkisine bakıldığında en fazla solar elastoz dolgu uygulanan 3. alanda olmak üzere (odds değeri 14.95), tüm alanlarda kontrole kıyasla artış saptanmıştır ancak anlamsızdır.
- **4.haftada** (odds değeri >999.999) ve **12. haftada** da (odds değeri >999.999)0.hafta bazale göre **anlamlı** olarak **artmış** saptandı (**p<0.05**).

4.1.3. Kollajen içeriği ve düzeni

- Histopatolojik analizde kollajen (fibroblast) düzeyleri ve kollajen organizasyonu (Odds oranı değerleri)
(Kıyaslamalarda 1.alan ve 0.hafta baz alınmıştır.)

Alanlar	UV (-)				UV (+)			
	4.hafta		12.hafta		4.hafta		12.hafta	
	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre
A1 (kontrol)	0.68		0.70		33.35		1.64	
A2 (ip)	49.24**	72.24**	38.64*	54.94**	164.18	4.50	1728.12*	962.34
A3 (dolgu)	12.15	16.79*	48.55**	64.96**	388.66	11.48	1003.92*	601.86
A4 (ip+dolgu)	10.98	13.98*	48.88**	60.32**	5263.92*	151.26**	7110.02**	4144.97
A5 (ip+dolgu+BTX)	25.96*	34.06**	147.71**	187.74**	2736.69*	73.79**	4728.70*	2586.79

Tablo-2: Kollajenin kalitatif düzeyleri ve histopatolojik olarak alan ve haftaya göre kıyaslamalı sonuçları

*p<0.05 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

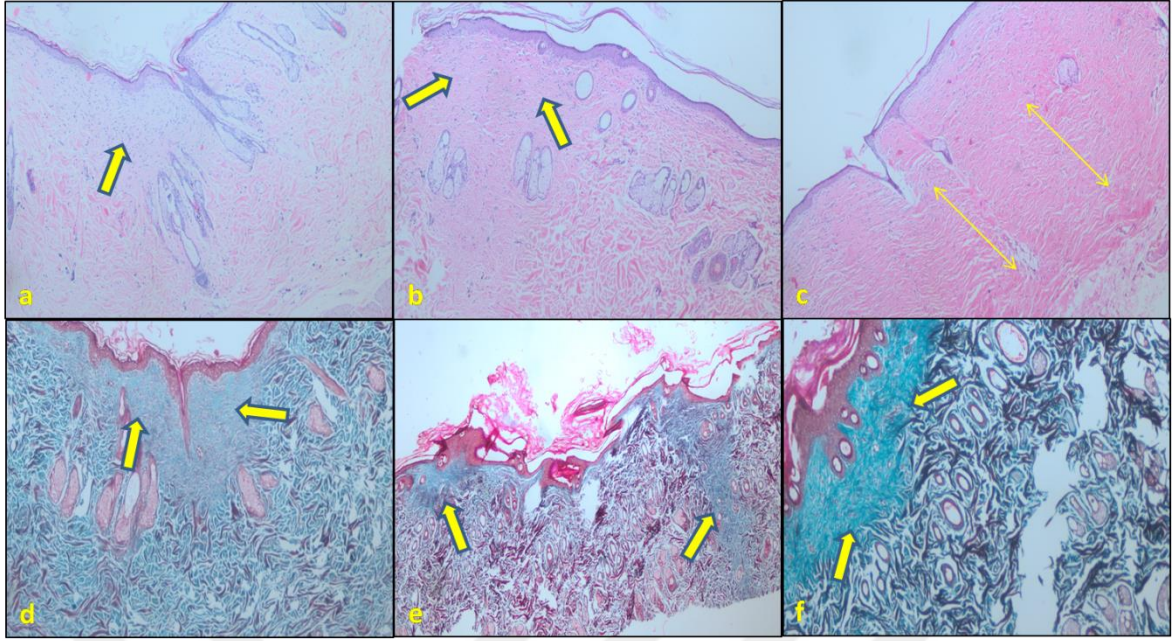
**p<0.01 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

- Histopatolojik analizde UV alan deney grubunun UV almayan kontrol gruba kıyasla kollajen (fibroblast) düzeyleri ve kollajen organizasyonu (Odds oranı değerleri)

Uygulama alanları	0.hafta	4.hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	0.01	0.88	0.04
A2 (ip)	0.01	0.05**	0.740
A3 (dolgu)	0.01	0.60	0.39
A4 (ip+dolgu)	0.02	9.58**	2.90
A5 (ip+dolgu+BTX)	0.01	1.92	0.58

Tablo-3: UV uygulanan deney grubunun UV almayan kontrol gruba kıyasla kollajen düzeyleri ve organizasyonunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi

**p<0.01 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.



Resim-7: 4. ve 12. haftaya ait histopatolojik örneklerde fibrozis alanları (sarı oklarla işaretlenmiştir).
a- H&E x40, H4R3A5. b- H&E x40, H12R6A2. c- H&E x40, H12R6A5. d- MTK x40, H4R3A5.
e- MTK x20, H12R3A3. f- MTK x40, H4R18A5

- PCR analizinde Col1A1 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)
(Kıyaslamalarda 1.alan ve 0.hafta baz alınmıştır.)

Alanlar	UV (-)				UV (+)			
	4.hafta		12.hafta		4.hafta		12.hafta	
	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre
A1 (kontrol)	-1.30		-8.38*		-11		-9.17*	
A2 (ip)	-1.31	-1.01	-1.79	4.68	-7.35**	1.5	-3.39	2.71
A3 (dolgu)	-2.49	-1.91	-5.6	1.5	-5.39	2.04	-1.38	6.67
A4 (ip+dolgu)	-2.57	-1.98	-1.64	5.1*	-3.19**	3.45	-5.67**	1.62
A5 (ip+dolgu+BTX)	-2.28	-1.75	-2.87	2.92	-6.42*	1.71	-2.53**	3.62

Tablo-4: Haftalara ve alanlara göre Col1A1 ekspresyon analizi sonuçları

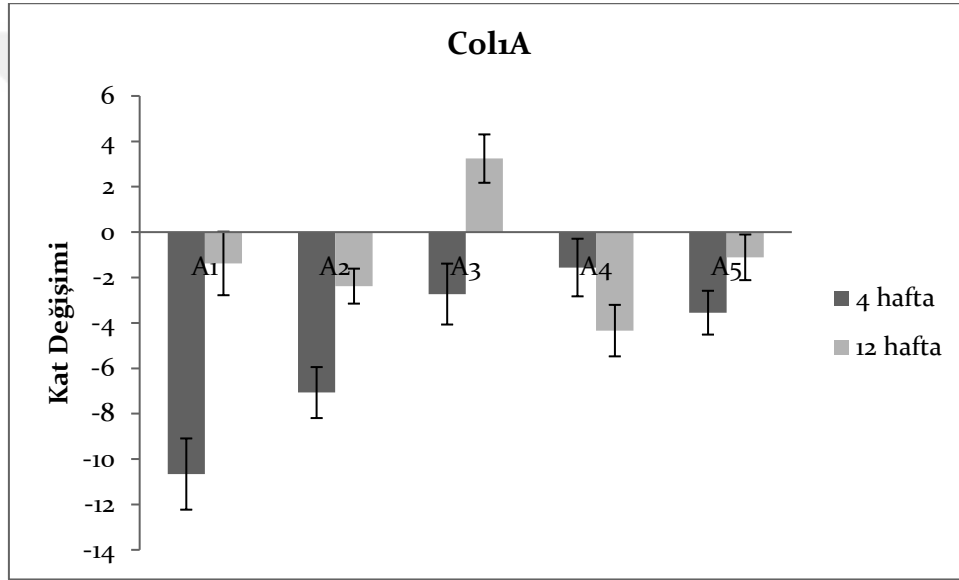
* $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

** $p < 0.01$ olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

- PCR analizinde Col1A1 ekspresyonunun UV alan deney grubunda, UV almayan gruba kıyasla değişimi (kat değişimi)

Alanlar	4. hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	-10.66	-1.38
A2 (ip)	-7.07	-2.38
A3 (dolgu)	-2.73	3.24
A4 (ip+dolgu)	-1.56	-4.34
A5 (ip+dolgu+BTX)	-3.55	-1.11

Tablo-5: Haftalara ve alanlara göre Col1A1 ekspresyonunda UV etkisi



Şekil-2: Haftalara ve alanlara göre Col1A1 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)

- PCR analizinde Col3A1 ekspresyon sonuçları (kat değişimi değerleri)
(Kıyaslamalarda 1.alan ve 0.hafta baz alınmıştır.)

Alanlar	UV (-)				UV (+)			
	4.hafta		12.hafta		4.hafta		12.hafta	
	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre	0.haftaya göre	A1'e göre
A1 (kontrol)	1.98		-1.45		-4.35		-3.54**	
A2 (ip)	2.86	1.44	-1.3	1.12	-2.51	1.73	-2.6	1.36
A3 (dolgu)	1.31	-1.51	1.09	1.58	-1.92*	2.27	1.03	3.64
A4 (ip+dolgu)	0.99	-1.99	1.12	1.61	-2.12	2.05	-2.1*	1.69
A5 (ip+dolgu+BTX)	1.62	-1.22	-1.15	1.26	-1.7	2.55	-1.2	2.94

Tablo-6: Haftalara ve alanlara göre Col3A1 ekspresyon analizi sonuçları

*p<0.05 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

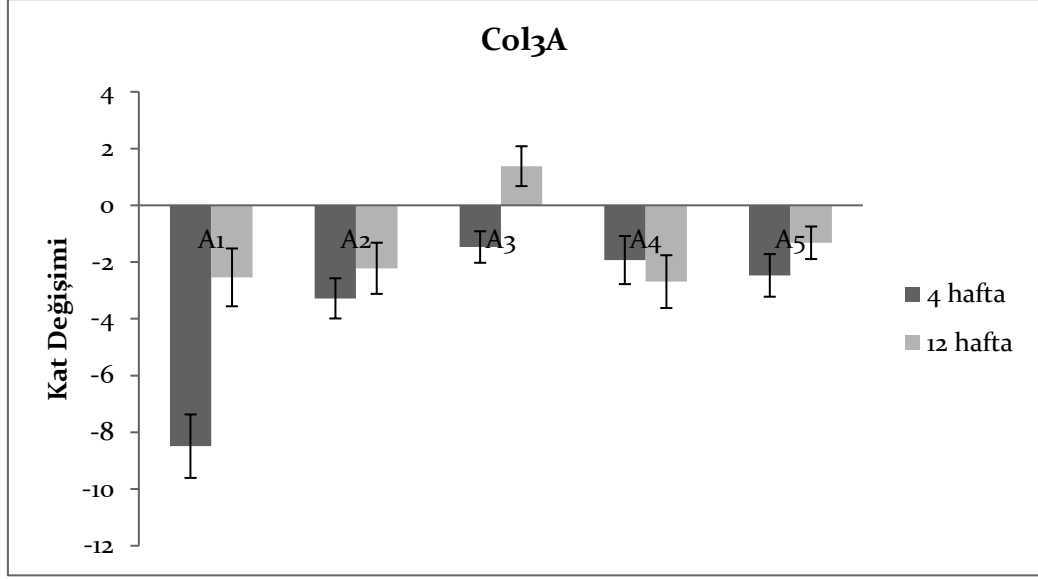
**p<0.01 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

- PCR analizinde Col3A1 ekspresyonunun UV alan deney grubunda, UV almayan gruba kıyasla değişimi (kat değişimi)

Alanlar	4. hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	-8.49*	-2.54*
A2 (ip)	-3.28	-2.22
A3 (dolgu)	-1.47	1.38
A4 (ip+dolgu)	-1.93	-2.69
A5 (ip+dolgu+BTX)	-2.47	-1.32

Tablo-7: Haftalara ve alanlara göre Col3A1 ekspresyonunda UV etkisi

*p<0.05 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.



Şekil-3: Haftalara ve alanlara göre Col3A1 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)

4.1.4. İnflamasyon varlığı ve şiddeti değerlendirmesi

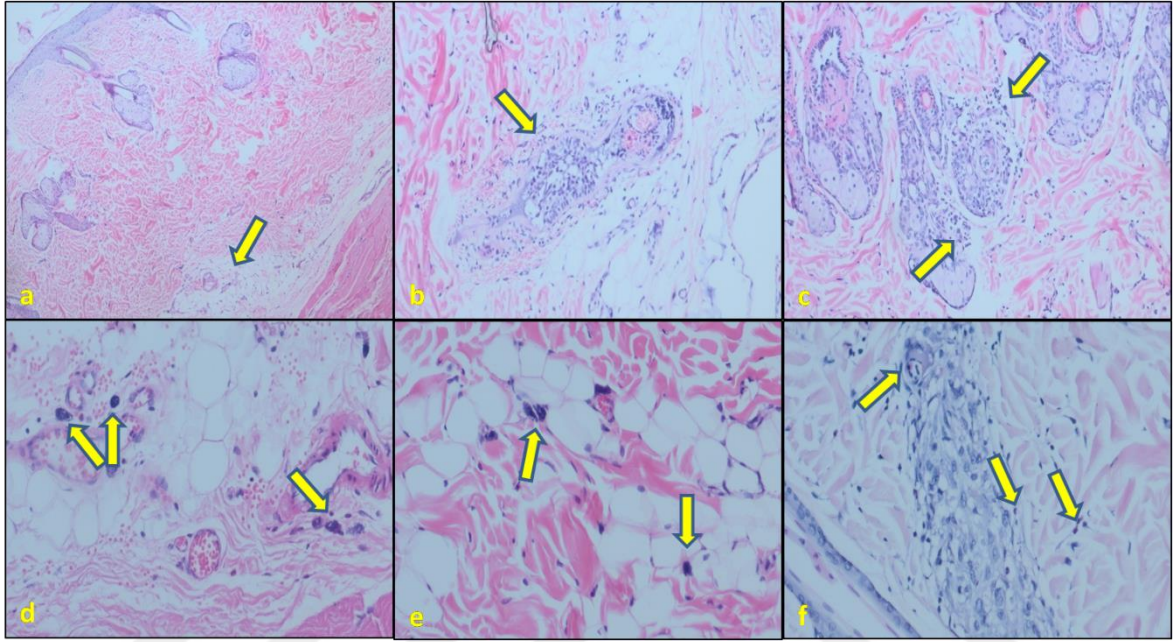
- 1 nolu kontrol alanıyla kıyaslandığında;
 - Dolgu uygulanan **3 nolu alanda en fazla** olmak üzere (odds değeri 38.00 kat, 95% güven aralığı 13.79-104.66) **tüm alanlarda anlamlı artış ($p<0.05$)** saptanmıştır.
 - İp uygulanan 2 nolu alanda 22.43 kat odds'luk artış ve 95% güven aralığı 8.22-61.21, ip+dolgu uygulanan 4 nolu alanda 21.33 kat odds'luk artış ve 95% güven aralığı 7.89-57.65, ip+dolgu+BTX-A uygulanan 5 nolu alanda 27.57 kat odds'luk artış ve güven aralığı 9.95-76.38 saptanmıştır.
- 0. hafta bazale göre;
 - 4.haftada** 107.59 kat odds'luk **artış** (95% güven aralığı 14.18-816.16),
 - 12. haftada** 92.10 kat odds'luk **artış** (95% güven aralığı 12.93-655.95) gözlenmiştir ve **anlamlıdır ($p<0.05$)**.
- UV alan deney grubunda almayan kontrol gruba kıyasla odds değeri 1.27 olmak üzere inflamasyonda artış saptanmıştır ancak anlamsızdır.

İnflamatuvar hücrelerin detaylı kalitatif incelemesinde;

- Nötrofil düzeylerinde:
 - UV uygulanan 2. grupta UV uygulanmayan 1. gruba kıyasla odds değeri 0.93'tür ve bu azalma anlamsız çıkmıştır.
 - 4. haftada** (odds değeri 58.08) ve **12. haftada** (odds değeri 138.87) nötrofil sayıları bazale göre **anlamlı** yüksektir ($p<0.05$).
 - En fazla 4.alan** olan ip+dolgu uygulamada olmak üzere **tüm alanlarda** nötrofil düzeyleri 1 nolu kontrol alanına kıyasla **anlamlı** olarak **artış** göstermiştir ($p<0.05$).
- Eozinofil düzeylerinde:
 - UV uygulanan 2. grupta UV uygulanmayan 1. gruba kıyasla odds değeri 1.05'tir ve bu artış anlamsız çıkmıştır
 - 1 nolu kontrol alanına göre **en fazla** ip uygulanan **2.alanda** (odds değeri 360.40, 95% güven aralığı 95.30->999.999) olmak üzere **tüm alanlarda anlamlı artış** gözlenmiştir ($p<0.05$).
 - 0.hafta bazale göre akut dönemde (**4. hafta**) belirgin **anlamlı artış** (odds değeri 347.58, 95% güven aralığı 130.44-926.16) gözlenmiştir ($p<0.05$).
 - 12. haftada** bu **artış** daha az düzeydedir (odds değeri 245.26, 95% güven aralığı 85.02-707.51) ancak **anlamlıdır** ($p<0.05$).
- Histiosit düzeylerinde
 - UV uygulanan grupta kontrol gruba kıyasla odds değeri 3.97 gelmiştir. Ancak bu artış anlamlı çıkmamıştır.
 - Alan faktörünün anlamlı etkisi olmamıştır ancak tüm alanlarda 1. kontrol alanına kıyasla odds değeri >999.999 olarak bulunmuştur.
 - 0.hafta bazale göre akut dönemde(**4. hafta**) belirgin **anlamlı artış** (odds değeri >999.999, 95% güven aralığı >999.999->999.999) ve kronik dönemde (**12. hafta**) belirgin **anlamlı artış** (odds değeri >999.999) saptanmıştır.
- Mast hücre düzeylerinde ise
 - UV** maruziyeti mast hücre sayısında **anlamlı düşüşe** yol açmıştır (odds değeri 0.155, 95% güven aralığı 0.05-0.45) ($p<0.05$).
 - Alan faktörüne bakıldığında **en fazla** ip uygulanan **2 nolu alanda artış** gözlenmiştir ve odds değeri 564.75 (95% güven aralığı 84.59->999.999)

olarak **anlamlıdır** ($p<0.05$). Daha az odds değeri olmak üzere **diğer uygulama alanlarında da** kontrole kıyasla **anlamlı** olarak **yüksek** bulunmuştur ($p<0.05$).

-0.hafta bazale göre akut dönemde **4. haftada** (odds değeri:144.67, 95% güven aralığı 42.15-496.45) ve **12. haftada** da (odds değeri 175.00) bazale göre **anlamlı artış** gözlenmiştir ($p<0.05$).



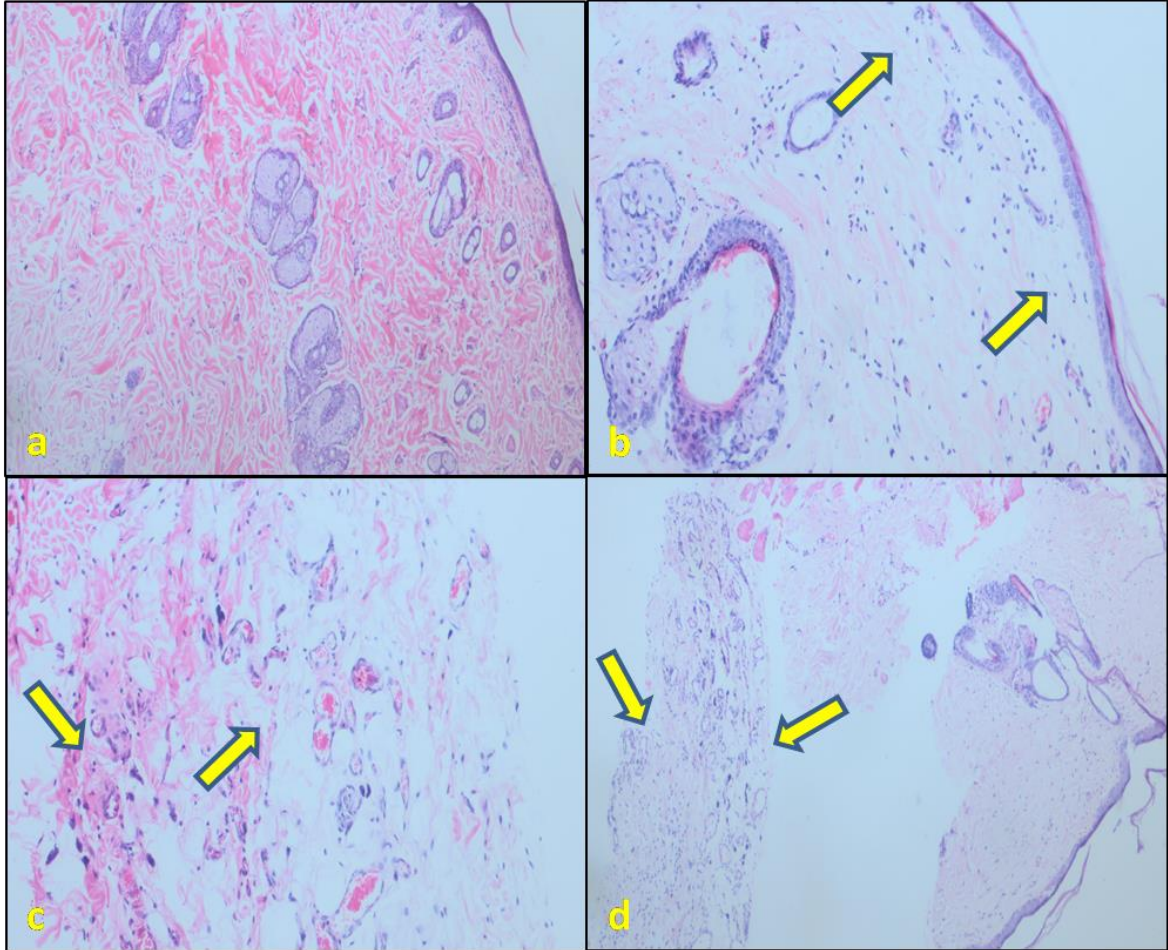
Resim-8: 4 ve 12. haftalarda gözlenen inflamatuvar değişiklikler.

a-H&E x40, H12R3A2. Hafif inflamatuvar değişiklikler. b- H&E x100 H4R6A5. Belirgin inflamasyon (lenfosit predominant). c- H&E x100 H12R19A2. Belirgin inflamasyon (lenfosit predominant). d- H&E x200 H12R3A2 Mast hücreleri (sarı oklar). e- H&E x200 H12R1A2 Mast hücreleri (sarı oklar). f- H&E x200 H4R13A5 lenfosit, histiosit ve eozinofil (sarı oklar) infiltrasyonu.

4.1.5. Vaskülarizasyon varlığı ve şiddeti değerlendirmesi

- 1 nolu kontrol alanıyla kıyaslandığında;
 - Dolgu uygulanan **3 nolu alanda en fazla** olmak üzere (odds değeri 13.57 kat, 95% güven aralığı 4.91-37.47) **tüm alanlarda anlamlı artış** ($p<0.05$) saptanmıştır.
 - İp uygulanan 2 nolu alanda 9.63 kat odds'luk artış ve 95% güven aralığı 3.45-26.86, ip+dolgu uygulanan 4 nolu alanda 12.99 kat odds'luk artış ve 95% güven aralığı 4.63-36.42, ip+dolgu+BTX-A uygulanan 5 nolu alanda 10.48 kat odds'luk artış ve 95% güven aralığı 3.77-29.14 saptanmıştır.

- 0. hafta bazale göre;
 -**4.haftada** 65.35 kat odds'luk **artış** (95% güven aralığı 16.02-266.46),
 -**12. haftada** 57.44 kat odds'luk **artış** (95% güven aralığı 13.95-236.53)
 gözlenmiştir ve **anlamlıdır** ($p<0.05$).
- UV alan deney grubunda almayan kontrol gruba kıyasla odds değeri 2.10 olmak üzere artış saptanmıştır ancak anlamsızdır.

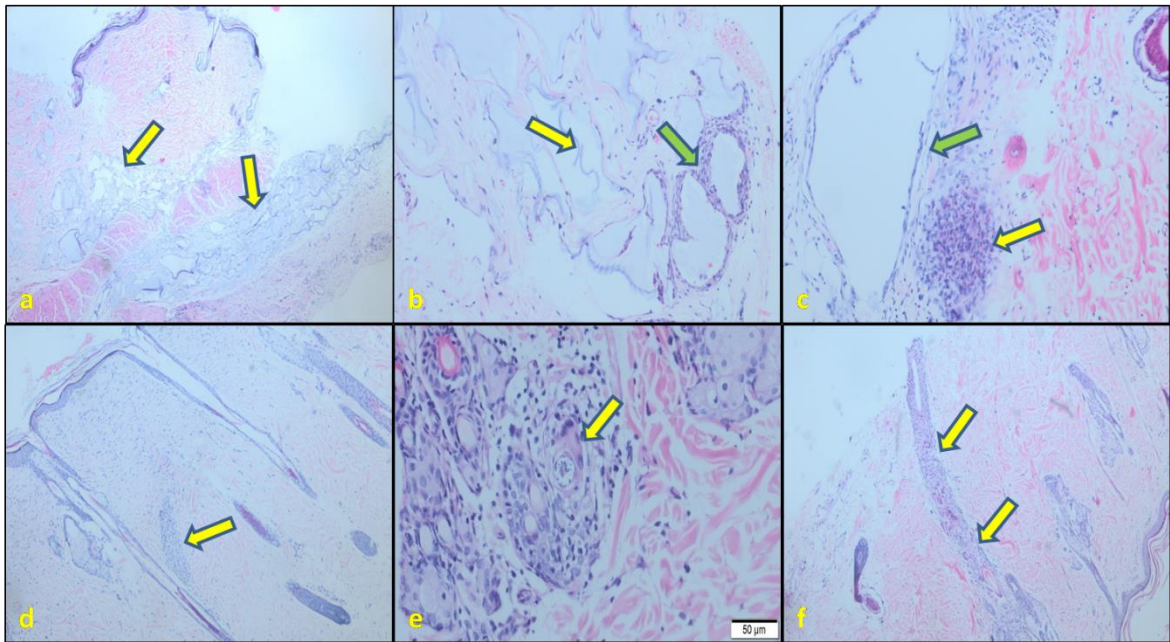


Resim-9: 0, 4 ve 12. haftalarda vaskülarizasyondaki değişimler.

a- H&E x40 H0R3A1. Normal. b- H&E x100 H4R12A3. Sarı oklar epidermis altında belirgin ödem. c- H&E x100 H12R2A2. Sarı oklar vasküler proliferasyon. d- H&E x40 H12R10A4 Sarı oklar vasküler proliferasyon.

4.1.6. Dev Hücre ve Yabancı Cisim Granülomu

- 1 nolu kontrol alanıyla kıyaslandığında;
 - PDO ip+dolgu+BTX-A uygulanan 5 nolu alanda en fazla olmak üzere (odds değeri 6.81 kat) tüm alanlarda artış ($p<0.05$) saptanmıştır ancak anlamlı çıkmamıştır.
- 0. hafta bazale göre;
 - 4.haftada** 129.61 kat odds'luk **artış**, **12. haftada** 27.82 kat odds'luk **artış** gözlenmiştir ve **anlamlıdır** ($p<0.05$).
- UV alan deney grubunda almayan kontrol gruba kıyasla odds değeri **13.64 kat** olmak üzere **artış** saptanmıştır ve **anlamlı** bulunmuştur ($p<0.05$).



Resim-10: Kapsül formasyonu ve granülom yapısının 4 ve 12. haftalardaki görünümü.

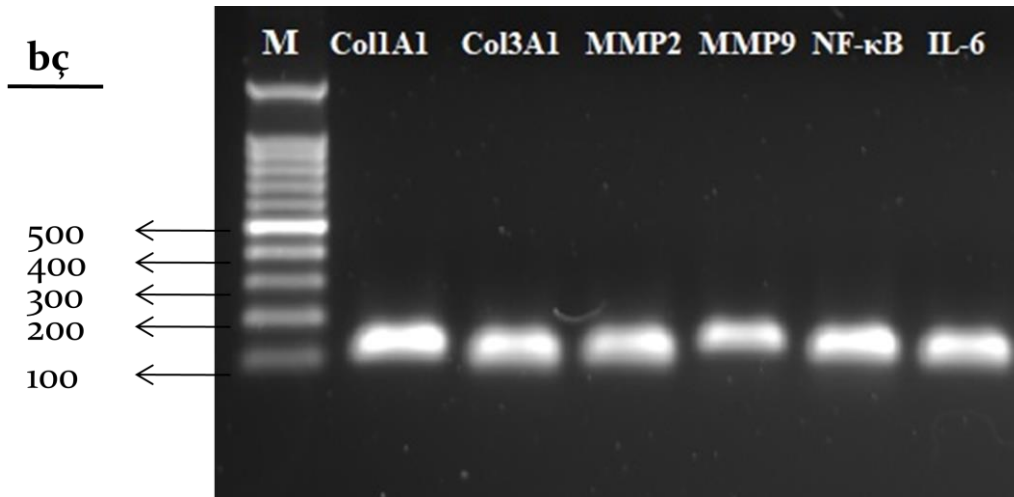
a- H&E x20 H4R14A4. Sarı oklar ip ve dolgu maddesi. b- H&E x100 H12R4A5. Sarı ok ip ve dolgu maddesi, yeşil ok lenfosit ve histiosit infiltrasyonu. c- H&E x100 H4R6A5. Yeşil ok kapsül formasyonu, sarı ok granülom yapısı. d- H&E x40 H4R13A5 Sarı ok dermiste granülom yapısı. e- H&E x200 H12R19A2 Sarı ok multinükleer dev hücre formasyonu. f- H&E x40 H12R19A2 Sarı oklar multinükleer dev hücreler ve granülom formasyonu.

4.1.7. Kapsül Benzeri Yapı Oluşumu

- 1 nolu kontrol alanıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak;
-**En fazla** ip+dolgu+BTX-A uygulanan **5. alanda** (odds değeri 76.76 kat) olmak üzere **tüm alanlarda anlamlı** olarak **fazla** saptanmıştır (**p<0.05**).
-2.alanda 21.75 kat (95% güven aralığı 1.58-298.93) , 3. alanda 6.44 kat ve 4. alanda 39.80 kat fazla saptanmıştır.
- 0. hafta bazale göre;
-**4.haftada** 29.50 kat odds'luk **artış** (95% güven aralığı 6.24-139.45), **12. haftada 33.07** kat odds'luk **artış** gözlenmiştir ve **anlamlıdır** (**p<0.05**).
- UV alan deney grubunda almayan kontrol gruba kıyasla odds değeri 5.64 kat olmak üzere **artış** saptanmıştır ve **anlamlı** bulunmuştur (**p<0.05**).

4.2. MMP-2, MMP-9, IL-6, NF-KB Gen Ekspresyonlarının PCR analiziyle değerlendirilmesi

Çalışmada gen ekspresyonları değerlendirilirken, jel elektroforez görüntüsü kayda alınmıştır (şekil-2).



Şekil-4: Çalışmada mRNA ekspresyon analizleri gerçekleştirilen hedef gen genlerin real time PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri. M: 100 bç (baz çift)'lik DNA marker

MMP-2 ekspresyon düzeylerinin PCR analizi sonucunda:

- UV uygulanmayan 1. grupta 0. haftadaki bazale göre MMP-2 ekspresyonu:

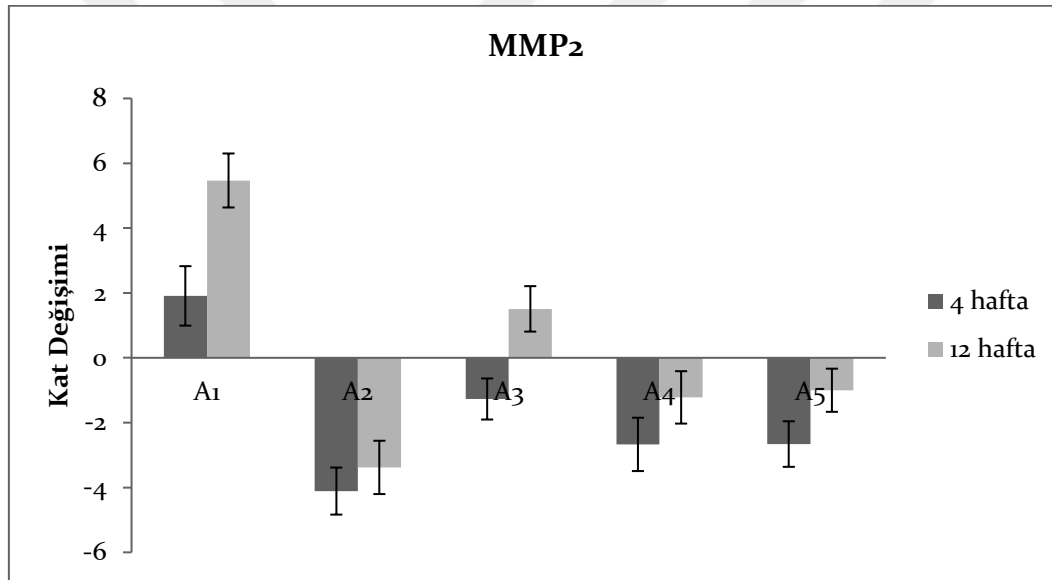
- 1.alanda 4.haftada 1.44 kat yüksek ve 12. haftada 1.71 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
- 2.alanda 4.haftada 2.1 kat yüksek ve 12. haftada 1.05 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
- 3.alanda 4.haftada 1.25 kat düşük ve 12. haftada 1.11 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
- 4.alanda 4.haftada 1.8 kat düşük ve 12. haftada 1.54 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
- 5.alanda 4.haftada 1.35 kat yüksek ve 12. haftada 1.16 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
- UV uygulanan 2. grupta 0. haftadaki bazale göre MMP-2 ekspresyonu:
 - 1.alanda **4.haftada 2.67 kat yüksek ve 12. haftada 3.15 kat yüksek** saptanmıştır ve her iki değer de **anlamlıdır (p<0.05)**.
 - 2.alanda 4.haftada 2.24 kat düşük ve 12. haftada 1.72 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 3.alanda 4.haftada 2.2 kat düşük ve 12. haftada 1.51 kat yüksek saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 4.alanda 4.haftada 2.75 kat düşük ve 12. haftada 1.57 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 5.alanda 4.haftada 1.69 kat düşük ve 12. haftada 1.58 kat yüksek saptanmıştır ve anlamsızdır.
- UV uygulanan 2. grubun UV uygulanmayan 1.grupla kıyaslamasında 0. haftadaki bazale göre MMP-2 ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 1.91 kat ve 12.haftada 5.47 kat yüksek** saptanmış olup bu değerler **anlamlıdır (p<0.05)**.
 - 2.alanda 4. haftada 4.11 kat ve 12.haftada 3.38 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 3.alanda 4. haftada 1.27 kat düşük ve 12.haftada 1.51 kat yüksek saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 4.alanda 4. haftada 2.67 kat düşük ve 12.haftada 1.22 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 5.alanda 4. haftada 2.66 kat ve 12.haftada 1 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.

	UV (-)		UV (+)	
Alanlar	4.hafta	12.hafta	4.hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	1.44	-1.71	2.67**	3.15**
A2 (ip)	2.1	-1.05	-2.24	-1.72
A3 (dolgu)	-1.25	-1.11	-2.2	1.51
A4 (ip+dolgu)	-1.8	-1.54	-2.75	-1.57
A5 (ip+dolgu+BTX)	1.35	-1.16	-1.69	1.58

Tablo-8: PCR analizinde 0.haftaya göre MMP-2 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)

*p<0.05 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

**p<0.01 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.



Şekil-5: Haftalara ve alanlara göre MMP2 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)

MMP-9 ekspresyon düzeylerinin PCR analizi sonucunda:

- UV uygulanmayan 1. grupta 0. haftadaki bazale göre MMP-9 ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 1.33 kat düşük ve 12. haftada 1.62 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 2.alanda 4.haftada 1.27 kat düşük ve 12. haftada 2.45 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 3.alanda 4.haftada 3.29 kat düşük ve 12. haftada 1.25 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

-4.alanda 4.haftada 4.59 kat düşük ve 12. haftada 2.61 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

-5.alanda 4.haftada 2.83 kat düşük ve 12. haftada 1.69 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

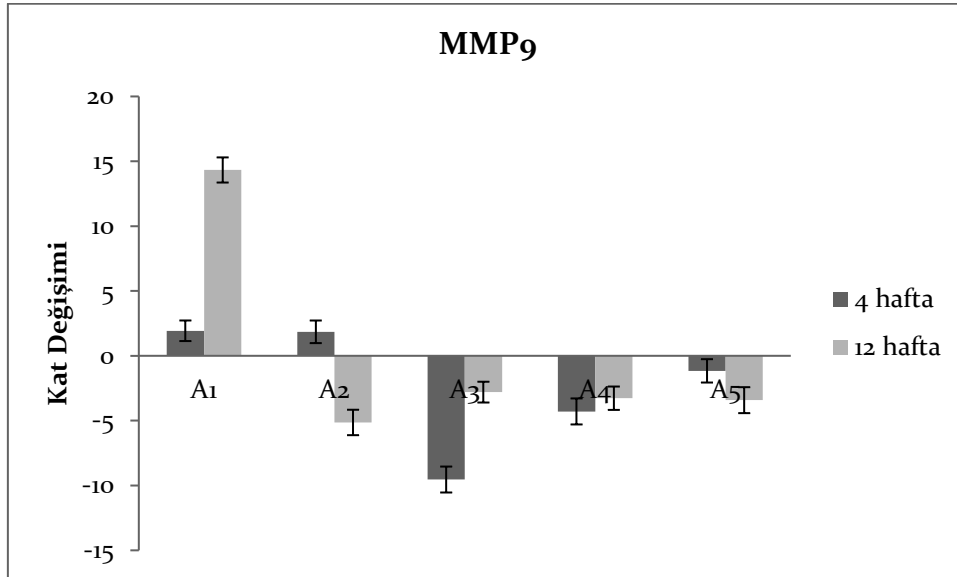
- UV uygulanan 2. grupta 0. haftadaki bazale göre MMP-9 ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 3.15 kat yüksek ve 12. haftada 19.15 kat yüksek saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 2.alanda 4.haftada 8.59 kat düşük saptanmıştır anlamsızdır ve **12.haftada 5.8 kat düşük** saptanmıştır ve **anlamlıdır ($p<0.05$)**.
 - 3.alanda **4.haftada 14.5 kat düşük** saptanmıştır, **anlamlıdır ($p<0.05$)** ve 12. haftada 1.62 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 4.alanda **4.haftada 9.09 kat düşük** ve **12. haftada 3.93 kat düşük** saptanmıştır ve **her iki değer de anlamlıdır ($p<0.05$)**.
 - 5.alanda 4.haftada 1.51 kat düşük ve 12. haftada 2.68 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
- UV uygulanan 2. grubun UV uygulanmayan 1.grupla kıyaslamasında 0. haftadaki bazale göre MMP-9 ekspresyonu:
 - 1.alanda **4.haftada 1.93 kat ve 12.haftada 14.33 kat yüksek** saptanmış olup anlamsızdır.
 - 2.alanda 4. haftada 1.85 kat yüksek ve 12.haftada 5.14 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 3.alanda 4. haftada 9.54 kat düşük ve 12.haftada 2.8 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 4.alanda 4. haftada 4.29 kat düşük ve 12.haftada 3.27 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 5.alanda 4. haftada 1.16 kat düşük ve 12.haftada 3.42 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.

	UV (-)		UV (+)	
Alanlar	4.hafta	12.hafta	4.hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	-1.33	-1.62	3.15	19.15
A2 (ip)	-1.27	-2.45	-8.59	-5.8**
A3 (dolgu)	-3.29	-1.25	-14.5**	-1.62
A4 (ip+dolgu)	-4.59	-2.61	-9.09*	-3.93*
A5 (ip+dolgu+BTX)	-2.83	-1.69	-1.51	-2.68

Tablo-9: PCR analizinde 0.haftaya göre MMP-9 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)

*p<0.05 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

**p<0.01 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.



Şekil-6: Haftalara ve alanlara göre MMP9 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)

NF-KB ekspresyon düzeylerinin PCR analizi sonucunda:

- UV uygulanmayan 1. grupta 0. haftadaki bazale göre NF-KB ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 1.46 kat düşük ve 12. haftada 4.36 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 2.alanda 4.haftada 1.32 kat yüksek ve 12. haftada 1.65 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 3.alanda 4.haftada 2.15 kat düşük ve 12. haftada 2.57 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 4.alanda 4.haftada 3.01 kat düşük ve 12. haftada 1.54 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

-5.alanda 4.haftada 1.16 kat düşük ve 12. haftada 2.35 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

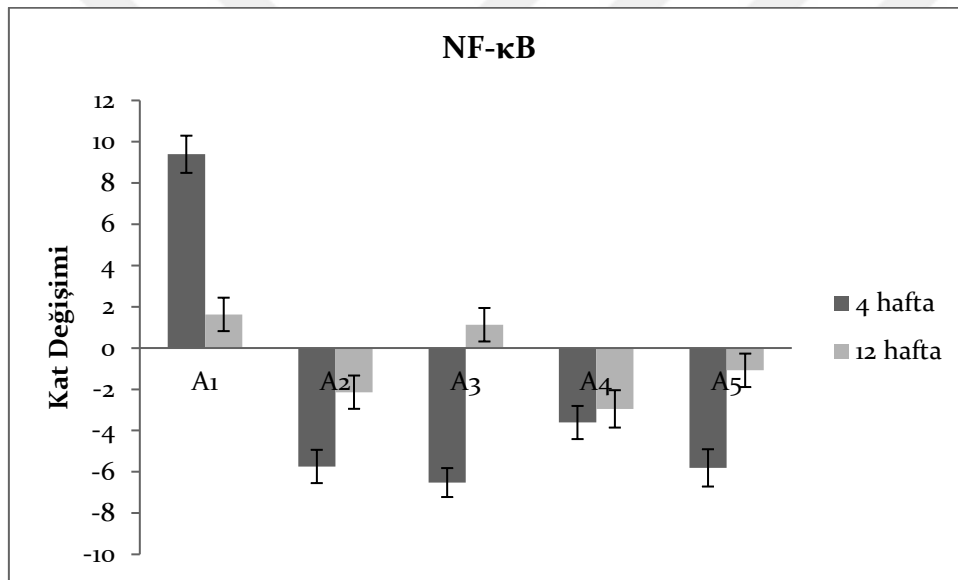
- UV uygulanan 2. grupta 0. haftadaki bazale göre NF-KB ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 3.05 kat yüksek saptanmış olup anlamsızdır ve **12. haftada 9.25 kat yüksek** saptanmıştır ve bu değer **anlamlıdır ($p<0.05$)**.
 - 2.alanda 4.haftada 2.17 kat yüksek saptanmış ve ve 12. haftada 7.03 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır.
 - 3.alanda 4.haftada 2.98 kat yüksek saptanmış ve ve 12. haftada 10.87 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır
 - 4.alanda 4.haftada 3.85 kat yüksek saptanmış olup anlamsızdır ve **12. haftada 5.46 kat yüksek** saptanmıştır ve bu değer **anlamlıdır ($p<0.05$)**.
 - 5.alanda 4.haftada 6.19 kat yüksek saptanmış ve ve 12. haftada 9.72 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır
- UV uygulanan 2. grubun UV uygulanmayan 1.grupla kıyaslamasında 0. haftadaki bazale göre NF-KB ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 9.39 kat ve 12.haftada 1.63 kat yüksek saptanmış olup anlamsızdır.
 - 2.alanda 4. haftada 5.74 kat düşük ve 12.haftada 2.14 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 3.alanda 4. haftada 6.52 kat düşük ve 12.haftada 1.13 kat yüksek saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 4.alanda 4. haftada 3.61 kat düşük ve 12.haftada 2.95 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.
 - 5.alanda 4. haftada 5.81 kat düşük ve 12.haftada 1.08 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.

	UV (-)		UV (+)	
Alanlar	4.hafta	12.hafta	4.hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	-1.46	-4.36	3.05	9.25*
A2 (ip)	1.32	-1.65	2.17	7.03
A3 (dolgu)	-2.15	-2.57	2.98	10.87
A4 (ip+dolgu)	-3.01	-1.54	3.85	5.46*
A5 (ip+dolgu+BTX)	-1.16	-2.35	6.19	9.72

Tablo-10: PCR analizinde 0.haftaya göre NF-KB ekspresyon sonuçları (kat değişimi)

*p<0.05 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

**p<0.01 olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.



Şekil-7: Haftalara ve alanlara göre NFKB ekspresyonunda UV etkisi (grafik)

IL-6 ekspresyon düzeylerinin PCR analizi sonucunda:

- UV uygulanmayan 1. grupta 0. haftadaki bazale göre IL-6 ekspresyonu:
 - 1.alanda 4.haftada 1.48 kat düşük ve 12. haftada 1.89 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 2.alanda 4.haftada 1.71 kat düşük ve 12. haftada 1.49 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.
 - 3.alanda 4.haftada 2.98 kat düşük ve 12. haftada 1.86 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

-4.alanda 4.haftada 3.53 kat düşük ve 12. haftada 2.65 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

-5.alanda 4.haftada 1.83 kat düşük ve 12. haftada 2.25 kat düşük saptanmıştır ve anlamsızdır.

- UV uygulanan 2. grupta 0. haftadaki bazale göre IL-6 ekspresyonu:

-1.alanda 4.haftada 1.2 kat düşük saptanmış olup anlamsızdır ve **12. haftada 2.29 kat yüksek** saptanmıştır ve bu değer **anlamlıdır (p<0.05)**.

-2.alanda 4.haftada 1.07 kat yüksek saptanmış ve 12. haftada 1.11 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır.

-3.alanda 4.haftada 2.31 kat düşük saptanmış ve 12. haftada 3.89 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır

-4.alanda 4.haftada 2.21 kat düşük saptanmış ve 12. haftada 1.11 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır

-5.alanda 4.haftada 2.21 kat yüksek saptanmış ve 12. haftada 2.46 kat yüksek saptanmıştır ve bu değerler anlamsızdır

.

- UV uygulanan 2. grubun UV uygulanmayan 1.grupla kıyaslamasında 0. haftadaki bazale göre IL-6 ekspresyonu:

-1.alanda 4.haftada 3.28 kat ve 12.haftada 2.36 kat yüksek saptanmış olup anlamsızdır.

-2.alanda 4. haftada 2.39 kat düşük ve 12.haftada 3.69 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.

-3.alanda 4. haftada 2.87 kat düşük ve 12.haftada 2.08 kat yüksek saptanmıştır ancak anlamsızdır.

-4.alanda **4. haftada 3.01 kat düşük** saptanmış olup **bu değer anlamlıdır (p<0.05)** ve 12.haftada 2.38 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.

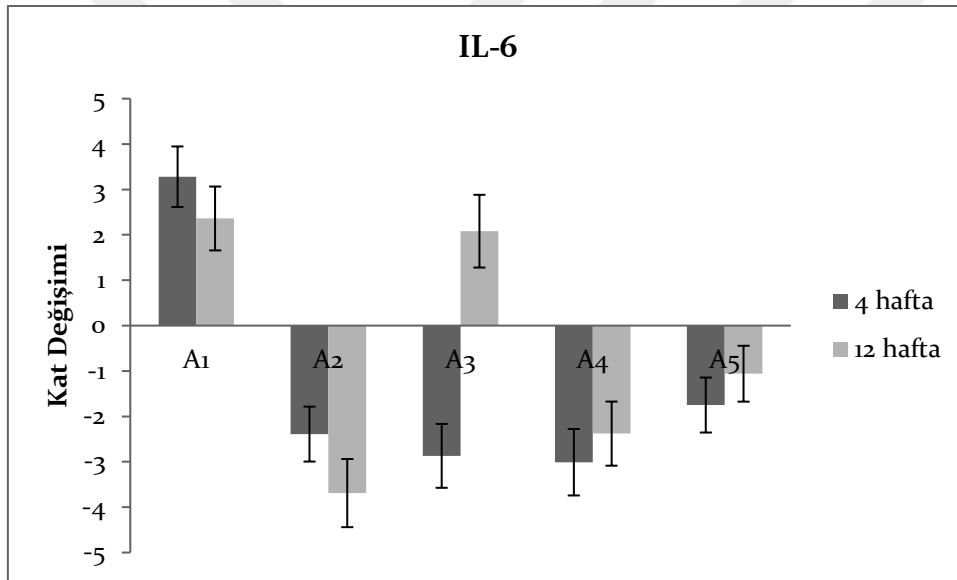
-5.alanda 4. haftada 1.75 kat düşük ve 12.haftada 1.06 kat düşük saptanmıştır ancak anlamsızdır.

	UV (-)		UV (+)	
Alanlar	4.hafta	12.hafta	4.hafta	12.hafta
A1 (kontrol)	-1.48	-1.89	-1.2	2.29*
A2 (ip)	-1.71	-1.49	1.07	1.11
A3 (dolgu)	-2.98	-1.86	-2.31	3.89
A4 (ip+dolgu)	-3.53	-2.65	-2.21	1.11
A5 (ip+dolgu+BTX)	-1.83	-2.25	2.21	2.46

Tablo-11: PCR analizinde 0.haftaya göre IL-6 ekspresyon sonuçları (kat değişimi)

* $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.

** $p < 0.01$ olan değerler anlamlı olarak işaretlenmiştir.



Şekil-8: Haftalara ve alanlara göre IL-6 ekspresyonunda UV etkisi (grafik)

5. TARTIŞMA

Elastozis, fotohasara sekonder oluşan amorf elastotik materyalin papiller ve orta dermiste depolanması ile meydana gelir (83). UV maruziyetinin Sprague-Dawley ratlar üzerindeki etkilerinin incelendiği Japonya'dan bir çalışmada (84), suberitem dozda olmak üzere haftada 3 kez 12 hafta boyunca sıçanlar kronik UVB maruziyetine bırakılmıştır. Çalışma neticesinde elastik fibrillerin diziliminde düzensizlikler ve tortuozitede artış gözlenmiştir. Ayrıca yüzeysel dermiste irregüler düzenlenen elastik lifler arasında deforme olan elastik lif materyallerinin birikimine karşılık gelen aktinik elastozis de gözlenmiştir. Çalışmamızda da ödem ve solar elastozda UV maruziyetine bağlı artış UV alan grupta almayan gruba kıyasla histopatolojik 32.58 kat fazla saptanmıştır ve bu artış 4.ve 12. haftalarda da başlangıca göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu da kronik UV maruziyetine bağlı solar (aktinik) elastozu desteklemektedir.

Dolgu implantasyonuna sekonder yeni kollajen oluşumu stimülasyonu tam olarak bilinmeyen bir durum değildir (50). Dermal komponentler ve fonksiyonları üzerindeki rejuvenasyonun bir bileşeni olarak ECM onarımı, HA enjekte edilen deri dokusu üzerinde belirgin olarak gösterilmiştir (77, 85, 86). Paliwal S. ve ark. HA'in Sprague-Dawley ratların derisi üzerinde etkilerini intradermal 20µL HYC-24L+ enjeksiyonu yoluyla incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre başlangıç ve enjeksiyondan sonraki 4-8-12. haftalarda alınan 5 mm. punch deri biyopsisi örneklerinde tip 1 ve tip 3 kollajenin histopatolojik incelemesi ve PCR yoluyla gen ekspresyonu analizlerine bakılmıştır. Tip 1 ve tip 3 kollajende mg/cm² cinsinden 4, 8 ve 12. haftalarda başlangıca göre anlamlı yükselme gözlenmiştir. Kollajen tip 1 ve tip 3'ün birbirine oranında anlamlı değişim gözlememişler ve bunu kollajen homeostazının korunmasına bağlamışlardır. Histopatolojik olarak da matür ve yeni sentezlenen kollajen liflerinin dolgu enjekte edilen alanlarda gözlendiğini belirtmişlerdir (77). İnsanda enjektabl HA'in intradermal ve ECM üzerindeki etkileri ilk olarak 2007 yılında Wang ve ark. tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada, derileri fotoyaşlanmaya uğramış 11 gönüllü insanın kollarında deri altına Restylane® 0.7mL ve normal salin enjekte edilerek sonuçları değerlendirilmiştir. Araştırmacılar histopatolojik incelemede dermiste, intersellüler ve ekstrasellüler alanda kollagen 1'in anlamlı olarak fazla boyandığını gözlemlemişlerdir (87).

Farklı materyallerden ip uygulamasının rat derisinde kullanıldığı bir çalışmada (88), Sprague-Dawley ratların sırt derisi üzerinde ayrı alanlarda 4 farklı PDO ip çeşidi ve poli laktik asid (PLA) ip materyali kullanılmış. 1, 2 ve 12. haftalarda alınan doku örneklerinde

histopatolojik inceleme ve PCR analizi yapılmış, PDO uygulanan ip alanlarında daha fazla olmak üzere tip 1 ve tip3 kollajen düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. Histopatolojik olarak da ip materyali çevresinde yabancı cisim granümatöz reaksiyonu, fibroblast hücreleri, inflamatuvar hücreler ve fibröz kapsül benzeri yapı oluşumu gözlenmiştir (88).

Kore'den yapılan bir çalışmada; PDO, PLA ve polikaptoprolakton (PCL) iplerinin rat derisi üzerindeki histopatolojik değerlendirmesi yapılmıştır. Sprague-Dawley ratların sırt derisine uygulanan malzemelerden sonra 2, 4, 8 ve 12. haftalarda biyopsiler alınarak incelenmiştir. En fazla PDO'da olmak üzere ip materyalini çevreleyen alanlarda, kollajen liflerinde artış saptanmıştır (89).

BTX-A'nın kullanım sonrası histolojik ve immunohistokimyasal analizlerine dair literatürde veriler kısıtlıdır. Yüz bölgesi kırışıklıkları üzerinde etkisinin incelendiği Mısır'dan bir çalışmada, 16 gönüllü üzerinde yüzün üst 1/3'üne tek enjeksiyon şeklinde BTX-A uygulanmış, deri biyopsileri periorbital kırışıklık bölgelerinden (kaz ayağı) enjeksiyon öncesi ve enjeksiyondan 3 ay sonrasında alınarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada tip 1 ve tip 3 kollajen düzeylerinde anlamlı fark saptanmadığı ancak kollajen liflerinin organizasyon ve diziliminin enjeksiyon sonrası örneklerde daha düzenli olduğu belirtilmiştir (4). Permatasari F. ve ark.'nın çalışmasında laboratuvar ortamında in vitro insan fibroblastlarının (HDF), UVB ile indüklenen prematür yaşlanma süreci analiz edilmiş ve BTX-A uygulamasının UVB etkisini antagonize ederek tip1 ve tip3 kollajen üretimini indüklediği RT-PCR ile gösterilmiştir (90).

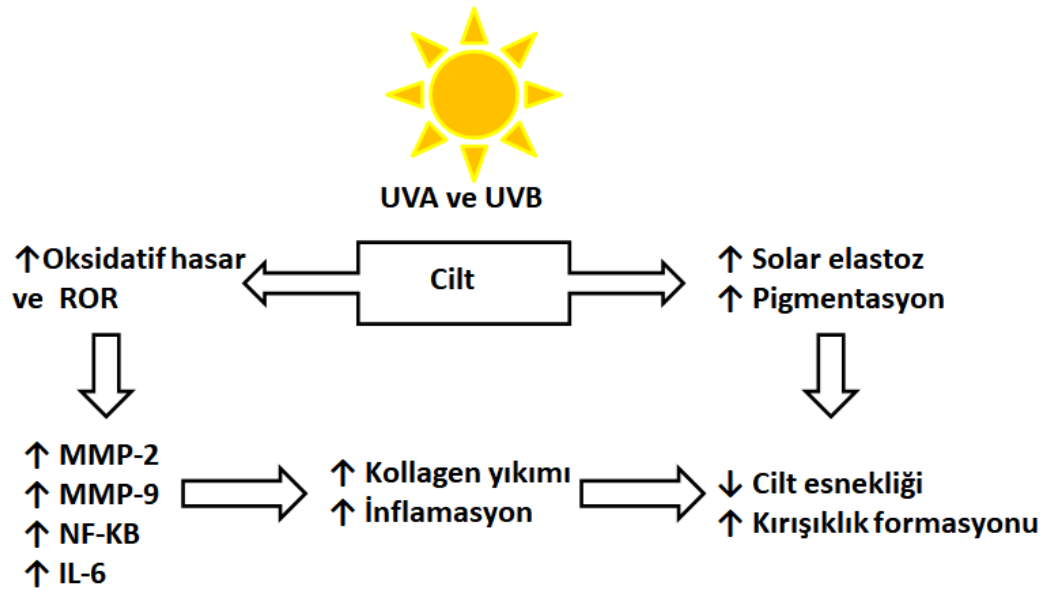
Bizim çalışmamızda, RT-PCR analiz sonuçları yorumlandığında 12 haftalık kronik süreçte UV uygulanmayan grupta 4 nolu alanda (PDO ip + HA dolgu) en fazla ve anlamlı olmak üzere tüm alanlarda 1. alana göre tip 1 kollajen (Col1A1) ekspresyonunda artış bulunmuştur. UV uygulanan grupta da 12 haftalık kronik süreç sonunda 3 nolu alanda en fazla olmak üzere tüm alanlarda 1. alana göre Col1A1 ekspresyonu fazla bulunmuştur (Tablo-4). MMP-2, MMP-9, NF-KB ve IL-6 düzeylerine bakıldığında 4. haftada 4.alanda diğer uygulama alanları ve kontrol alanına kıyasla daha düşük düzeylerde ekspresyon görülmüştür. 12. haftada da MMP-2, MMP-9 ve IL-6'da yine en düşük düzey 4. alanda tespit edilmiştir. PDO ip + HA dolgu kombinasyonunun inflamasyon üzerinden bu moleküllerin ekspresyonunu etkilediği ve 12 haftalık kronik periyod sonunda ekspresyonunun yüksek çıktığı düşünülmüştür. Savoia A. ve ark.'nın çalışmasında 50 gönüllü insan üzerinde içeriğinde HA bulunan maddelerin mezoterapi tekniğiyle yüze enjeksiyonu sonucunda başlangıç ve 12. haftada elde edilen punch biyopsi doku örneklerinde IL-1B, IL-6 ve MMP-1 düzeylerinde azalma ve tip 1 kollajende artış

gözlenmiştir. Yazarlar uygulanan formülasyonun, IL-1B, IL-6 ve MMP-1 düzeylerindeki azaltıcı etkisini inflamatuvar süreçler üzerindeki olası manipülatif etkisine bağlamışlardır. Bunun sonucunda nemlendirmeyi, elastikiyeti, parlaklığı artırarak deride yeniden yapılanmayı sağladığı ve fotoyaşlanmada antiaging etki gösterdiğinin tahmin edildiği ifade edilmiştir (91). 60 kadın gönüllü ile yapılan Toulouse, Fransa'dan bir çalışmada (92) katılımcıların kollarına 0.5cc HA jel ve kontrol olarak da izotonik sodyum klorid enjekte edilmiş ve başlangıç, 1, 3 ve 6. aylarda deri biyopsisi alınmıştır. ELISA ve qPCR ile gen ekspresyonları çalışılmıştır. 1. ayda prokollagenin en yüksek tespit edildiği çalışmada, MMP-9 düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmamıştır. MMP-3 düzeyinin 3.ayda anlamlı farklılık gösterdiği belirtilmiş ancak sonuçlar prezente edilmemiştir UV etkisi ile indüklenen MMP'ler (özellikle MMP-9) kollagenin, kollajenazlar tarafından ilk ayrıştırılması sonrasında; gelatin ve küçük peptitlere nihai ayrışmasında önemli rol oynamaktadır (93). MMP-9 düzeyinin 3.alanda UV uygulanan grupta 4. haftada en düşük düzeyde olması; kronik süreç sonunda, 3. alanda en yüksek düzeyde kollagen ekspresyonunu (UV etkisiyle bazale göre yine düşük) desteklediği görülmektedir. Her iki grupta da 4. haftada ve 12.haftada Col1A1 ekspresyonu 0.hafta bazale göre düşüş göstermiştir. Bunu biz dokuda oluşturulan travma etkisine sekonder gelişen inflamasyona bağlı bir düşüş olarak görmekteyiz. Uygulanan maddelerin, bu düşüşü kronik süreçte kısmen engellediği ve kontrol alanına kıyasla antiaging etki gösterdikleri gözlenmektedir. UV uygulanan grupta, UV uygulanmayan gruba kıyasla ekspresyon düzeyleri 12.haftada ve 3 numaralı dolgu alanı hariç negatif çıkmıştır. Bu da UV'nin tip 1 kollagen üzerindeki olumsuz etkisini kanıtlar niteliktedir (Tablo-5). Tip 3 kollagen (Col3A1) ekspresyonu düzeylerine bakıldığında Col1A1 ekspresyonu ile korele olarak 12 haftalık kronik süreç sonunda UV uygulanmayan grupta 4. alanda ve UV uygulanan grupta 3. alanda ekspresyonun diğer gruplara kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir. Tüm uygulama alanlarında 1.kontrol alanına kıyasla UV alan ve almayan grupta tip 3 kollajen ekspresyonu yüksektir. Col1A1 ekspresyonuna paralel olarak Col3A1 ekspresyonu sonuçlarında da UV alan grubun, UV almayan gruba kıyasla 3. alan hariç tüm uygulama alanlarında ve kontrol alanında (A1) rölâtif olarak negatif kaldığı gözlenmiştir (Tablo-7). Bu da yine UV'nin tip 3 kollajen üzerindeki olumsuz etkisini göstermektedir. Bu etki kronik maruziyette de azalarak devam etmiştir. Histopatolojik olarak cm^2 'deki fibroblast hücre sayıları ve dolayısıyla kalitatif kollajen düzeylerinin ve organizasyonunun kıyaslamalı değerlendirilmesinde UV uygulanmayan grupta 5. alanda ve UV uygulanan grupta ise 4. alanda daha fazla düzey ve organizasyon istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür. Tüm

uygulama alanlarında 1. alana göre 4 ve 12. haftada kalitatif kollagen düzey ve organizasyonu yüksek bulunmuştur. Bu durum göstermektedir ki uyguladığımız dolgu, ip ve BTX-A malzemeleri dokuda oluşan neokollajenez üzerinde etkin bir rol oynamaktadır. UV uygulanan grupta, UV uygulanmayan gruba kıyasla kollagenin kalitatif düzeyi ve organizasyonu 4 ve 12. haftalarda düşük gözlenmiştir (Tablo-3)

Fotoyaşlanmış deride kollajen liflerinin sayısında azalma ve diziliminde düzensizlikler görülür. Bu durum sentezde azalma ve yıkım artışının bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır (94, 95). Sonuçta deride gerginlik kaybı ve kırıxıklık formasyonu oluşumu gözlenir (şekil-9) (96). Kollajen düzeylerinin PCR analizinde görülmektedir ki UV uygulaması tip 1 kollajeni degrade edici etki göstermiş ve yıkıma uğrayan tip 1 kollajen lifleri nedeniyle ekspresyon, UV almayan gruba göre daha düşük çıkmıştır. Ancak UV alan grubun kendi içinde alanları kıyaslandığında akut dönemde (4. hafta) ip+dolgu uygulanan 4. alanda bu düşüş daha az yaşanmış, ip+dolgu+BTX uygulanan 5. alanda ise kronik dönemde (12.hafta) bu düşüş daha az yaşanmıştır. Bu durum Col3A1 ekspresyon sonuçlarında da gözlenmektedir. Böylece, BTX-A'nın kronik süreçte etkinliğinin ortaya çıktığı düşünülmüş ve kollajen düşüşünü azalttığı sonucuna varılmıştır. Çin'den Hao R. ve ark.'larının kültüre edilen hipertrofik skar dokusundan izole edilen insan keloid fibroblastları üzerinde BTX-A uyguladıkları çalışmasında, MMP-1 ve MMP-2 RNA ve protein düzeylerinin yüksek eksprese olduğunu, TGF-B1 ve MMP-9 düzeylerinin düşük eksprese olduğunu gözlemledikleri belirtilmiştir (97). Yine Çin'den bir başka çalışmada, insan dermal fibroblastları üzerinde BTX-A'nın toksik etkisi denenmiştir ve BTX-A'nın insan dermal fibroblastları üzerinde toksik etkisi ya da prolifer edici etkisi saptanmamış; bazı MMP'leri düşürerek tip 1 kollajeni artırdığı gözlemlenmiştir. MMP-2 üzerinde anlamlı değişim bulunmazken, pro ve aktif formdaki MMP-9'da BTX-A enjeksiyonu ile azalma gözlemlenmiştir. Bu sayede skar dokusunun prolifer olmasını inhibe ederek iyileşmesine katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri UV uygulanan ve uygulanmayan grupta BTX-A'nın PDO ip ve HA dolgu ile kombine uygulandığı 5.alanda kontrol 1.alana göre düşük çıkmıştır. 5.alanda, 4.alana kıyasla 4 ve 12. haftada rölatif olarak MMP-2 ve MMP-9 düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Bu da bize BTX-A'nın bu moleküllerin ekspresyonunu kısmen artırdığını ancak kronik dönemde 5.alanda oluşan neokollajenez üzerinde BTX-A ile -çalışmamızda ölçemediğimiz- başka moleküler mekanizmaların etkileşimlerinin de etkili olabileceğini göstermiştir. Aynı zamanda uygulanan PDO ip ve HA dolgu malzemelerinin MMP'leri düşürücü etkisi de gözlemlenmiştir.

MMP2, MMP9, NF-KB ve IL-6 ekspresyon düzeylerine bakıldığında UV etkinliğine bağlı anlamlı farklılıklar saptanmıştır. NF-KB düzeylerinde UV uygulanan grupta, UV almayan gruba kıyasla her alanda, 4 ve 12. haftalarda ekspresyon düzeyinin yüksek çıkması UV'nin etkinliğini desteklemektedir. Ancak bu etkinin fotoyaşlanmanın alt basamaklarındaki MMP2, MMP9 ve IL-6 düzeylerine yansımaması uygulanan maddelerin inflamasyon üzerinde ve dolaylı olarak fotoyaşlanma üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir.



Şekil-9: Fotoyaşlanma modeli

İnflamasyon düzeylerinin kıyaslamalı incelemesinde inflamasyon düzeyi en fazla dolgu uygulanan 2 nolu alanda olmak üzere, tüm alanlarda 1 nolu kontrol alanına kıyasla artış göstermiştir. Bu artış 4. hafta biyopsilerinde 107 kata çıkmış, 12. hafta biyopsilerinde ise 92 kat yüksek tespit edilmiştir. Bu da kronik süreçte inflamasyon dokusunun azaldığının kanıtıdır. İnflamasyona paralel olarak nötrofil düzeylerinde de tüm uygulama alanlarında kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. Eozinofil ve mast düzeyi düzeyi de tüm alanlarda artmış ancak 2.alanda daha fazla artış göstermiştir. Bu da ip uygulamanın deri üzerindeki alerjik etkisini ortaya koymaktadır. Histiosit düzeylerindeki 12. ve 4. haftada görülen anlamlı artışlar inflamasyonun devam ettiği sürece eşlik etmektedir.

Vaskülarizasyona bakıldığında inflamasyonla paralel bir biçimde yine en fazla dolgu uygulanan 2 nolu alanda olmak üzere tüm alanlarda 1 nolu kontrol alanına kıyasla artış gözlenmiştir. Bu artış, bazale göre; 4. haftada 65 katına çıkarken 12. haftada 57.4 kat

yüksek saptanmıştır. Bu durum, kronik süreçte inflamasyona paralel olarak doku vaskülaritesinde artışın kısmi azalması şeklinde yorumlanabilir.

Kapsül benzeri yapı oluşumu histopatolojik olarak istatistiksel anlamda ip uygulanan alanlarda (en 5>4>2) anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu da uygulanan ip materyalinin etkinliğini gösteren destekleyici bir bulgudur. Yabancı cisim granulomu, dev hücre formasyonu da çalışmamızda resimlerle gösterilmiştir.

6. LİMİTASYONLAR

Histopatolojik olarak Herovici collagen stain boyama ile neokollagenezin, elastin liflerinin dizilimi ve Elastika von gieson boyası ile kalitatif düzeyinin değerlendirilmesi, Weigert Rezorsin Fuchsin boyası ile neoelastogenezin saptanması, elastin gen ekspresyonunun PCR ile kantitatif ölçümü teknik sebeplerle sonuçlandırılmamıştır.

7. SONUÇ

Fizyolojik yaşılanma ve fotoyaşılanma modellerinde tek başına ve kombine PDO ip, HA dolgu ve BTX-A uygulamalarının sıçan derisi ve bağ dokusu üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmayla aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir:

1. Uygulamış olduğumuz fotoyaşılanma modeli çalışmış ve UV uygulanan grupta UV uygulanmayan gruba kıyasla; fotoyaşılanmayı gösteren solar elastozda ve NF-KB ekspresyonunda artış, tip 1 ve tip 3 kollajen düzeylerinde ise azalış anlamlı olarak gösterilmiştir.
2. UV uygulamaya sekonder 1.kontrol alanında NF-KB, MMP2, MMP9, IL6 gen ekspresyon düzeyleri zamanla (4 ve 12. haftada) artış göstermiştir. Bu da fotoyaşılanmayı destekler niteliktedir. Bu moleküllerin uygulama alanlarında farklı ekspresyon göstermeleri, uygulanan maddelerin ekspresyon üzerinde muhtemel etkili olarak sonucu değiştirdiklerini ortaya koymuştur.
3. UV uygulanan grupta (fotoyaşılanma) tek başına dolgu uygulamasının, UV almayan grupta (fizyolojik yaşılanma) ip+dolgu kombine uygulamasının kronik dönemde (12.hafta) antiaging olarak daha efektif sonuçlar getirdiği gözlenmiştir.
4. Uygulanan her 3 maddenin de dokuda histopatolojik düzeyde fibroblast oluşumunu artırdığı, neokollagenezi uyardığı ve kollajen liflerinin organize diziliminde rol aldığı histopatolojik olarak gösterilmiştir. Bu da antiaging etkide her 3 ajanında etkisinin olduğunu desteklemektedir.
5. İp+dolgu uygulamanın, ip+dolgu+BTX-A uygulamayla kıyaslandığında fotoyaşılanma üzerinde akut dönemde antiaging etkisinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak kronik dönemde BTX-A'nın antiaging etkisi daha baskın çıkmış ve bu durum tip1 ve tip 3 kollajen ekspresyonlarına yansımıştır. Bu durumun BTX-A'nın tespit edemediğimiz moleküler mekanizmalar üzerinden etkileşimle dokuda neokollagenezi uyarıcı etkisi sonucu olduğu düşünülmüştür.

8.KAYNAKLAR

1. Mehta RC, Fitzpatrick RE. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatol Ther.* 2007;20(5):350-9.
2. Buck DW, 2nd, Alam M, Kim JY. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009;62(1):11-8.
3. França Wanick FB, Almeida Issa MC, Luiz RR, Soares Filho PJ, Olej B. Skin Remodeling Using Hyaluronic Acid Filler Injections in Photo-Aged Faces. *Dermatol Surg.* 2016;42(3):352-9.
4. El-Domyati M, Attia SK, El-Sawy AE, Moftah NH, Nasif GA, Medhat W, et al. The use of Botulinum toxin-A injection for facial wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. *Journal of cosmetic dermatology.* 2015;14(2):140-4.
5. Grove GL. Physiologic changes in older skin. *Dermatologic clinics.* 1986;4(3):425-32.
6. Krieg T, Hein R, Hatamochi A, Aumailley M. Molecular and clinical aspects of connective tissue. *European journal of clinical investigation.* 1988;18(2):105-23.
7. Kosmadaki M, Gilchrest B. The role of telomeres in skin aging/photoaging. *Micron.* 2004;35(3):155-9.
8. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: an overview. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1989;21(3):610-3.
9. Paliwal S, Fagien S, Sun X, Holt T, Kim T, Hee CK, et al. Skin extracellular matrix stimulation following injection of a hyaluronic acid-based dermal filler in a rat model. *Plastic and reconstructive surgery.* 2014;134(6):1224-33.
10. Mazzola RF, Mazzola IC. History of Facial Rejuvenation. *International Textbook of Aesthetic Surgery: Springer;* 2016. p. 841-53.
11. Fitzgerald R, Carqueville J, Yang PT. An approach to structural facial rejuvenation with fillers in women. *Int J Womens Dermatol.* 2019;5(1):52-67.
12. Klein AW, Elson ML. The history of substances for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg.* 2000;26(12):1096-105.
13. França K, Kumar A, Fioranelli M, Lotti T, Tirant M, Roccia MG. The history of Botulinum toxin: from poison to beauty. *Wien Med Wochenschr.* 2017;167(Suppl 1):46-8.
14. Garvey PB, Ricciardelli EJ, Gampper T. Outcomes in threadlift for facial rejuvenation. *Ann Plast Surg.* 2009;62(5):482-5.
15. Dursun R. İplerle Yüzde Lifting: İp Çeşitleri, Kombinasyonları ve Komplikasyonları. *Türkiye Klinikleri J Cosm Dermatol-Special Topics.* 2017;10(3):191-200.
16. Surowiak P, Gansukh T, Donizy P, Halon A, Rybak Z. Increase in cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in keratinocytes and dermal fibroblasts in photoaged skin. *J Cosmet Dermatol.* 2014;13(3):195-201.
17. Sarbacher CA, Halper JT. Connective Tissue and Age-Related Diseases. *Subcell Biochem.* 2019;91:281-310.
18. Labat-Robert J. Age-dependent remodeling of connective tissue: role of fibronectin and laminin. *Pathol Biol (Paris).* 2003;51(10):563-8.
19. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal.* 2018;12(1):35-43.
20. Ricard-Blum S, Baffet G, Thérét N. Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis. *Matrix Biol.* 2018;68-69:122-49.
21. Halper J. Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective. *Vet Pathol.* 2010;47(1):77-97.
22. Schwarze U, Schievink WI, Petty E, Jaff MR, Babovic-Vuksanovic D, Cherry KJ, et al. Haploinsufficiency for one COL3A1 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of Ehlers-Danlos syndrome, Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet.* 2001;69(5):989-1001.

23. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol*. 2018;17(1):20-6.
24. Halper J. Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2014;802:49-58.
25. Carrino DA, Calabro A, Darr AB, Dours-Zimmermann MT, Sandy JD, Zimmermann DR, et al. Age-related differences in human skin proteoglycans. *Glycobiology*. 2011;21(2):257-68.
26. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*. 2014;802:31-47.
27. Amano S. Characterization and mechanisms of photoageing-related changes in skin. Damages of basement membrane and dermal structures. *Exp Dermatol*. 2016;25 Suppl 3:14-9.
28. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SE, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1861-8.
29. Carrino DA, Sorrell JM, Caplan AI. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys*. 2000;373(1):91-101.
30. Carrino DA, Onnerfjord P, Sandy JD, Cs-Szabo G, Scott PG, Sorrell JM, et al. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. *J Biol Chem*. 2003;278(19):17566-72.
31. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*. 1997;136(3):729-43.
32. Anderegg U, Simon JC, Averbek M. More than just a filler - the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Exp Dermatol*. 2014;23(5):295-303.
33. Maytin EV. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology*. 2016;26(6):553-9.
34. Dyer JM, Miller RA. Chronic Skin Fragility of Aging: Current Concepts in the Pathogenesis, Recognition, and Management of Dermatoporosis. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(1):13-8.
35. Kaya G, Saurat JH. Dermatoporosis: a chronic cutaneous insufficiency/fragility syndrome. Clinicopathological features, mechanisms, prevention and potential treatments. *Dermatology*. 2007;215(4):284-94.
36. Lynch B, Bonod-Bidaud C, Ducourthial G, Affagard JS, Bancelin S, Psilodimitrakopoulos S, et al. How aging impacts skin biomechanics: a multiscale study in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):13750.
37. Han A, Chien AL, Kang S. Photoaging. *Dermatol Clin*. 2014;32(3):291-9, vii.
38. Baron ED, Suggs AK. Introduction to photobiology. *Dermatol Clin*. 2014;32(3):255-66, vii.
39. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(1):1-19.
40. Yin H, Niki E, Uchida K. Special issue on "Recent progress in lipid peroxidation based on novel approaches". *Free radical research*. 2015;49(7):813-5.
41. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annual review of cell and developmental biology. 2001;17(1):463-516.
42. Senftleben U, Karin M. The Ikk/nf-kb pathway. *Critical care medicine*. 2002;30(1):S18-S26.
43. McCullough JL, Kelly KM. Prevention and treatment of skin aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1067:323-31.
44. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002;138(11):1462-70.
45. Oğuz O. Işık ve deri. In: Tüzün Y, Güler MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL, editors. *Dermatoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. p. 1743-4.
46. Habib MA, Salem SAM, Hakim SA, Shalan YAM. Comparative immunohistochemical assessment of cutaneous cyclooxygenase-2 enzyme expression in chronological aging and photoaging. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2014;30(1):43-51.
47. Iannaccone MR, Hughes MCB, Green AC. Effects of sunscreen on skin cancer and photoaging. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2014;30(2-3):55-61.

48. Johl SS, Burgett RA. Dermal filler agents: a practical review. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17(5):471-9.
49. Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 2000;114(6):1184-7.
50. Landau M, Fagien S. Science of Hyaluronic Acid Beyond Filling: Fibroblasts and Their Response to the Extracellular Matrix. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136(5 Suppl):188s-95s.
51. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol*. 2008;144(5):666-72.
52. Agache P, Humbert P. *Measuring the skin*: Springer Science & Business Media; 2004.
53. Yoneda M, Yamagata M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J Cell Sci*. 1988;90 (Pt 2):265-73.
54. Aoki KR, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur J Neurol*. 2001;8 Suppl 5:21-9.
55. Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(2 Pt 1):249-59.
56. Grumelli C, Verderio C, Pozzi D, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M. Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons. *Neurotoxicology*. 2005;26(5):761-7.
57. Dressler D, Adib Saberi F. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Eur Neurol*. 2005;53(1):3-9.
58. Carruthers A, Carruthers J. Botulinum toxin. *Bologna Dermatology's*. 2nd ed. Spain 2008. p. 2381-9.
59. El-Domyati M, Attia SK, El-Sawy AE, Moftah NH, Nasif GA, Medhat W, et al. The use of Botulinum toxin-a injection for facial wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. *J Cosmet Dermatol*. 2015;14(2):140-4.
60. Ali YH. Two years' outcome of thread lifting with absorbable barbed PDO threads: Innovative score for objective and subjective assessment. *J Cosmet Laser Ther*. 2018;20(1):41-9.
61. Sarikan G. Poly Lactide Caprolactone. In: Türsen Ü, editor. *Estetik Dermatolojide İple Yüz ve Vücut Germe Teknikleri*. 1st ed. Antalya: Kongre Kitabevi; 2017. p. 67-71.
62. Boland ED, Coleman BD, Barnes CP, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2005;1(1):115-23.
63. Karimi K, Reivitis A. Lifting the Lower Face With an Absorbable Polydioxanone (PDO) Thread. *J Drugs Dermatol*. 2017;16(9):932-4.
64. Jang HJ, Lee WS, Hwang K, Park JH, Kim DJ. Effect of cog threads under rat skin. *Dermatol Surg*. 2005;31(12):1639-43; discussion 44.
65. Shin JJ, Park TJ, Kim BY, Kim CM, Suh DH, Lee SJ, et al. Comparative effects of various absorbable threads in a rat model. *J Cosmet Laser Ther*. 2019;21(3):158-62.
66. MFW F, P O, RG D, MC B, M B. *The Desing of Animal Experiments*. . London: The Royal Society of Medicine Pres Limited; 2018. p. 17-28.
67. Ostrovskii AA, Shatrova VO. [Development of interfollicular epidermis on the surface of collagen framework of the dermis in experimental animals]. *Biull Eksp Biol Med*. 1992;113(5):542-5.
68. Tanga MB, Buttros KR, Nakao C, Komesu MC. Progressive effects of diabetes mellitus on the skin epithelium of the rat. *International Journal of Morphology*. 2003;21(2):143-8.
69. Morris GM, Hamlet R, Hopewell JW. The cell kinetics of the epidermis and follicular epithelium of the rat: variations with age and body site. *Cell Tissue Kinet*. 1989;22(3):213-22.
70. Vörös E, Robert AM. [Histomorphometric changes of the skin in rats in relation to age]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1993;187(2):201-9.
71. Li Y, Hsieh S-T, Chien H-F, Zhang X, McArthur JC, Griffin JW. Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Experimental neurology*. 1997;147(2):452-62.

72. Gül M, Eşrefoğlu M, Seyhan M. Wistar Albino Sıçan Derisinin Histomorfometrik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Dermatol.* 2005;15:136-40.
73. Greenwood JE. Function of the panniculus carnosus-a hypothesis. *The Veterinary Record.* 2010;167(19):760.
74. MM P. The skin. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery.* Hoboken: Wiley-Blackwell. p. 8-9.
75. Jung S-J, Lee H, Choi I-J, Lee J-H. Muscular axillary arch accompanying variation of the musculocutaneous nerve: axillary arch. *Anatomy & cell biology.* 2016;49(2):160-2.
76. Jang HJ, Lee WS, Hwang K, Park JH, Kim DJ. Effect of cog threads under rat skin. *Dermatologic Surgery.* 2005;31(12):1639-44.
77. Paliwal S, Fagien S, Sun X, Holt T, Kim T, Hee CK, et al. Skin extracellular matrix stimulation following injection of a hyaluronic acid-based dermal filler in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(6):1224-33.
78. Tsukahara K, Moriwaki S, Ohuchi A, Fujimura T, Takema Y. Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. *Photochem Photobiol.* 2001;73(5):525-31.
79. Tsukahara K, Moriwaki S, Fujimura T, Takema Y. Inhibitory effect of an extract of *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet-B-induced photodamage of rat skin. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(9):998-1003.
80. Harwansh RK, Mukherjee PK, Kar A, Bahadur S, Al-Dhabi NA, Duraipandiyan V. Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress. *J Photochem Photobiol B.* 2016;160:318-29.
81. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary pathology.* 2013;50(6):1007-15.
82. Klopffleisch R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology-a systematic review. *BMC veterinary research.* 2013;9(1):123.
83. Hwang K-A, Yi B-R, Choi K-C. Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations. *Laboratory animal research.* 2011;27(1):1-8.
84. Imayama S, Nakamura K, Takeuchi M, Hori Y, Takema Y, Sakaino Y, et al. Ultraviolet-B irradiation deforms the configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats. *Journal of dermatological science.* 1994;7(1):32-8.
85. Quan T, Wang F, Shao Y, Rittié L, Xia W, Orringer JS, et al. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology.* 2013;133(3):658-67.
86. Turlier V, Delalleau A, Casas C, Rouquier A, Bianchi P, Alvarez S, et al. Association between collagen production and mechanical stretching in dermal extracellular matrix: in vivo effect of cross-linked hyaluronic acid filler. A randomised, placebo-controlled study. *Journal of dermatological science.* 2013;69(3):187-94.
87. Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, Orringer JS, Fisher GJ, et al. In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Archives of Dermatology.* 2007;143(2):155-63.
88. Shin JJ, Park TJ, Kim BY, Kim CM, Suh DH, Lee SJ, et al. Comparative effects of various absorbable threads in a rat model. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy.* 2019;21(3):158-62.
89. Lee CG, Jung J, Hwang S, Park CO, Hwang S, Jo M, et al. Histological evaluation of bioresorbable threads in rats. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science.* 2018;50(3):217-24.
90. Permatasari F, Hu Y-y, Zhang J-a, Zhou B-r, Luo D. Anti-photoaging potential of Botulinum Toxin Type A in UVB-induced premature senescence of human dermal fibroblasts in vitro through decreasing senescence-related proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2014;133:115-23.
91. Savoia A, Landi S, Baldi A. A new minimally invasive mesotherapy technique for facial rejuvenation. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2013;3(1):83-93.
92. Turlier V, Delalleau A, Casas C, Rouquier A, Bianchi P, Alvarez S, et al. Association between collagen production and mechanical stretching in dermal extracellular matrix: in vivo

effect of cross-linked hyaluronic acid filler. A randomised, placebo-controlled study. *J Dermatol Sci.* 2013;69(3):187-94.

93. Kim YJ, Kim HN, Shin MS, Choi BT. Thread Embedding Acupuncture Inhibits Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Photoaging in Hairless Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:539172.

94. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol.* 2002;11(5):398-405.

95. El-Domyati MM, Attia SK, Saleh FY, Ahmad HM, Uitto J. Effect of topical tretinoin on photoaged facial skin: a histometric, immunohistochemical and ultrastructural study. *J Cosmet Dermatol.* 2004;3(4):191-201.

96. Kim KH, Geronemus RG. Nonablative laser and light therapies for skin rejuvenation. *Arch Facial Plast Surg.* 2004;6(6):398-409.

97. Hao R, Li Z, Chen X, Ye W. Efficacy and possible mechanisms of Botulinum Toxin type A on hypertrophic scarring. *J Cosmet Dermatol.* 2018;17(3):340-6.

