T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAVŞAN KULAĞINDA OLUŞTURULAN MODELLERDE HYALÜRONİK ASİT DOLGUSUNA BAĞLI İSKEMİ TEDAVİSİNDE HYALÜRONİDAZ VE SİLDENAFİL SİTRATIN BİRLİKTE ETKİNLİĞİNİN GÖSTERİLMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

HÜSEYİN EMRE ULUKAYA
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ADNAN MENDERES

İZMİR
ARALIK 2022

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAVŞAN KULAĞINDA OLUŞTURULAN MODELLERDE HYALÜRONİK ASİT DOLGUSUNA BAĞLI İSKEMİ TEDAVİSİNDE HYALÜRONİDAZ VE SİLDENAFİL SİTRATIN BİRLİKTE ETKİNLİĞİNİN GÖSTERİLMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

HÜSEYİN EMRE ULUKAYA
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ADNAN MENDERES

Bu tez DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Talep No:202110, Proje No: 2021.KB.SAG.045) desteklenmiştir.

İZMİR
ARALIK 2022

TEŞEKKÜR

Alanı geniş, büyük ve zorlu bir disiplin olan Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'de etkin bir eğitim alıp gerekli yetkinliğe ulaşmam için hiçbir emeğini esirgemeyen; tüm bilgi ve deneyimlerini paylaşan; etik ilkeler doğrultusunda yapıcı, sistematik ve çözüm odaklı yaklaşımlarını, çalışkanlığını ve iş disiplinini örnek aldığım başta danışmanım Prof. Dr. Adnan Menderes olmak üzere, Prof. Dr. Mustafa Yılmaz'a, Prof. Dr. Haluk Vayvada'ya, Prof. Dr. Cenk Demirdöver'e bir hekim olarak bilgi, beceri ve tecrübeme olan büyük katkılarından dolayı ve insan olarak bana kazandırdıkları değerler için;

Tezimin histopatolojik inceleme basamağında büyük emekleri olan Prof. Dr. Banu Lebe'ye;

Eğitimim süresinde birlikte acı, tatlı bir çok anıyı paylaştığım, özveri ile çalıştığım asistan arkadaşlarıma, uzmanlık mertebesindeki büyüklerime ve tüm hastane çalışanlarına;

Tüm hayatım boyunca bana gösterdikleri fedakarlık ve bitmeyen inançla tüm desteklerini her an hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük payı olan annem Şerife Ulukaya, babam Ali Ulukaya, kardeşlerim Selda Ulukaya ve Muhsin Ulukaya başta olmak üzere aileme;

Her zaman en büyük destekçim, hayat arkadaşım, sevgili eşim Uzm. Dr. Senem Ulukaya'ya;

Teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla.

Hüseyin Emre Ulukaya

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TABLOLAR DİZİNİ i
ŞEKİLLER DİZİNİ ii
RESİMLER DİZİNİ iii
GRAFİKLER DİZİNİ iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİN v
ÖZET vii
SUMMARY xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Deri 3
2.1.1. Derinin Embriyolojisi 3
2.1.2. Derinin Histolojisi ve Fizyolojisi 11
2.1.3. Derinin Vasküler Anatomisi 17
2.2. Yaşlanan Deri 22
2.2.1. İntrensek Cilt Yaşlanmasının Patofizyolojisi 22
2.2.2. Ekstrensek Cilt Yaşlanmasının (Foto Yaşlanmanın) Patofizyolojisi 23
2.2.2.1. Mitokondriyal DNA'nın Mutasyonları 23
2.2.2.2. Telomerlerin Rolü 24
2.2.2.3. Matriks Metalloproteinazlar ve Sinyal İletim Yolları 25
2.2.2.4. Mekanik Gerginlik ve Ekstraselüler Matriks 25
2.2.2.5. Vasküler Değişiklikler 26
2.2.2.6. Protein Oksidasyonu ve Oksidatif Stres 27
2.2.3. Yaşlanmış Deride Klinik ve Histolojik Değişiklikler 28
2.3. Yaşlanan Deride Tedavi 29
2.3.1. Yumuşak Doku Dolguları 29
2.4. Hyalüronik Asit Dolguları 32
2.4.1. Hyalüronik Asit Dolgularının Üretim Süreci 33
2.4.2. Hyalüronik Asit Dolgularının Özellikleri 34
2.4.2.1. Bifazik ve Monofazik Dolgular 35
2.4.2.2. Hyalüronik Asit Konsantrasyonu 35
2.4.2.3. Partikül Boyutu 36

2.4.2.4. Enjeksiyon Kuvveti (Püskürme Kuvveti) 36
2.4.2.6. Reoloji 39
2.5. Hyalüronik Asit Dolgu Uygulama Komplikasyonları ve Tedavileri 40
2.5.1. Ani ve Erken Başlayan Dermal Dolgu Komplikasyonları 41
2.5.1.1. Morarıklık ve Ekimoz 41
2.5.1.2. Şişlik ve Ödem 41
2.5.1.3. Eritem 42
2.5.1.4. Enfeksiyon 42
2.5.1.5. Herpes 43
2.5.1.6. Disestezi, Parestezi ve Anestezi 43
2.5.1.7. Topaklanmalar ve Yumrular 43
2.5.1.8. Vasküler Komplikasyon 44
2.5.1.8.1. Retinal Arter Tıkanıklığı 45
2.5.2. Geç Başlayan Dermal Dolgu Komplikasyonları 48
2.5.2.1. Morarıklık 48
2.5.2.2. Ödem 48
2.5.2.3. Ciltte Renk Değişikliği 49
2.5.2.4. Enfeksiyon 50
2.5.2.5. Nodül Formasyonu 50
2.6. Hyalüronidaz 51
2.7. Sildenafil Sitrat 54
2.7. SPY Elit Floresans Görüntüleme 56
2.7.1. İndosiyanin Yeşili 56
2.7.2. Kızıl Ötesine Yakın (NIR) Floresan Görüntüleme 57
3. GEREÇ VE YÖNTEM 59
3.1. Deney Hayvanları 59
3.2. Deney Hayvanlarının Bakımı 59
3.3. Anestezi Uygulanması 60
3.4. Deney Grupları 60
3.5. Deneyde Kullanılan Malzemeler 64
3.6. Cerrahi Teknik ve Deney Modeli 64
3.6.1. Denek Grubu 1 67
3.6.2. Denek Grubu 2 70
3.6.3. Denek Grubu 3 72
3.6.4. Denek Grubu 4 73

3.7. Cerrahi Sonrası Analjezi 74
3.8. Cerrahi Sonrası Takip ve Verilen Toplanması 74
3.9. Doku Biyopsisi Alınması 76
3.10. Ötenazi 76
3.11. Histopatolojik Değerlendirme 76
3.12. İstatistiksel Değerlendirme 77
4. BULGULAR 78
4.1. Deneklerin Fiziksel Özellikleri 78
4.2. İndosiyanin Yeşili Floresans Görüntüleme Sonuçları 80
4.3. Flep Alanları Karşılaştırması 85
4.4. Histopatolojik İnceleme 87
5. TARTIŞMA 92
6. SONUÇ 100
7. KAYNAKLAR 101

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Fitzpatrick sınıflaması 28
Tablo 2: Cilt yaşlanma karşıtı stratejileri 30
Tablo 3: İdeal Dolgu Maddesinin Özellikleri 31
Tablo 4: Dolgu maddesi çeşitleri 32
Tablo 5: Deney öncesi deneklerin ağırlıkları 79
Tablo 6: Deney sonrası deneklerin ağırlıkları 79
Tablo 7: Deneklerin kulak alanları 80
Tablo 8: Sağ kulaklarda embolizasyon modeli oluşturulduktan sonra İFG değerleri 81
Tablo 9: Sağ kulaklarda embolizasyon modelinde 2. hafta sonundaki İFG değerleri 81
Tablo 10: Sol kulaklarda eksternal kompresyon modeli oluşturulduktan sonra İFG değerleri 83
Tablo 11: Sol kulaklarda eksternal kompresyon modelinde 2. hafta sonundaki İFG değerleri 83
Tablo 12: Eksternal kompresyon modelinde İFG ölçüm farkları 83
Tablo 13: Deney sonrası fleplerin ebatları 85
Tablo 14: Flep Ebat değişimlerinin analizi 86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Üç germ tabakasının oluşumu: ektoderm, mezoderm ve endoderm..... 4
Şekil 2: Epidermisin embriyolojik gelişimi 5
Şekil 3: İnsanda epidermisin gelişim aşamaları 6
Şekil 4: Kıl folikülü gelişimi..... 8
Şekil 5: Yağ bezlerinin gelişimi..... 9
Şekil 6: Ter bezinin gelişimi 10
Şekil 7: Meme gelişimi 11
Şekil 8: Derinin katmanları 12
Şekil 9: Epidermisin bileşenleri 13
Şekil 10: Deri damarlarının mimarisinin şematik görünümü..... 17
Şekil 11: Tek bir anjiozom ve tek bir kaynak arterden çıkan perforatör anjiozomların birbirleri ile ilişkisi..... 19
Şekil 12: Direkt ve indirekt kutanöz damarların şematik gösterimi. D: dermis, DC: direkt kutanöz, DF: derin fasya, M: kas, MC: kas-kutanöz, SA: kaynak arter, SC: septokutanöz, SF: yüzeysel dermis 20
Şekil 13: Cilt yaşlanmasındaki patojenik faktörlerin şematik gösterimi 26
Şekil 14: Hyalüronik asitin kimyasal yapısı..... 33
Şekil 15: Hyalüronik asidin BDDE ile çapraz bağlı hale gelmesi 34
Şekil 16: Enjeksiyon kuvveti ölçüm grafisi 37
Şekil 17: BDDE'nin çapraz bağlı ve asılı modifikasyonlarının şematik görünümü.. 38
Şekil 18: Sağ Orbitanın vasküler anatomisi..... 46
Şekil 19: Hyalüronidazın etki mekanizması 53
Şekil 20: Sildenafil etki mekanizması..... 56
Şekil 21: Kliniğimizdeki SPY Elit System görüntüleme cihazı..... 58
Şekil 22: Denek ve deney gruplarının şematik gösterilmesi..... 63

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Deneklerin barınma koşulları 60
Resim 2: Deneyde kullanılan cerrahi aletler 64
Resim 3: Deneklerin kulaklarının traş edilmiş hali 65
Resim 4: Kulak fleplerinin hazırlanması 65
Resim 5: Soldan itibaren; birinci resim araştırmacının mikroskop altında çalışması, ikinci resim sağ kulakta arter ve venin hazırlanması, üçüncü resim sol kulakta arter ve venin hazırlanması 66
Resim 6: Hyalüronik asit dolgusu 67
Resim 7: Sağda hyalüronik asidin damar içine, solda ise damar etrafı fasyanın içine uygulanmış halinin mikroskop görüntüsü 68
Resim 8: Fleplerin sütüre edilmiş hali 68
Resim 9: Boyun bölgesinin hazırlanması ve juguler vene indosiyanin yeşili enjeksiyonu 69
Resim 10: Üstteki resim, ölçümdeki referans noktalar; alttaki resim, indosiyanin yeşili 70
Resim 11: Hyalüronidaz uygulanması ve hyalüronidaz 71
Resim 12: Sildenafil sitratın hazırlanması ve uygulanması 73
Resim 13: Sağda, iki haftanın sonunda tekrar SPY Elite System ve Spy-Q Analysis Toolkit ile yapılan analiz; solda, Image J programı ile yapılan analiz 75
Resim 14: Solda postoperatif 1. hafta görüntüsü, sağda sakrifikasyon sonrası alınan flebin görüntüsü 78
Resim 15: Distal damarlardaki mikroemboliler 91
Resim 16: Eksternal kompresyon modelinde yayılımı artan hyalüronik asit dolgusu 91

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Deneklerin ortalama ağırlık değişimleri 80
Grafik 2: Embolizasyon modeli İFG fark ortalamaları ve %95 güven aralıkları..... 82
Grafik 3: Eksternal kompresyon modeli İFG fark ortalamaları ve %95 güven aralıkları 84
Grafik 4: Modellerde ilaçların etkinlik karşılaştırması 85
Grafik 5: Grupların deney sonu flep ebat ortalamalarının deney öncesine göre karşılaştırması 87
Grafik 6: Gruplardaki inflamasyon derecesinin dağılımı (sağ taraf embolizasyon grupları-sol taraf eksternal kompresyon grupları)..... 88
Grafik 7: Gruplardaki fibroplazi derecesinin dağılımı (sağ taraf embolizasyon grupları-sol taraf eksternal kompresyon grupları)..... 89
Grafik 8: Gruplardaki ödem derecesinin dağılımı (sağ taraf embolizasyon grupları-sol taraf eksternal kompresyon grupları)..... 90

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİN

5-FU	: 5-Florourasil
AP-1	: Aktivatör protein 1
BDDE	: 1,4-bütandiol diglisidil eter
cGMP	: 3'-5'-siklik guanozin mono fosfat
cm	: Santimetre
cm^2	: Santimetre kare
CTGF	: Connective tissue growth factor
DNA	: Deoksirübo nükleik asit
G′	: Elastik modülü, depolama modülü, deformasyona direnç
G″	: Kayıp modülü, viskoz modül
G*	: Kompleks modül
GMP	: Guanozin mono fosfat
gr	: Gram
ICG	: Indocyanine green
Ig	: İmmunglobulin
IPL	: Intense pulsed light
IU	: International unit
İFG	: İndosiyanin yeşili floresans görüntüleme
K^+ kanalı	: Potasyum kanalı
kg	: Kilogram
l	: Litre
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
MMP	: Matrix metalloproteinase
mt	: Mitokondriyal
mtDNA	: Mitokondriyal deoksirübo nükleik asit
N	: Newton

NaOH	: Sodyum hidroksit
NO	: Nitrik oksit
NIR	: Near Infrared
PD5-6	: Fosfodiesteraz tip 5-6
PDL	: Pulsed dye light
pH	: Power of hydrogen
PRP	: Platelet rich plasma
t-loop	: Telomer loop
Tan δ	: Tanjant delta
TGF	: Transforming growth factor
UV/A/B/C	: Ultraviyole A/ Ultraviyole B/ Ultraviyole C

TAVŞAN KULAĞINDA OLUŞTURULAN MODELLERDE HYALÜRONİK ASİT DOLGUSUNA BAĞLI İSKEMİ TEDAVİSİNDE HYALÜRONİDAZ VE SİLDENAFİL SİTRATIN BİRLİKTE ETKİNLİĞİNİN GÖSTERİLMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

Hüseyin Emre Ulukaya
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

ÖZET

Giriş ve Amaç: Plastik Cerrahi alanında hyalüronik asit dolguları sıkça uygulanan bir prosedürdür. Yüz bölgesinde uygulanan bu prosedürlerde öngörülemeyen intravasküler ve perivasküler enjeksiyonlar sonucu vasküler komplikasyonlar gelişebilmektedir. İntravasküler enjeksiyon sonucu, hyalüronik asit anterograd ve retrograd ilerleyip emboli oluşturarak ya da perivasküler enjeksiyon sonucu eksternal kompresyon uygulayarak iskemiye neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise ana kaynak arter iskemisine bağlı uç organ nekrozu (körlük ya da cilt nekrozu) gelişebilmektedir. Literatür incelendiğinde bu tür komplikasyonlar nadir değildir. Retinada gelişebilecek böyle bir iskemide, retinanın iskemiye dayanma süresinin çok kısa olması nedeniyle acil müdahale edilmesi gereken bir komplikasyondur. Yine yüzü besleyen damarlarda gelişebilecek böyle bir iskemide, yüz cildinde ya da burun bölgesi gibi kompozit dokularda nekrozla sonuçlanabilmektedir. Estetik amaçla uygulanan hyalüronik asit enjeksiyonuna bağlı bu tür bir vasküler komplikasyonun gelişmesi oldukça katastrofiktir. Literatürde vasküler komplikasyonla mücadelede uygulanan tedavi yöntemleri daha çok uzman görüşü niteliğinde olmakla birlikte yeterli sayıda deneysel ve klinik çalışma bulunmamaktadır. Hyalüronidazın uygulama şekli ve uygulama dozu, trombolitik ajanlarla kombine edilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen sonucun tamamen tedavi edici olduğu gösterilememiştir. Etkinliği daha da potansiyelize edebilecek vazodilatör ilaçlarla ilgili bir çalışma literatürde saptanmamıştır. Ayrıca yapılan tüm çalışmalar sadece embolizasyon mekanizması ile oluşacak iskemilere yönelik yapılmıştır. Vasküler komplikasyonlara yönelik acil tedavi algoritması

oluşturmaya, tedavi modalitelelerinin etkinliklerini göstermeye, birbiri ile karşılaştırmaya yönelik literatürde klinik ve deneysel çalışma yetersizdir.

Bu çalışmada, tavşan kulağında hyalüronik asit dolgusunun enjeksiyonuna bağlı intravasküler embolizasyon ve eksternal vasküler kompresyon mekanizmasıyla iskemi modeli oluşturulması, tek başına hyalüronidaz, tek başına sildenafil sitrat, hyalüronidaz ve sildenafil sitrat ikili tedavisinin iki farklı iskemi modelinde etkinliğinin incelenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece fizyopatolojik mekanizmaya göre tedavi protokolünün oluşturulmasına yardımcı olunması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda benzer fiziksel özelliklere sahip 28 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tüm gruplar 7'şer denek içerecek şekilde 4 denek grubu oluşturuldu. Tüm kulaklarda santral auriküler arter bazlı standart boyutlarda cilt ve kıkırdağı içeren kompozit flep hazırlandı. 28 denekteki toplam 56 kulaktan 7' şerli olacak şekilde 8 grup elde edildi. Tüm deneklerin sağ kulaklarındaki kompozit fleplerin santral arterleri hyalüronik asit dolgusunun intraarteriyel uygulanmasıyla oluşan embolizasyon ile, sol kulaklarındaki kompozit fleplerin santral arterine perivasküler hyalüronik asit dolgu uygulanmasına bağlı eksternal kompresyon ile iskemi modeli oluşturuldu. Böylece 2 farklı iskemi deney modeli, 1 denekte oluşturulmuş olundu. Denek grubu 1'deki hayvanlara herhangi bir tedavi uygulanmadı. Ardından sağ kulaklarındaki (deney grubu 1E) ve sol kulaklarındaki (deney grubu 1 K) etkiler incelendi. Denek grubu 2'ye hyalüronidaz tedavisi uygulandı. Ardından sağ kulaklarındaki (deney grubu 2E) ve sol kulaklarındaki (deney grubu 2K) etkiler incelendi. Denek grubu 3'e sildenafil sitrat tedavisi uygulandı. Ardından sağ kulaklarındaki (deney grubu 3E) ve sol kulaklarındaki (deney grubu 3K) etkiler incelendi. Denek grubu 4'e hyalüronidaz ve sildenafil sitrat tedavisi uygulandı. Ardından sağ kulaklarındaki (deney grubu 4E) ve sol kulaklarındaki (deney grubu 4K) etkiler incelendi. Deney modeli oluşturulduktan 4 saat sonra ve 14 gün sonra fleplere indosiyanin yeşili floresans görüntüleme yapıldı. Flep kanlanmaları ölçüldü. Ötenazi ile deney sonlandırıldıktan sonra kulaklar ampute edildi ve histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Elde edilen veriler parametrik ve non parametrik skalalarda istatiksel analiz uygulandı.

Bulgular: Çalışmamızda deney modeli oluşturulduğu sırada fleplerin iskemiye bağlı soluk renkli olduğu görüldü. Ancak takiplerde denek grubu 1'de herhangi bir nekroz görülmedi. Bunula birlikte yapılan floresans görüntülemede belirgin kanlanma azalması ve flep boyutlarında da küçülme olduğu görüldü. Deney başındaki fleplerin boyutu ile deney sonrası boyutları ölçüldü ve not edildi. Histopatolojik incelemede inflamasyon, fibroplazi, ödem değerlendirildi ve ölçeklendirildi. Floresans görüntüleme verilerine göre bakıldığında sildenafil sitratın, hyalüronidazın etkisini her iki deney modelinde de potansiyelize ettiği ve iskemiyi azalttığı göstermektedir. Tek başına bakıldığında sildenafil sitrat, intravenöz uygulanan hyalüronidaz kadar iskemiyi azaltmasa da kontrol grubuna göre her iki modelde de kanlanmayı arttırdı. Etki gücü bakımında hyalüronidaz ve sildenafil sitrat emboli modelinde daha etkindi. Kontrol grubunda flep kontraksiyonu daha fazla, tedavi uygulanan gruplarda kontraksiyon daha az görüldü.

Tartışma: Vasküler komplikasyonlar kuşkusuz dolgu enjeksiyonlarının en çok korkulan yan etkileridir. Hyalüronik asit enjeksiyona bağlı gelişen vasküler komplikasyonların neden olduğu hasarı önlemek veya en aza indirmek için çeşitli acil tedavi yöntemleri önerilmişse de çoğu etkinliği ispatlanmamış sadece uzman görüşü niteliğinde olan uygulamalardır. Embolizasyon ile oluşan iskemide hyalüronik asidin etrafında koagülasyon ve agregasyona bağlı trombosit ve fibrinden oluşan tıkaç ve damarda spazm oluşmaktadır. Bu sebeple tek başına hyalüronidaz yetersiz kalmaktadır. Kullanılacak antitrombotik ajan iskemiyi çözmede yardımcı olacaktır. Ancak bu uygulamanın eksternal kompresyon ile oluşan iskemiyi azaltmada benzer etkiyi göstermeyeceğini düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalar sildenafil sitratın deride, orbitada ve retinada kanlanmayı arttırdığı gösterilmiştir. Vazodilatör bir ajan olmasının yanısıra neovaskülerizan bir ajandır. Bu sebeple vazodilatör etkinin yanındaki etkilerinden dolayı sildenafil sitrat çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmamızda her iki iskemi modelinde de hyalüronidazın etkisini, sildenafil sitratın arttıracağı sonucuna varılmıştır.

Sonuç: Hyalüronik asit dolgu uygulamalarına bağlı gelişen emboli ve eksternal kompresyona bağlı vasküler komplikasyonların tedavisinde hyalüronidaz ana tedaviyi oluşturmaktadır. Ama tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü süreç kompleks ve karmaşık yolaklar içermektedir. İskemiyi tedavi etmek için hyalüronidazla birlikte

idame tedavide sildenafil sitrat kullanılabilir. Çalışmamızın verileri, dolgu uygulamasına bağlı gelişen iskemi komplikasyonlarının tedavisinde, bir tedavi algoritması oluşturmaya yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler; *hyalüronidaz, hyalüronik asit dolgu, sildenafil sitrat, vasküler komplikasyon*

DEMONSTRATION AND COMPARISON OF THE COMBINED EFFICACY OF HYALURONIDASE AND SILDENAFIL CITRATE IN THE MANAGEMENT OF ISCHEMIA DUE TO HYALURONIC ACID FILLER INJECTIONS IN RABBIT EAR MODELS

Huseyin Emre Ulukaya
Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery

SUMMARY

Introduction and Objective: Hyaluronic acid fillers are widely applied in plastic surgery. Unintentional intravascular injections in the facial area can cause hyaluronic acid to progress retrogradely and lead to ischemia by occluding the retinal artery and causing embolism, or by applying external compression in perivascular application and thereby giving rise to complications such as end organ necrosis (blindness or skin necrosis) related to ischemia of the source artery. Reports of such complications are not uncommon in the literature. Ischemia of the retinal artery is a complication that requires urgent intervention as the retinal artery is an end-artery and the retina cannot withstand ischemia for more than a short duration. This complication, which develops in the source arteries that feed the facial area, can cause necrosis in the skin or in composite tissues like those in the nasal region. Development of such complication of arterial ischemia as a result of hyaluronic acid injection applied for aesthetic purposes is quite catastrophic. While there are not enough experimental and clinical studies in the literature, the reported treatment methods mostly consist of author recommendations. Despite the studies conducted on the modes of administration and the dosing of hyaluronidase, and how it combines with thrombolytic agents, a completely therapeutic outcome has not yet been concluded. No studies were found in the literature on vasodilator drugs that could further potentiate this efficacy, and all studies were conducted only for ischemia that would occur through embolization mechanism. The number of clinical and experimental

studies in the literature do not suffice for devising an emergency treatment algorithm for vascular complications, for demonstrating the effectiveness of treatment modalities, or for making comparisons.

In this study, we aimed to create an ischemia model through intravascular embolization and external vascular compression due to hyaluronic acid filler injections in rabbit ears and examine and compare the efficacy of hyaluronidase, sildenafil citrate and combined treatment with hyaluronidase and sildenafil citrate in two different ischemia models. We thereby aimed to contribute towards creating a treatment protocol according to the physiopathological mechanism.

Materials and Methods: In our study we used 28 New Zealand rabbits with similar physical characteristics. The rabbits were divided into four groups of seven subjects each. A composite flap containing skin and cartilage in standard sizes based on the central auricular artery was prepared in each of the ears, and the 56 ears from 28 subjects were divided into eight groups of seven ears each. To create ischemia models, the central arteries of composite flaps in the right ears were embolized with intraarterial hyaluronic acid filler injection, and the central arteries of composite flaps in the left ears were embolized via external compression with perivascular hyaluronic acid filler injection. Thereby, two different ischemia study models were created in each subject. The rabbits in Subject Group 1 did not receive any treatment. Then, the effects on their right ears (Study Group 1E[mbolism]) and left ears (Study Group 1C[ompression]) were examined. The findings were noted as the results of the control group. Then Subject Group 2 was treated with hyaluronidase, Subject Group 3 with sildenafil citrate, and Subject Group 4 with hyaluronidase and sildenafil citrate. Then the right (E) and left (C) ears in each Subject Group were examined for the effects of their respective treatments. After four hours of ischemia study models were created and after two weeks of observation, indocyanine green fluorescence imaging was performed on the flaps. Blood supply to flaps were measured. After the experiment was terminated with euthanasia, the ears were amputated and subjected to histopathological examination. The obtained data were analyzed statistically on parametric and non-parametric scales.

Results: As the experimental model was created, the flaps were seen to be pale due to ischemia. However, no necrosis was observed in Subject Group 1 during follow-

up. At the same time, fluorescence imaging showed significant decrease in blood supply and decrease in flap sizes. Dimensions of the flaps were measured and noted at the beginning of the experiment and after the experiment. In histopathological examination, inflammation, fibroplasia, edema were evaluated and scaled. Fluorescence imaging data showed that sildenafil citrate enhanced the effect of hyaluronidase and reduced ischemia in both study models. Although sildenafil citrate alone did not reduce ischemia as much as intravenously administered hyaluronidase, sildenafil citrate increased blood supply in both models compared to the control group. Hyaluronidase and sildenafil citrate were more effective in maintaining potency in the embolism model. Flap contraction was seen to be more in the control group, and less in the treatment groups.

Discussion: Vascular complications are, without doubt, the most feared side effects of filler injections. Whilst various treatment methods have been proposed to prevent or minimize the harm caused by hyaluronic acid-induced vascular complications, most are author recommendations and their efficacy have not been proven. In ischemia caused by embolization, a plug of thrombocytes and fibrin forms as a result of coagulation and aggregation around the hyaluronic acid and spasm occurs in the artery. Hyaluronidase alone is therefore insufficient. The thrombolytic agent will be helpful in resolving the ischemia. However, we believe that this approach would not have a similar effect on reducing the ischemia caused by external compression. Studies demonstrated that sildenafil citrate increased blood circulation in the skin, the orbit, and the retina. Besides being a vasodilator, it is also a neovascularization agent. We used sildenafil citrate in our study because of such effects as well as its vasodilator effect. In our study, we concluded that sildenafil citrate would enhance the efficacy of hyaluronidase in both ischemia models.

Conclusion: Hyaluronidase is the main treatment in the management of embolism caused by hyaluronic acid filler injections and vascular complications caused by external compression. But it is not sufficient by itself because the process involves complex pathways. Sildenafil citrate can be used in combination with hyaluronidase as a maintenance treatment for the management of ischemia. We believe that the data obtained from our study will help to create a treatment algorithm for the management of ischemia complications that occur due to filler injections.

Keywords; *hyaluronidase, hyaluronic acid filler, sildenafil citrate, vascular complication*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmada, tavşan kulağında hyalüronik asit dolgusunun enjeksiyonuna bağlı intravasküler embolizasyon ve eksternal vasküler kompresyon mekanizmasıyla iskemi modeli oluşturulması, tek başına hyalüronidaz, tek başına sildenafil sitrat, hyalüronidaz ve sildenafil sitrat ikili tedavisinin iki farklı iskemi modelinde etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Plastik Cerrahi alanında hyalüronik asit dolguları sıkça uygulanmaktadır. Yüz bölgesinde uygulanan bu prosedürlerde istenmeden gelişen intravasküler enjeksiyonlar sonucu retrograd olarak ilerleyen hyalüronik asit, retinal arteri emboli şeklinde tıkayarak ya da perivasküler uygulamada eksternal kompresyon uygulayarak iskemi oluşturmakta bunun sonucunda ise ana kaynak arter iskemisine bağlı uç organ nekrozu (körlük ya da cilt nekrozu) gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu tür komplikasyonlar literatür incelendiğinde nadir değildir. İntravenöz uygulanan hyalüronidaz tedavisinin etkinliğini gösteren ve perivasküler uygulamalarla karşılaştıran çalışmalar mevcut ise de bu komplikasyonlara yönelik acil tedavi protokolü oluşturmaya, tedavi modalitelelerinin etkinliklerini göstermeye, birbirleriyle karşılaştırmaya yönelik klinik ve deneysel çalışma literatürde bulunmamaktadır. Literatür incelendiğinde bu gibi iskemik komplikasyonlarda uygulanacak tedavi daha çok uzman tavsiyesi şeklindedir. Retinal arterin iskemisi, retinanın iskemiye dayanma süresi kısa olması, uç arter olması nedeniyle acil müdahale edilmesi gereken, müdahale için zamanın çok değerli olduğu bir komplikasyondur. Yine, yüz cildini besleyen kaynak arterlerde de gelişebilecek bu tür bir komplikasyonda ciltte ve burun bölgesinde olduğu gibi kompozit dokularda nekroz gelişebilmekte, önleme ve korumada, erken ve etkin tedavi elzem olmaktadır. Estetik amaçlarla uygulanan hyalüronik asit enjeksiyonuna bağlı bu tür bir arter iskemisi komplikasyonunun gelişmesi oldukça katastrofiktir. Çalışmamızda bu tür bir vasküler komplikasyon ile karşılaşıldığında hyalüronidaz ve sildenafil sitrat ikili tedavisinin, iskeminin oluş mekanizması bakımından emboliye veya eksternal kompresyona bağlı gelişen iskemi mekanizmasına etkisinin gösterilmesi ve tedavi protokolünün oluşturulmasına yardımcı olunması hedeflenmiştir. Yine çalışmamızda hyalüronidaz ve sildenafil sitrat ikili tedavisinin, emboli ya da eksternal kompresyon açısından hangisine daha etkili olduğunun gösterilmesi, böylece hyalüronik asit

enjeksiyona bağlı gelişen vasküler komplikasyonun, fizyopatolojik olarak küratif tedavi edilerek kalıcı hasarın önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Konjenital anomaliler, travma, çeşitli hastalıklar ve tümör cerrahisi sonrası oluşan yumuşak doku defektlerinin tedavisi ve yaşlanmaya bağlı yumuşak doku atrofisinin tedavisi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi açısından özellikli yaklaşım gerektirebilmektedir. Bu gibi durumların tedavisinde yumuşak doku augmentasyonu (hacimlendirilmesi) geniş kabul gören bir tedavi seçeneğidir. Yumuşak doku augmentasyonu ayrıca yüz ve dudak rekonstrüksiyonu, kırışıklık tedavisi gibi estetik cerrahi yaklaşımlarında da kullanılmaktadır.

2.1. Deri

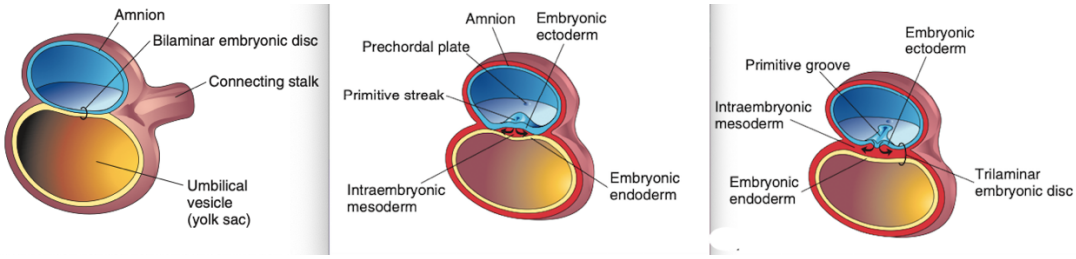
Deri, vücudun en büyük organı olmakla birlikte, başlı başına bir psikonöroendokrinimmün kompleks bir organ sistemidir [1]. Çevre ile sınır oluşturan ve çevre ile etkileşimi sağlayan yapıdır [2]. Derinin yapısı, barındırdığı hücre tipleri, özelleşmiş ekleri ve yüzeyel yerleşimi çok sayıda fonksiyonu yerine getirmesini sağlamaktadır. Derinin birincil işlevi, iç hidrostatik basıncı korumak ve en dış katman olan epidermis ile birlikte vücuttan sıvı kaybını önlemek, vücudu mekanik travma ve mikrobiyal hasardan korumaktır [3]. İnsan derisi tipik olarak en dıştaki epidermis, dermis ve subkutis olmak üzere üç farklı katmana ayrılabilir [4]. Epidermis başlıca keratinositler ile folikül ve ter bezleri gibi yüzeysel yapılardan oluşan yassı çok katlı bir epiteldir. Dermis, epidermisten tırnaklar, kan, lenf damarları ve sinir uçları gibi işlevleri destekleyen bir epidermal baz kompleksi ile ayrılır. Subkutis doğrudan derinin altındaki kas ve kemiklerle kaynaşan yağ dokusundan oluşur.

2.1.1. Derinin Embriyolojisi

Epidermal gelişim; epidermal spesifikasyon, bağlantı, tabakalaşma, terminal farklılaşması ve ek büyüme gibi farklı evrelerden oluşan bir süreçtir. Epidermal gelişimin her adımı, dermis ve mezenşim gelişimi ile yakından bağlantılıdır.

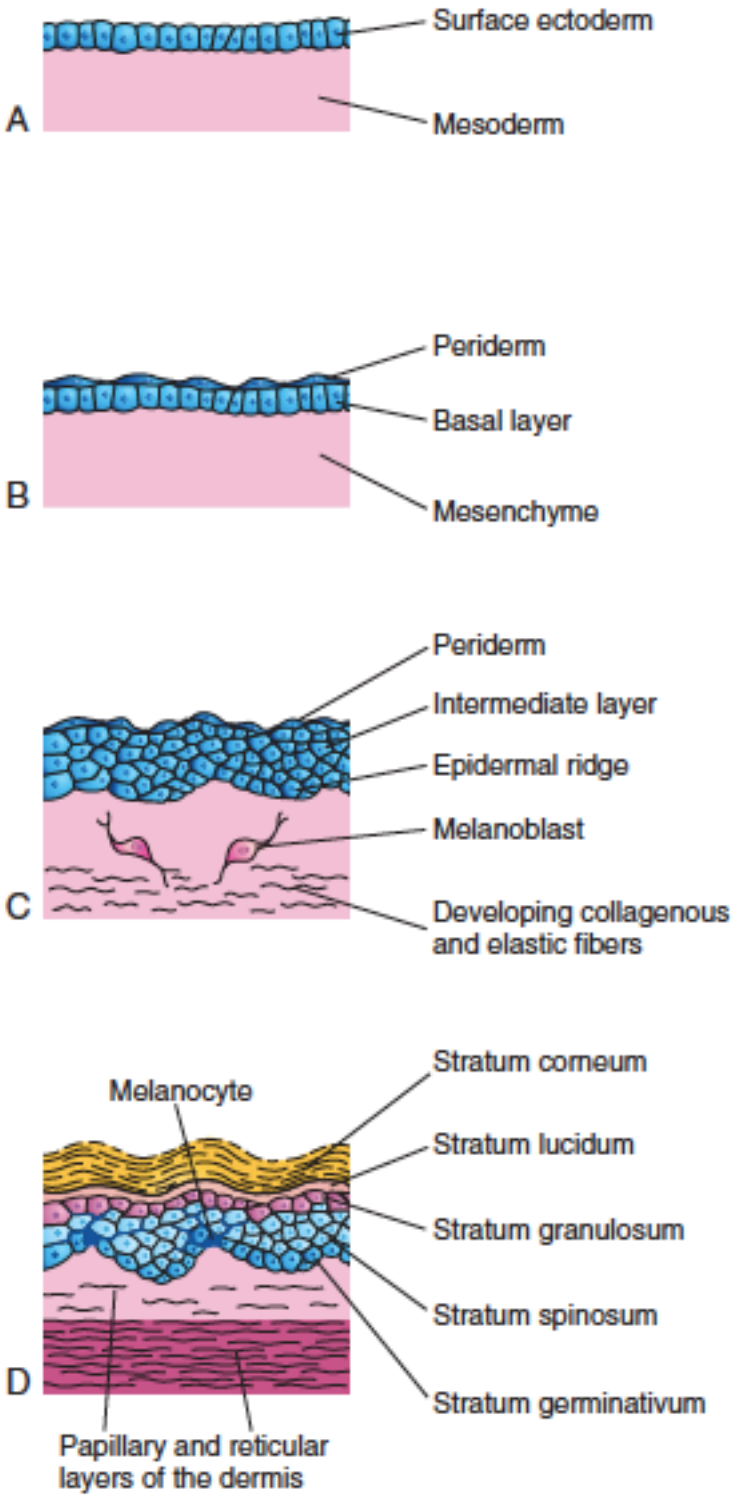
Embriyonik cilt gelişiminin spesifikasyonu, döllenmeden sonra meydana gelen embriyonik gelişimin erken bir aşaması olan gastrulasyon sürecinden hemen sonra başlar. Gastrulasyonda, primitif çizgi boyunca epiblastların invajinasyonu, epiblast hücrelerinin proliferasyonu ve bu hücrelerin aşağı doğru göçü gerçekleşir [4].

Gastrulasyon, üç germ tabakasının oluşumuyla sonuçlanır: ektoderm, mezoderm ve endoderm (Şekil 1).



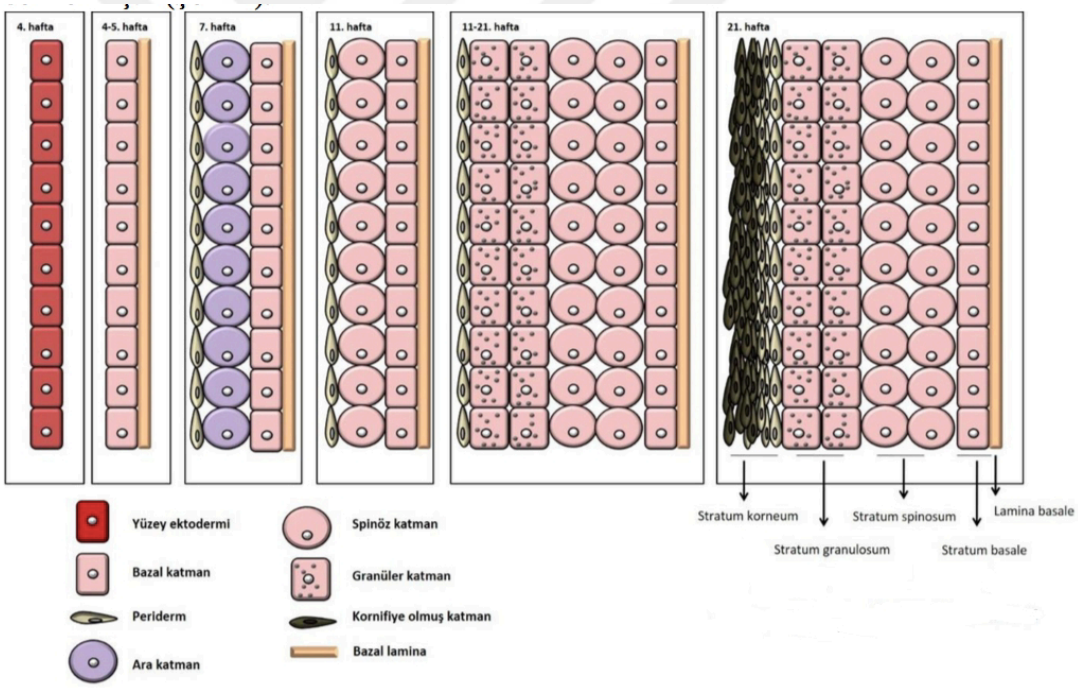
Şekil 1: Üç germ tabakasının oluşumu: ektoderm, mezoderm ve endoderm [5]

Embriyonun dışı, başlangıçta tümüyle tek sıralı ektodermal tabaka ile döşelidir. Bu tabakadan sinir sistemi ve epidermis gelişir [6]. Epidermisin primordiumu, tek bir yüzey ektodermal hücre tabakasıdır. Dördüncü haftanın sonunda tek katlı hücre tabakasının daha yüzeyelinde periderm denilen tek katlı yassı epitelden oluşan ikinci bir hücre tabakası oluşur (Şekil 2). Periderm hücreleri devamlı keratinize ve deskuame olarak, bazal tabakadan gelen hücreler tarafından yenilenir [5]. Dökülen periderm hücreleri ve derideki yağ bezlerinden salgılanan sebum, verniks kazeozayı oluşturur. Periderm tabakası tamamen embriyonik bir yapıdır ve intrauterin gelişim sırasında kaybolur [7].



Şekil 2: Epidermisin embriyolojik gelişimi [5]

Epidermisin bazal tabakası, daha üst tabakalardaki hücrelerin yerine geçecek olan yeni hücreler üreterek stratum germinativuma dönüşür [8]. 11. haftaya kadar stratum germinativumdan gelen hücreler bir ara tabaka oluşturur. On haftalık embriyoda epidermal çıkıntılar, dermal papillalar şekillenmeye başlar. Periderm hücrelerinin döngüsü 21. haftaya kadar devam eder. Bu haftadan sonra periderm ortadan kalkar ve stratum korneum oluşur [5]. Dördüncü ay tamamlandığında erişkin derisini oluşturan tabakaların hepsi fetüste ayırt edilebilecek şekilde gelişmiş olur (Şekil 3). Embriyonik dönemin sonlarında, nöral krest hücreleri gelişmekte olan dermisin mezenşimine göç eder ve melanoblastlara farklılaşır [5]. Bu hücreler dermoepidermal bileşkeye göç eder ve melanositlere farklılaşır (Şekil 2). WNT molekülleri tarafından sinyal verilmesi ile melanoblastların melanositlere farklılaşması, pigment granüllerinin oluşumu gerçekleşir.



Şekil 3: İnsanda epidermisin gelişim aşamaları [1]

Dermis, yüzey ektodermin altındaki mezoderm kökenli mezenşimden meydana gelmektedir. Bağ dokusunun büyük bir kısmı lateral mezodermin somatik yaprağından, bir kısmı ise somitlerden farklılaşan dermotomlardan köken almaktadır. Baş ve boyun bölgesinde ise nöral krestten göç eden hücrelerden kaynaklanır [9].

Primordiyal dermiste görülen bu yoğun hücre grubu üçüncü ayda büyük oranda fibroblastlara dönüşür. Mezenkimal kökenli bu hücreler 11. hafta civarı kollajen (özellikle tip1 ve tip 4) ve elastik bağ dokusu lifleri üretmeye başlar.

Dördüncü ayda ilk olarak palmar ve plantar alanlarda epidermal kalınlaşma bölgeleri dermise uzanmaya başlar. Altıncı ayda bu kalınlaşmalar deri yüzeyinde kabarıklıklar şeklinde görülebilir. Epidermal çıkıntılar, parmaklar (el ve ayak parmakları) dahil olmak üzere avuç içi ve tabanların yüzeyinde oluklar oluşturur. Gelişen bu olukların tipi genetik olarak belirlenir ve adli soruşturmalarda ve tıbbi genetikte parmak izlerinin incelenmesine temel oluşturur [5].

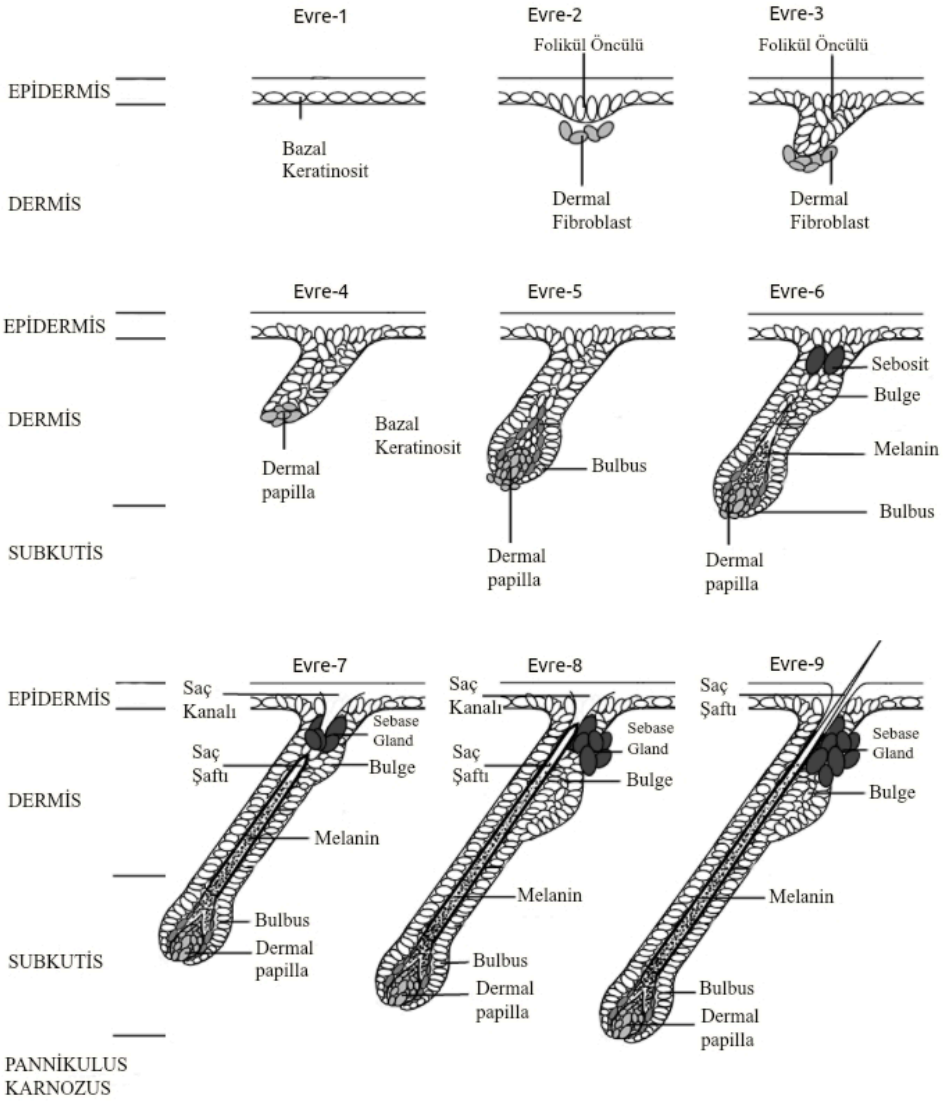
Dermoepidermal bileşkede epidermal uzantıların ve dermal papillaların oluşturduğu dalgalı yapı sayesinde dermis ile epidermis arasındaki bağlantı güçlenir. Dermal papillaların oluşmasıyla birlikte dermis papiller ve retiküler dermis olarak iki katmana ayrılır. Daha gevşek liflerin olduğu yüzeyel katman papiller dermisi oluştururken; derin ve yoğun kollajen liflerin olduğu katman retiküler dermisi oluşturur [9].

Dermisteki kan damarları, mezenşimden (vaskülogenez) farklılaşan basit, endotel kaplı yapılar olarak başlar. Bu basit kapiller kan damarları, 5. haftanın sonunda gözlenmeye başlar. Cilt büyüdükçe, ilkel damarlardan yeni kılcal damarlar gelişir (anjiyogenez). Mezenşimal kökenli miyoblastlar çevrelerini sarması ile arteriyol ve arterler oluşur. Kan akımının geri dönüşü oluştukça ven ve venüller oluşur. İlk trimestırın sonunda fetal dermis damar yapısının önemli bir kısmı tamamlanmış olur [10].

Ayrıca dermis gelişirken taktil reseptörler (Meissner, Paccini, Ruffini korpüskülleri), sinir sonlanmaları, adneksiyal yapılar da görülmeye başlar [9].

Deri gelişimi, deri ekleriyle (kıl, ter bezleri, yağ bezleri, meme, diş, tırnak) ile etkileşim halinde bir bütün olarak ilerler.

Kıllar, fetal dönemde 9-12. haftalarda gelişmeye başlar, ancak yaklaşık 20. haftaya kadar kolayca fark edilmezler. Kıllar ilk olarak kaşlarda, üst dudakta ve çenede gelişir. Kıl folikülleri, epidermisin stratum germinativumunun proliferasyonları olarak başlar ve alttaki dermise uzanır. Saç tomurcukları 14. haftada saç köklerini oluşturur (Şekil 4). Saç kökünün epitel hücreleri, daha sonra saç şaftını üreten germinal matrisi oluşturur [5].

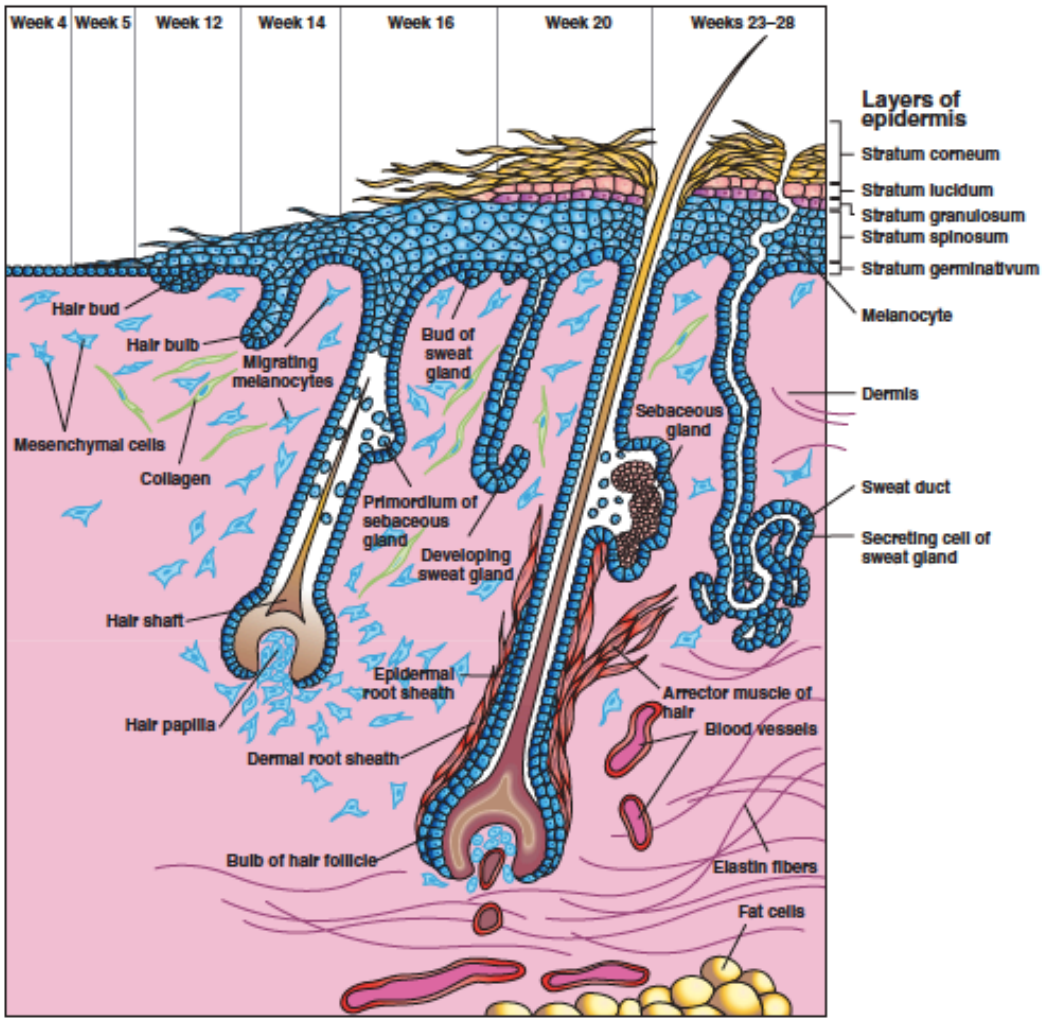


Şekil 4: Kıl folikülü gelişimi [11]

Kıllar 17-20 haftalar arasında miktar olarak sayıları çok artar ve görünür hale gelerek ‘’lanugo tüylerini’’ oluşturur. Doğuma yakın perinatal dönemde dökülmeye başlarlar. Bu kılların yerini yaşamın ilerleyen dönemlerinde daha kaba ve belirgin kıllar alır[5].

Derinin bezleri arasında ekrin ve apokrin ter bezleri, yağ bezleri ve meme bezleri bulunur. Epidermisten başlar ve dermise doğru büyürler [5].

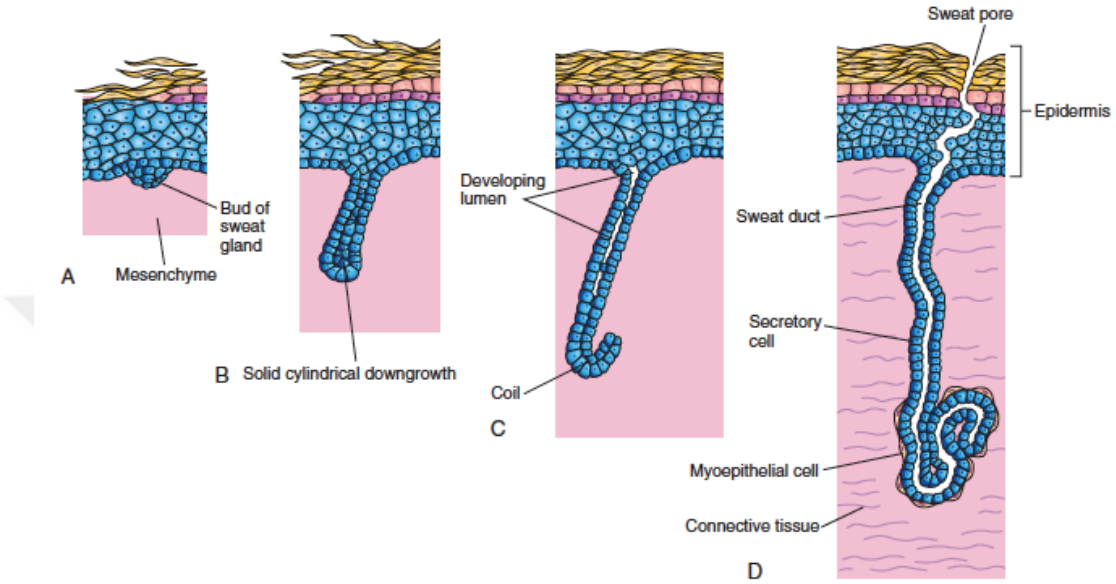
Yağ bezlerinin (Glandulae sebacea) büyük bir kısmı kıl foliküllerinin yan kısımlarında glandüler tomurcuklar halinde proliferasyon ile oluşmaya başlar. Bu yapılar kendilerini çevreleyen embriyonik bağ dokusu içine doğru büyüyerek birkaç alveol ve kanalların öncül yapılarını oluşturmak üzere dallanır (Şekil 5). Alveol yapılarının iç bölümündeki hücreler salgı maddeleri ile dolarak dejenere olur ve sebum adı verilen salgı kıl foliküllerinden deri yüzeyine ulaşır. Bu salgı verniks kazeozanın yapısına katılır [5], [7]. Doğrudan epidermise açılan, glans penis ve labia minoradaki yağ bezleri ise epidermisten dermise doğru proliferasyon gösteren tomurcuk yapıları ile oluşur.



Şekil 5: Yağ bezlerinin gelişimi [5]

Sarmal, tübüler ekrin ter bezleri vücudun çoğu yerinde deride bulunur. Altta yatan mezenşime doğru büyüyen epidermisten hücresel tomurcuklar olarak gelişirler.

Gelişen bezin epidermise tutunan epitel kısmı ise, ter bezi kanalının taslağını oluşturur. Bu primitif kanalların merkezi hücreleri dejenere olarak bir lümen oluşturur. Bezin salgı yapan kısmının perifer hücreleri miyoepitel ve salgı hücrelerine farklılaşır (Şekil 6). Ekrin ter bezleri, doğumdan kısa bir süre sonra fonksiyonel duruma geçerler.

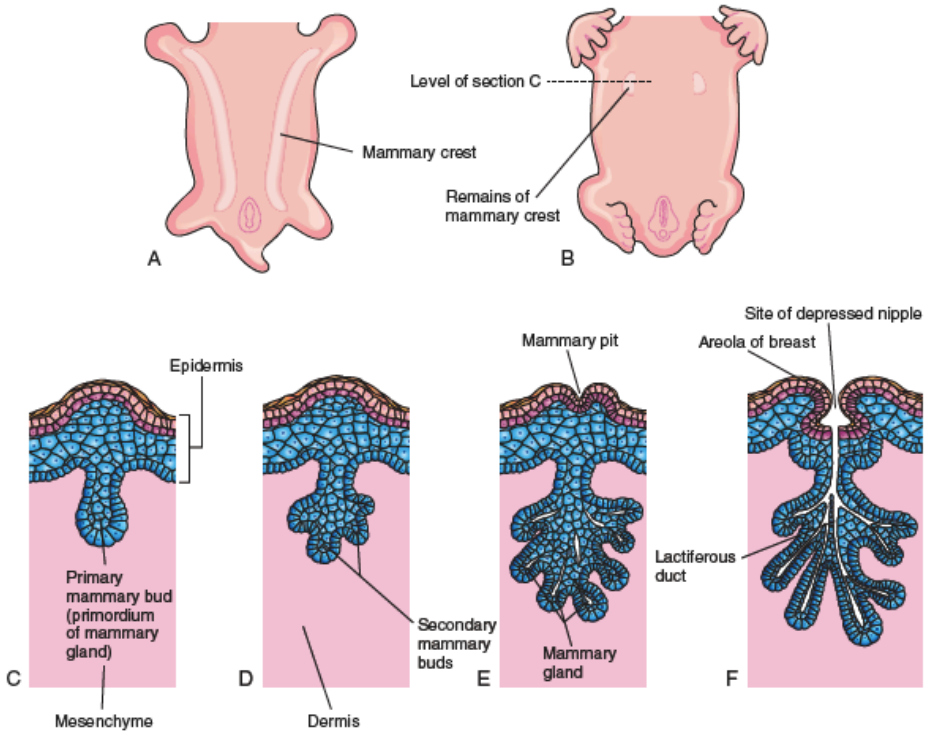


Şekil 6: Ter bezinin gelişimi [5]

Büyük apokrin ter bezlerinin insanlardaki dağılımı, genellikle koltukaltı, pubik ile perineal bölgeler ve memenin areolasıyla sınırlıdır. Bunlar, kıl foliküllerini meydana getiren epidermisin germinatif tabakasının aşağıya doğru büyümesiyle gelişirler. Bu bezlerin kanalları ekrin ter bezlerinde olduğu gibi deri yüzeyine açılmazlar; ancak kıl foliküllerinin üst kısmında bulunan yağ bezleri açılım yerlerinin yüzeyine açılırlar. Bu bezler ancak puberteden sonra salgı yaparlar [5].

Meme glandı, fetal yaşamın yaklaşık olarak 5-6. haftasında, embriyonun ventral tarafında, 'süt hattı' adı verilen, kalınlaşmış ektoderm bantlarından gelişmeye başlar ve bu hat aksilladan inguinal bölgeye kadar uzanmaktadır [12]. Süt hattı boyunca gelişen meme tomurcuklarından sadece pektoral bölgedeki bir çifti, meme glandını geliştirmek için kalırken, 9. haftada diğer kısımlar regresyona uğrar. Bu aşamada, yüzeydeki skuamöz hücreler, epidermis altındaki mezenşimal dokuya doğru büyüme gösterir ve bunun sonucu olarak memenin büyümesini ve gelişimini sağlayacak birincil tomurcuklar oluşur (Şekil 7). Burada, mezenşimal hücrelerin bir

kısmı, nipple ve areola düz kasını oluşturmak üzere farklılaşır [13]. Birincil tomurcuklar, gebeliğin 20-24. haftalarında, laktiferöz kanalları ve dallarını oluşturacak olan 15-20 adet ikincil tomurcuğa dönüşür. Bu özel epitel tomurcukları, üçüncü trimesterde fetal dolaşıma giren plasental seks hormonları tarafından kanalize edilmek üzere uyarılır ve kanalların uçlarında lobülo-alveolar yapılara farklılaşır [14].

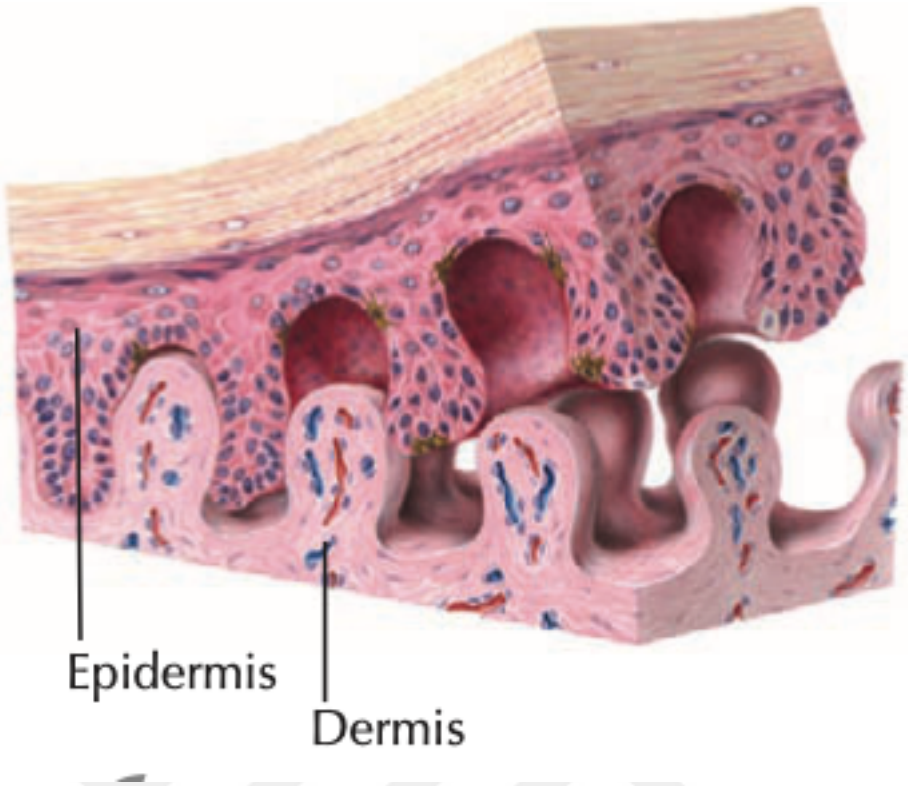


Şekil 7: Meme gelişimi [5]

2.1.2. Derinin Histolojisi ve Fizyolojisi

Örtü sistemi, uyum içinde çalışan birden fazla alt birimden oluşur. Deri ve ek yapıları örtü sistemini oluşturur. Deride üç ana katman vardır [15] (Şekil 8):

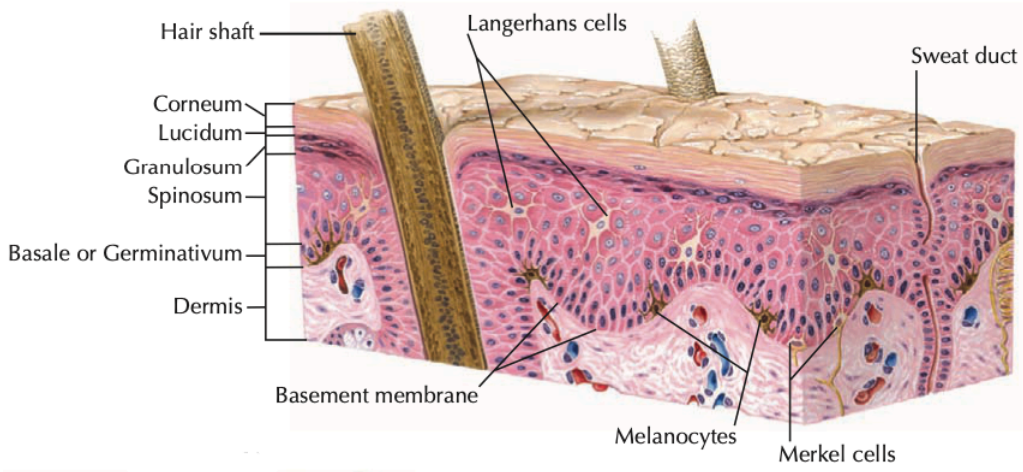
- Epidermis
- Dermis
- Subkutis



Şekil 8: Derinin katmanları [16]

Epidermis içinde, ana cilt hücresi olan keratinosit bulunur. Epidermiste bulunan diğer hücreler arasında melanositler, Merkel hücreleri ve Langerhans hücreleri bulunur [16]. Dermiste ise ana hücre tipi fibroblasttır. Fibroblastlar, cilt için mekanik desteği oluşturan kollajeni üretir. Dermis, yüksek vaskülariteye sahip bir bölgedir. Subkutis dokusu doğrudan dermisin altında bulunur ve esas olarak adipositlerden oluşur [16]. Normal bir insanın epidermis kalınlığı, vücudun farklı bölgelerinde büyük ölçüde değişir. Sırtta en kalın, göz kapaklarında ve skrotal ciltte en incedir [16]. Epidermis beş bileşene ayrılabilir [2] (Şekil 9):

- Stratum bazale
- Stratum spinosum
- Stratum granulosum
- Stratum lucidum
- Stratum corneum



Şekil 9: Epidermisin bileşenleri [16]

Epidermisin her tabakasının önemli anatomik ve fizyolojik işlevleri vardır. Stratum bazale en derin katmandır. Bir bazal membran üzerine oturan küboidal epitelden oluşur [2]. Stratum bazale, üstteki epidermisi değiştirmek için sürekli olarak replikasyona uğrayan çoğalan keratinositleri içerir. Bazal keratinositin stratum corneum'un en dış tabakasına ilerlemesi yaklaşık 28 gün sürer [16]. Melanositler ve Merkel hücreleri de stratum bazale içinde bulunabilir. Melanositler pigment oluşturan hücrelerdir; pigmentlerini komşu keratinositlere aktarırlar. Merkel hücreleri modifiye sinir uçlarıdır ve mekanoreseptörler olarak önemli oldukları bulunmuştur. Stratum spinosum birden fazla hücre tabakası kalınlığında olan ve bitişik keratinositler arasında hücreler arası bağlantılar bulunan, ışık mikroskobunda bu bağlantıların küçük dikenler olarak görüldüğü kısımdır. Stratum spinosum'un alt katmanlarından üst katmanlarına doğru, keratinositlerin görünümü giderek daha düz hale gelir [16].

Stratum granulosum, keratinositleri içindeki çok sayıda bazofilik keratohiyalin granülleri tarafından tanınır. Bu tabaka tipik olarak 2 ila 4 hücre tabakası kalınlığındadır. Keratohiyalin granülleri esas olarak proteini profilaggrindir. Bu granüllerin çapı 1-4 μm (mikrometre) arasında değişir. Profilaggrin, üstteki epidermisin bütünlüğü için gerekli olan temel bir protein olan filagrinin öncüsüdür [16].

Stratum lucidum sadece avuç içi ve ayak tabanlarının derisinde bulunur [2]. Yarı saydam bir eozinofilik tabakadan oluşur. Stratum lucidum, sıkıca paketlenmiş skuamöz keratinositlerden oluşur [17].

Derinin en dış tabakası olan stratum corneum, çekirdeksiz, kornifiye keratinositlerden oluşur [17]. Keratinizasyon (kornifikasyon), stratum corneum'un ortaya çıkmasıyla sonuçlanan karmaşık bir süreçtir. Hücreler stratum corneum'a doğru ilerledikçe, deskuamasyon olarak bilinen süreçte dökülürler [16].

Dermisin esas hücresi fibroblastlardır. Dermis selüler ve ekstraselüler matriks komponentlerinden oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks dokuya ve hücrelere gerekli olan desteği sağlar [18]. Ekstraselüler matriks içerisinde bulunan moleküller birçok şekilde sınıflandırılsa da genel anlamda yapısal olarak bulunan kollajen, elastin, proteoglikan gibi moleküller ve daha özelleşmiş yapılar olarak da integrin, fibronektin gibi yapılar yer almaktadır [19]. Dermisin temel üç bileşeni olan kollajen, elastin ve glikozaminoglikan deri gençleştirme tekniklerinin geliştirilmesinde, çeşitli kırışıklık önleyici kremlerden dolgu maddelerine kadar birçok aşamada en önemli hedeflerdir [20].

Kollajenler, proteoglikanlar ve glikoproteinler; ekstraselüler matrikste bulunan moleküller olup; hücre adezyonu ve doku gelişiminde bir çerçeve çizmektedir [21]. Epitel hücrelerin yerleşim gösterdiği ekstraselüler matriks yapısı incelendiğinde, yapısal ve içerik olarak bazal lamina ve bağ doku olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Bazal lamina kollajen Tip IV, laminin, nidojen 1 ve nidojen 2, perlekan gibi proteoglikan yapılarından oluşmaktadır [8].

Kollajen, memelilerde en fazla bulunan ve tüm vücut protein kitlesinin yaklaşık olarak %30'unu oluşturan proteindir ve "glisin-X-Y" aminoasit tekrarları içeren üçlü sarmal α heliks zincirlerinden oluşmaktadır [22]. Kollajen ailesi yüksek oranda çeşitlilik göstermekte ve klasik fibriler yapıda düzenlenenler, amorf yapıda olanlar ve transmembran kollajenler şeklinde bulunmaktadırlar. Buna bağlı olarak fibriler ve fibriler olmayan formları ekstraselüler matriksin yapısal özelliklerini belirlemektedir [23]. Kollajen proteinleri öncü olarak prokolajen şeklinde sentezlenmekte ve kollajene çevrilerek yapısal işlev göstermektedir. Yeni sentezlenen prokolajen endoplazmik retikulum yüzeyinde bulunan ribozomlarda sentezlenmekte ve büyüyen zincir endoplazmik retikulum sisternalarına girmekte ve sentez burada tamamlanmaktadır. Kollajen üçlü heliks yapısında prolin ve lizin hidroksilasyonu gibi posttranslasyonel modifikasyonlar önemli olup, bunlar endoplazmik retikulumda sentez sırasında gerçekleştirilmektedir. Prolin hidroksilasyonu 4-hidroksiprolin

şeklinde olmakta ve üçlü heliks yapıyı stabil tutmaktadır. Lizin hidroksilasyonu ise kollajen molekülleri ve polimerleri arasında çapraz bağlanmayı sağlamaktadır. Bu çapraz bağlar kollajen organizasyonu ve doku/organlara belirli bir mekaniksel dayanıklılık kazandırmak için oldukça önemlidir [21].

Elastin dermis yapısında kollajene göre daha az bulunur (%2) ve derinin esnekliğinin sağlanmasında kritik öneme sahiptir. Elastin; glisin, prolin, alanin, lösin, valin aminoasitlerinden zengindir ve genellikle 3-9 aminoasit sekansından oluşur. Bu durum elastin proteinine esnek ve dinamik bir yapı kazandırır [24]. Elastinin yapı taşı olan tropoelastin monomeri granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir ve sonrasında intraselüler posttranslasyonel modifikasyona uğrar. Golgi aygıtı yardımıyla hücre dışına salgılanan tropoelastin molekülü mikrofibriler bir iskelet üzerinde çapraz bağlar yaparak polimerleşir. Polimerleşme aşamasının gerçekleşebilmesi için lizil oksidaz enzim aktivitesi gereklidir. Bu işlemler sonucunda amorf, stabil, suda çözünmeyen elastin polimeri oluşur [25]. Elastinin doku düzeyinde yarı ömrü 70 yıldır ve bilinen en stabil proteindir [25].

Proteoglikanlar, glikozaminoglikanların bir kor protein yapısına bağlanarak meydana getirdiği yapılardır. Glikozaminoglikan molekülleri tekrarlayan dissakkarit birimlerinden oluşan doğrusal anyonik polisakkaritlerdir [23]. Glikozaminoglikan zincirleri taşıdıkları negatif yük özellikleri ile su tutma kapasitesine bağlı desteğin oluşmasında önemlidir [21]. Bu sayede proteoglikanlar hidrojel şeklinde bulunup dokuya mekaniksel dayanıklılık kazandırmaktadırlar. Proteoglikanlar hücre içi bölgelerde ve ekstraselüler matrikste bulunmaktadırlar. Bu moleküller glikozaminoglikan zincirleri veya kor proteinleri aracılığı ile birçok büyüme faktörü, sitokin ile ilişki kurmaktadırlar [19]. Bu açıdan ekstraselüler matriks organizasyonu ve hücrelerin aktivitesini düzenlemede etkin rol oynamaktadırlar [26]. Proteoglikanlar, içerdikleri glikozaminoglikan zincirleri ve kor proteini yapısı esas alınarak üç sınıfa ayrılmıştır. Bunlar zengin küçük lösinler, modüler proteoglikanlar ve hücre yüzey proteoglikanları, yani membran proteoglikanları şeklindedir [27]. Zengin küçük lösinler kollajen ağın oluşmasına yardımcı olmaktadırlar [19]. Membran proteoglikanları heparan sülfat ve keratan sülfat bulundurma eğilimi göstermektedirler. Bu yapılar büyüme faktörlerini bağlamaktadırlar. Bu yüzey

etkileşimleri sayesinde adezyon, göç etme, proliferasyon, farklılaşma gibi sinyaller düzenlenmektedir [21].

Glikozaminoglikan yapıları hyalüronik asit, keratan sülfat, kondroitin sülfat/dermatan sülfat ve heparan sülfat olarak dört grupta incelenmektedir. Hyalüronik asit, sülfat içermeyen ve kor protein yapılar ile kovalent bağ kurmaksızın bulunan doğrusal glikozaminoglikan zincirleridir [23]. Hyalüronik asit su tutma kapasitesi ile dokuya fizikokimyasal olarak yapısal ve fonksiyonel bir özellik kazandırmakta ve bunun yanı sıra hücre proliferasyonu, göçü ve doku tamirinde rol almaktadır [23]. Hyalüronik asit moleküllerinin dokuda bulunması bu yapıyı yıkan ve sentezleyen enzimlerin aktivitesi ile ilişkilidir. Memelilerde üç hyalüronan sentaz izoformu (HAS1, HAS2 ve HAS3) olup, bunların temel görevi farklı büyüklükte olan hyalüronik asit moleküllerinin sentezini gerçekleştirmektir [28]. Diğer yandan hyalüronidazlar, hyalüronik asit moleküllerini düşük molekül ağırlıklı parçalara ayırmaktadırlar [26].

Dermis, papiller ve retiküler kısımlar olarak adlandırılan iki bölgeye ayrılabilir (Şekil 7). Papiller dermis, üstteki epidermise bitişiktir ve bazal membran ile birbirinden ayrılır [16].

Subkutis dokusu adipositlerden oluşur. Bu dokunun temel işlevleri enerji depolama, yalıtım ve yastıklamadır [16]. Adipositler, ilişkili kan damarları ve sinir uçları ile bir bağ dokusu septumu içinde sıkı bir şekilde paketlenir [29].

Yapılan bir çalışmada subkutan yağ dokusu, adiposit ve bağ dokusunun konfigürasyonuna göre üç ayrı grupta incelenmiştir [30].

- Tip-1: Depo yağ dokusu
- Tip-2: Yapısal yağ dokusu
- Tip-3: Fibröz yağ dokusu

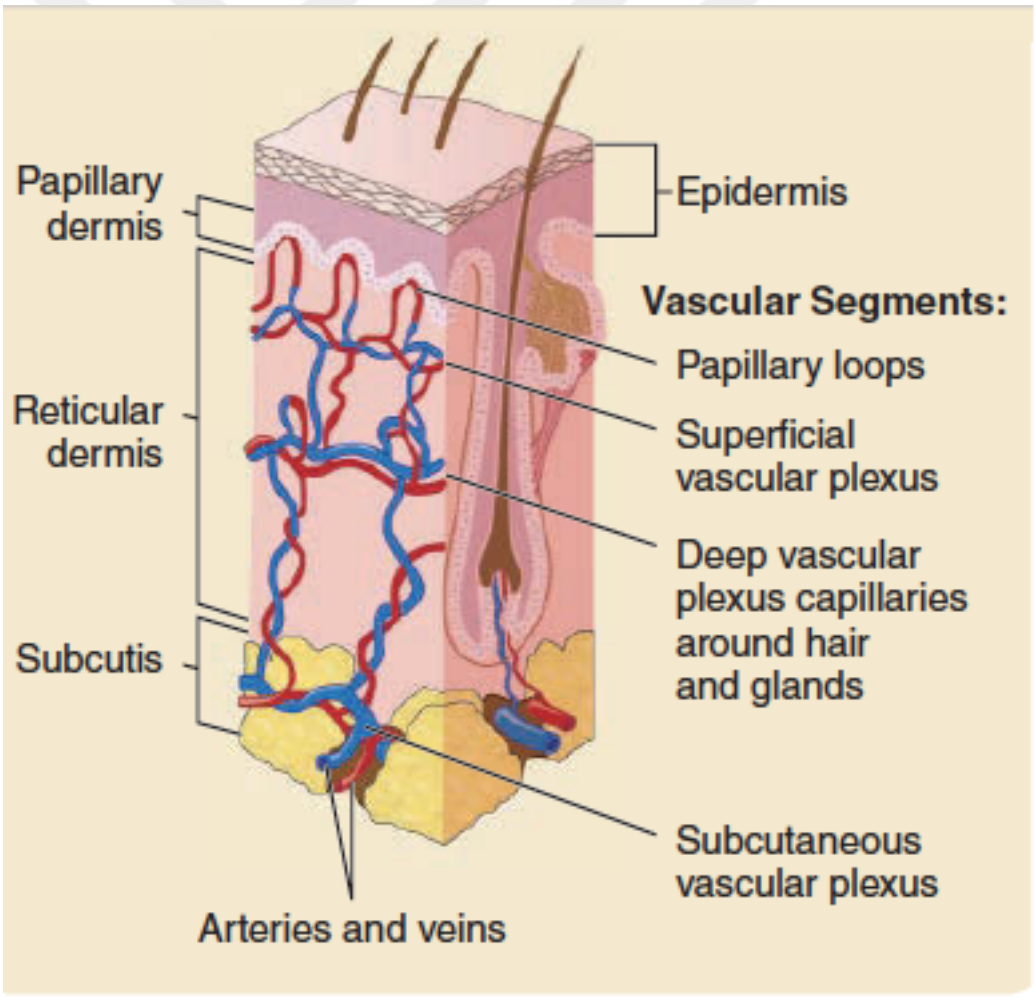
Tip-1'de adipositlerin boyutları daha fazladır ve çevrelerindeki kollajen septa belirgin olarak incedir. Daha az progenitör hücreyle birlikte ince ve düşük yoğunlukta kapiller mevcuttur. Periumbilikal bölgede sıklıkla bu tipte subkutan yağ dokusu mevcuttur. Tip-2'de ise daha belirgin septalar, daha belirgin vasküler ağ ve daha yoğun progenitör hücre kaynağı mevcuttur (trokanter, uyluk, kol, pektoral alan gibi).

Tip-3 subkutan yağ dokusu mekanik strese maruz kalan alanlarda izlenen yağ dokusudur. Yoğun fibröz septa içerir [30].

2.1.3. Derinin Vasküler Anatomisi

Yaklaşık 30 yıl önce, Irwin Braverman, insan derisinin damar ağının organizasyonunun tanımlamasını yaptı [31]. İnsan dermal damar sistemi yüzeyel ve derin vasküler pleksus olmak üzere birbirine bağlı iki sistemden oluşur [32] (Şekil 10).

Dermisteki bu pleksuslar cildin beslenmesinden ve termoregülasyondan sorumludur. Yüzeyel pleksus termoregülasyondan sorumludur. Soğuğa maruz kaldığında vazokonstriksiyona, sıcağa maruz kalındığında ise vazodilatasyona uğrar [16].



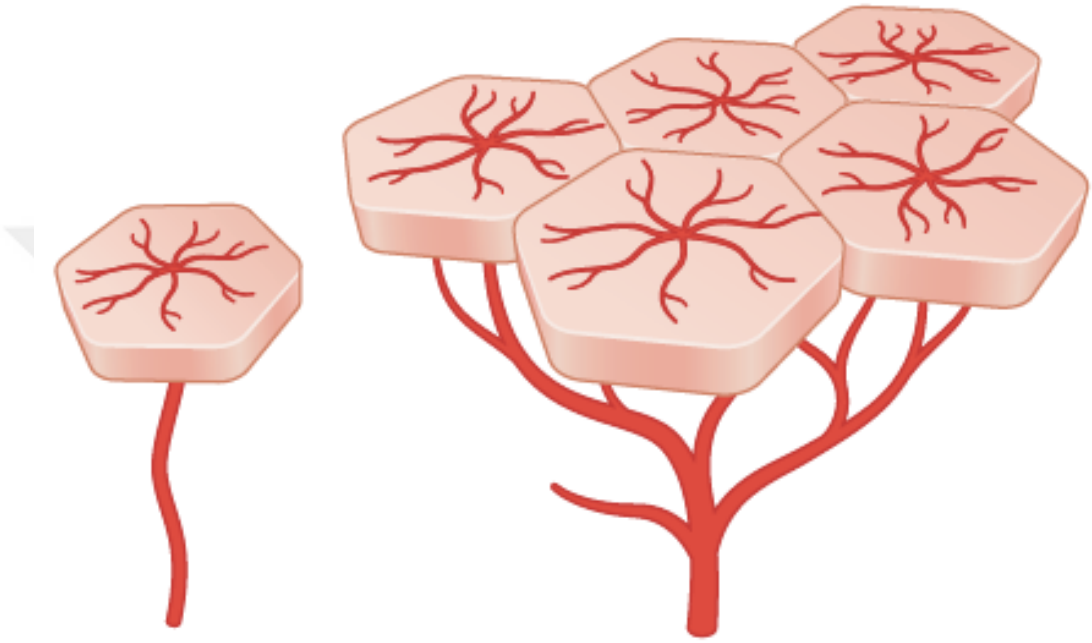
Şekil 10: Deri damarlarının mimarisinin şematik görünümü [32]

Yüzeyel vasküler pleksus, epidermal yüzeye paralel ve epidermal yüzeyin hemen altında bir düzlemde seyreden, birbirine bağlı bir damar ağı oluşturan çift arteriyol ve venüllerden oluşur. Kılcal damarlar arteriyollerden çıkar, epidermal rete sırtları arasındaki bölgelerde, papiller dermis içinde yukarı doğru uzanır ve daha sonra venüllere geri döner (Şekil 9). Yüzeyel vasküler pleksusun arteriyolleri ve venülleri, kısa, düz damarlarla, daha derin ve düzlemsel damar ağına sahip olan, derin vasküler pleksusun arteriyollerine ve venüllerine bağlanır [32] (Şekil 9). Derin vasküler pleksus, retiküler dermis ile alttaki subkutis arasındaki sınırın üzerinde seyreder. Derin vasküler pleksusun arteriyolleri, subkutisten gelen penetran damarlardan beslenir. Venülleri ise subkutan yağa geri dönen valf içeren damarlar tarafından boşaltılır. Derin vasküler pleksus, retiküler dermis içindeki adneksiyal yapıları besler [32]. Dermal arteriyollerin duvarları endotelyal hücrelerden oluşan bir intima, düz kas hücrelerinden oluşan media tabaka ve bazı bağ dokusu hücrelerinden oluşan adventisya olmak üzere üç katmandan oluşur. Terminal arteriyollerde, düz kas hücrelerinden oluşan medial tabaka, endotelyal hücrelerin bazal membranında perisit hücrelerine dönüşebilir. Venüllerin ve venlerin duvarları benzer bir yapıya sahiptir, ancak arterler ve arteriyollerle karşılaştırıldığında, venöz dolaşımın damarları daha büyük bir lümene ve daha ince bir kas duvarına sahiptir. Küçük damarların daha büyük olanlara bağlandığı yerlere yerleşmiş valfler bulunur [32]. Dermal kapillerlerin ve post kapiller venüllerin duvarları, basit bir bazal membran üzerinde oturan tek sıralı pencereli endotelyal hücrelerden oluşur.

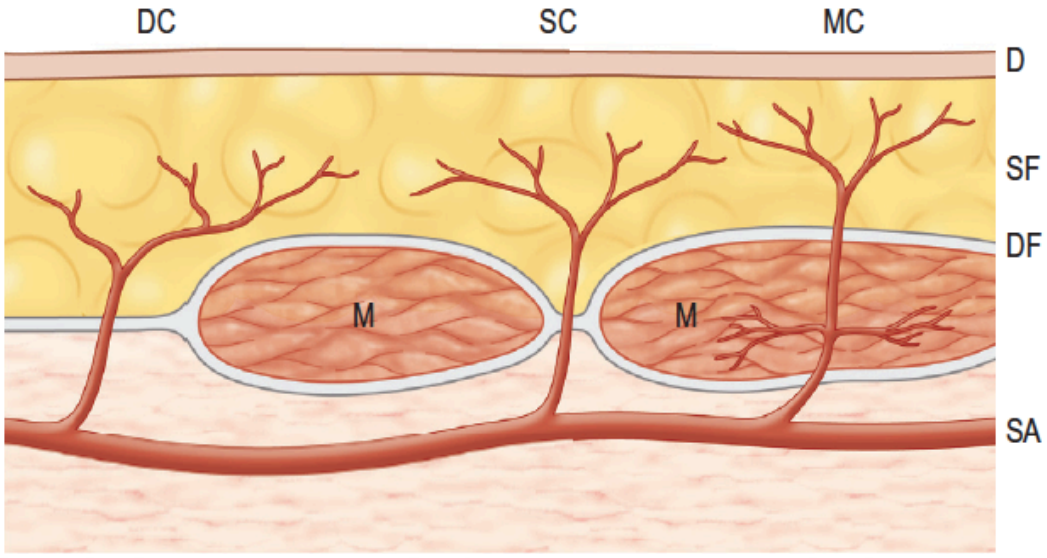
Yüzeyel vasküler pleksusun postkapiller venülleri; T hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve mast hücreleri dahil olmak üzere çeşitli yerleşik lökosit hücrelerle ilişkilidir. Bu bölgedeki endotelyal hücreler ve perisitler, dolaşımdaki lökositlerin dermise geçebileceği, damar sisteminin bir segmenti olan postkapiller venlerin "perivasküler ekstravazasyon ünitesini" oluşturur [33].

Anjiozom (angiosome; Yunanca damar anlamına gelen *angeion* ve vücudun bölümü anlamına gelen *somitten* türetilmiştir) bir ana kaynak arter tarafından beslenen kompozit bir doku bloğu olarak tanımlanır. Bu doku bloklarını besleyen kaynak arterler (segmental veya dağıtıcı arterler), derinin ve alttaki derin yapıların beslenmesinden sorumludur. Bir yapboz gibi bir araya getirildiklerinde, vücudun üç boyutlu damar bölgelerini oluştururlar (Şekil 11). Vücudun arteriyel ağı, her doku

boyunca, düşük kalibreli kısıtlayıcı anastomozlar (choke anastomoses) veya gerçek anastomozlar (true anastomoses) ile birbirine bağlanan, sürekli birbirine kenetlenen bir damar dizisinden oluşur. Kutanöz perforatörlerin seyri, kaynak arterin derin fasyanın alt yüzeyine yakınlığına bağlıdır. Arterler; kaslar arası septa, fasya, sinirler ve tendonlar dahil olmak üzere geçtikleri her dokuya dallar verir. Arterler genellikle direkt ve indirekt olmak üzere iki gruba ayrılır (Şekil 12).



Şekil 11: Tek bir anjiozom ve tek bir kaynak arterden çıkan perforatör anjiozomların birbirleri ile ilişkisi [34]



Şekil 12: Direkt ve indirekt kutanöz damarların şematik gösterimi. D: dermis, DC: direkt kutanöz, DF: derin fasya, M: kas, MC: kas-kutanöz, SA: kaynak arter, SC: septokutanöz, SF: yüzeysel dermis [34]

Direkt kutanöz damarlar, derin fasyanın dış tabakasını delmeden önce derin dokular arasından geçer. Genellikle primer kutanöz damarlardır ve asıl varış yerleri direkt deridir. Deride daha geniş bir vasküler bölgeye sahip daha geniş çaplı damarlar sağlama eğilimindedirler. Direkt kutanöz damarlar ve septokutan damarlar direkt dalları oluşturur.

İndirekt damarlar sekonder besleyici damarlar olarak kabul edilirler. Kasları ve diğer derin dokuları besleyen arterlerin terminal dalları olarak derin fasyadan çıkarlar. İndirekt dalların çoğu, deriyi beslemek için ortaya çıkan kas-kutanöz perforatörlerdir.

Direkt kutanöz damarlar şunlardan kaynaklanır:

- Derin fasyanın hemen altındaki kaynak arterlerden (örn, süperfisiyal inferior epigastrik arter)
- Kaynak arterin doğrudan devamı olarak (örneğin, eksternal karotid arterin kutanöz dalları)
- Bir kasa derin yerleşimli kaynak arter veya dallarından biri olarak intermusküler septayı yüzeye kadar takip edenlerden (örneğin, lateral sirkumfleks femoral arterin septokutan dalları)

İnsan vücudunda yaklaşık 400 perforatör vardır, damarların yaklaşık %40'ı direkt ve %60'ı indirekt perforatördür [34]. Direkt kutanöz perforatörler derin fasyayı, kaslar arası ve kas içi septanın kemiğe sabitlendiği yerin yakınında deler. Direkt perforatörlerin boyutu ve yoğunluğu da farklı bölgelerde farklılık gösterir. Örneğin baş, boyun, gövde, kol ve uylukta damarlar daha büyük, daha uzun ve daha az sayıdadır. Önkol, bacak ve sırt kısmında ise daha küçük, daha kısa ve daha çok sayıda olma eğilimindedir. Derin fasyaya bitişik subkutan yağın alt yüzeyinde bu damarlar dallanırlar ve subdermal pleksusa doğru ilerleyerek yağ lobülleri arasında ilerlerler. Daha küçük damarlar cilde doğru dikey olarak ilerleme eğilimindeyken, daha büyük damarlar yıldız şeklinde tüm yönlere doğru dallanır veya belirli bir eksende ilerler, cilt yüzeyine paralel olarak dağılır.

Kutanöz venler vücut boyunca birbirine bağlanan ağlar şeklinde, üç boyutlu bir pleksus oluşturur. Akışın tek yönde sağlandığı valfli bölümler ve valflerin bulunmadığı avalvüler bölümler vardır. Avalvüler veya salınımlı venler, bitişik venöz bölgeler arasında çift yönlü akışa izin verir. Valfleri zıt yönlerde olan venleri birbirine bağlayarak akış ve basıncın dengelenmesini sağlarlar. Akışı proksimal venlerden ziyade, valfler sayesinde kalpten uzağa doğru yönlendiren de birçok damar vardır. Bunun bir örneği, alt karın duvarı venöz kanını inguinal bölgeye doğru akıtan süperfisiyal inferior epigastrik vendir. Diğer alanlarda, kapaklı venler, uzuvların kutanöz perforan venlerinde olduğu gibi merkezi bir odağa doğru akışı yönlendirir [34].

Genel olarak venöz anatomi arteriyel anatomiye paraleldir. Venler, dermal ve subdermal venöz pleksuslardan ya yatay büyük kalibreli damarlara doğru ilerler ya da alternatif olarak santrifüj veya yıldız şeklinde derin fasyayı delmek için kutanöz arterlerle birlikte dikey olarak derine doğru geçen ortak bir kanalda toplanır. Bundan sonra venler direkt ve indirekt kutanöz arterlerle birlikte hareket eder ve nihayetinde derin dokudaki kaynak arterlerin vena komitantlarına bağlanır. Genel olarak, derin venlerin (vena komitantların) orijini, seyri ve dağılımı, derin kaynak arterlerin ayna görüntüsüdür, ancak bunlar daha büyük ve sayıca daha çoktur. Ancak yüzeyel venler derin arterlerden bağımsızdır ve farklı bir drenaj alanına sahip olabilir. Örneğin, önkolda radial ve ulnar arterlere eşlik eden vena komitantları vardır. Ancak sefalik,

bazilik ve antebrakiyal damarlar dahil olmak üzere büyük kalibreli subkutan damarlardan oluşan ayrı bir sistem vardır [34].

2.2. Yaşlanan Deri

Son derece karmaşık fakat henüz tam olarak anlaşılmamış bir süreç olan cilt yaşlanması, sürekli artan yaşam beklentisi nedeniyle rejuvenasyon açısından hep ilgi alanı olmuştur [35]. Yaşlanma, hücrelerde ve dokularda farklı zararlı değişikliklerin birikmesi olarak düşünülebilir. Bu değişiklikler biyolojik fonksiyonları aşamalı olarak bozabilir, hastalık gelişme riskini artırabilir ve sonuçta ölüme yol açabilir [36].

Yaşlanma, hem intrensek (yumuşak doku olgunlaşması, iskelet değişikliği/atrofisi, kas hiperaktivitesi) hem de ekstrensek faktörlerin (yerçekimi ve güneş hasarı) bir sonucu olan karmaşık bir süreçtir. Yüzün pürüzsüz kıvrımlı görünümü yaşla ve diğer faktörlerle birlikte yavaşça keskin açılar, ince ve derin kırışıklıklar, keskin boşluklar ve çıkıntılarla değişir. Yaşlanma ile fasiyal iskelete değişiklikler görülür. Fasiyal yükseklikte bir azalmaya ve yüz iskeletinin orta derecede genişlemesine neden olur.

2.2.1. İntrensek Cilt Yaşlanmasının Patofizyolojisi

Hücresel yaşlanma (Hayflick limiti) ve telomerlerin kısalması, mitokondriyal DNA mutasyonları, oksidatif stres, genetik mutasyonlar ve bazı hormonların seviyelerinin azalması intrensek yaşlanma teorisinde sorumlu tutulmaktadır [37]. Serbest radikal yaşlanma teorisine göre, öncelikle oksidatif hücre metabolizmasından kaynaklanan reaktif oksijen ürünleri, hem kronolojik yaşlanmada hem de foto yaşlanmada önemli bir rol oynamaktadır [38]. Artan yaşla birlikte zayıflayan antioksidatif mekanizma nedeniyle, reaktif oksijen ürünleri hücresel bileşenlere zarar verir. Bu hasar, reaktif oksijen ürünlerinin daha da artmasına, antioksidatif kapasitelerin daha da azaltılmasına ve son olarak hücresel yaşlanmaya yol açar [39]. Reaktif oksijen ürünleri hücre içi kinaz bağlı sinyal yolaklarını hem aktive eder hem de fonksiyonlarında bozulmalara yol açar. Buna bağlı olarak kısmen bozulmuş kollajen üretimine neden olur [40]. Son çalışmalar, CTGF'nin (bağ dokusu büyüme faktörünün) ve azalmış TGF (dönüştürücü büyüme faktörü) -β/Smad sinyalinin muhtemelen, intrensek cilt yaşlanmasında, tip I prokollajen ekspresyonunun

azalmasından sorumlu olduğunu göstermiştir [41]. İntrensek cilt yaşlanması, hormonal değişikliklerden güçlü bir şekilde etkilenir [42]. Gonadlarda, hipofizde ve adrenal bezlerde seks hormonlarının üretimi, yirmili yaşların ortalarında zaten kademeli olarak azalmaktadır. Menopoza paralel olarak östrojen ve progesteron azalır. Özellikle östrojen ve androjen eksikliği ciltte kuruluğa, buruşmaya, epidermal atrofiye, kollajen yıkımına ve elastikiyet kaybına neden olur [43].

2.2.2. Ekstrensek Cilt Yaşlanmasının (Foto Yaşlanmanın) Patofizyolojisi

Ekstrensek cilt yaşlanması öncelikle UV (ultraviyole) ışığına maruz kalmaktan kaynaklanır. Yüz derisinin yaşlanmasının yaklaşık %80'i UV'ye maruz kalmaya bağlanır [44]. Diğer ilgili ekzojen faktörler, tütün dumanına, havadaki partiküler maddeye, kızılötesi radyasyona, ozona ve yetersiz beslenmeye maruz kalmadır. Erken cilt yaşlanması veya foto yaşlanma, ekstrensek cilt yaşlanması ile eş anlamlıdır.

UV ışığının biyolojik etkileri, kromoforlarda ışık absorpsiyonuna ve ardından kimyasal reaksiyonlarda enerjinin dönüştürülmesine dayanır. UVA ve UVB ışığı biyolojik etki göstererek cilt yaşlanmasına ve foto karsinojeneze neden olur. Dalga boylarına bağlı kesin biyolojik etkiler net olarak bilinmemektedir. UVB esas olarak epidermiste emilir, foto karsinojenik siklobutan pirimidin dimerleri (CPD'ler) ve 6,4-foto ürünler oluşturarak DNA hasarı oluşturur. UVA ışığı, ürokanik asit, melanin öncüleri ve riboflavin gibi hücresel kromoforlar tarafından emilir. UVA'ya maruz kalan kromoforlar; lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar veren reaktif oksijen ürünleri üretir. UVA ışığı, yüksek penetrasyon derinliği nedeniyle foto yaşlanmayla son derece bağlantılıdır [45].

2.2.2.1. Mitokondriyal DNA'nın Mutasyonları

Reaktif oksijen ürünlerinin ana endojen kaynağı mitokondridir. Bu reaktif oksijen ürünleri mitokondride tüketilen oksijenin yaklaşık %1'inden oluşur [35]. Reaktif oksijen ürünleri, sinyal molekülleri olarak fizyolojik rollerine ek olarak, hücresel savunma mekanizmalarının tükenmesinden sonra oksidatif strese yol açar. Reaktif oksijen ürünleri yakın ilişkileri nedeniyle mitokondriyal (mt) DNA için önemlidir. İnsan mtDNA'sı, solunum zincirinin proteinlerini kodlayan, 16 559 baz çifti içeren, çift sarmallı, dairesel ve en fazla 10 kopyadan oluşan bir DNA molekülüdür.

MtDNA, yetersiz tanıma ve tamir mekanizmaları nedeniyle nükleer DNA'dan çok daha yüksek mutasyon oranına sahiptir [46]. MtDNA mutasyonları, yaşlanma süreçleri, foto yaşlanma ve çeşitli nörolojik hastalıklar için önemlidir. Foto yaşlanmış cilt mtDNA'sında, güneşten korunan cilde göre daha fazla mutasyon saptanmıştır [47]. En sık görülen mitokondriyal mutasyon, indüksiyonu doğrudan kronik UVA maruziyeti ile ilişkili olan "ortak silme" olarak adlandırılan büyük ölçekli, 4977 baz çifti delesyonudur. MtDNA'nın reaktif oksijen ürünleri kaynaklı mutasyonları, işlevsiz oksidatif fosforilasyona yol açmaktadır. Böylece daha fazla reaktif oksijen ürünleri üretilir ve ürünler daha fazla mutasyona neden olur [48].

2.2.2.2. Telomerlerin Rolü

İnsan DNA'sında TTAGGG nükleotid serisinin ardışık tekrarlarından oluşan telomerler kromozom uçlarını oluşturur. Telomerler herhangi bir gen ürününü kodlamaz ve son 7000–12000 baz çiftini oluşturur. Telomer uzunluğu türlere göre değişir ve artan yaşla birlikte azalır [49]. Telomerler, TTAGGG tekrarlarından oluşan çift iplikli bir bölgeden ve distal uçta çok daha kısa tek iplikli 3′ çıkıntıdan oluşur. Bu yapı "t-loop" denilen 3 boyutlu bir yapıdadır. T-loop, kromozomlardaki çift iplikli yapının kırılmasını ve kromozom füzyonunu önler. Replikasyonda görevli DNA-polimeraz en son bazların replikasyonunu gerçekleştiremez. Bu sebeple her replikasyonda (hücre bölünmesinde) 100 baz çifti kadar DNA kısalır [50]. Bu nedenle, kritik telomer kısalması nedeniyle hücre bölünmelerinin sayısı 50-70 ile sınırlıdır [51]. Telomerlerin kritik kısalması, 3′ çıkıntıyı açığa çıkararak t-loop konfigürasyonunun bozulmasına neden olur. Bu süreç apoptoza, yaşlanmaya veya hücre döngüsünün durmasına yol açan DNA hasar yanıtını başlatır [52]. Telomer terminal transferaz olarak da adlandırılan telomeraz, telomerlerin 3' ucuna TTAGGG telomer dizisini ekleme yeteneğine sahiptir [53]. Telomeraz ekspresyonu erken embriyonik hücrelerde, malign hücrelerde ve germ hücrelerinde bulunur. İnsanlarda telomeraz, cilt yaşlanmasında ve onkogenezde önemli bir role sahiptir. Telomeraz aktivitesinin düzenlenmesi bu nedenle antiaging ve antikanser tedavisinde önemli bir role sahiptir [54].

Her hücre bölünmesinde telomerler kısalmasının yanı sıra, UV ışığı TTAGGG tandem tekrar dizisini açığa çıkararak döngü bozulmasına neden olabilir. Bu süreç,

intrensek yaşlanma ve foto yaşlanma için ortak bir mekanizma olan DNA hasar yanıtını ortaya çıkarır [55]. UV'ye maruz kalma, kromozomun diğer kısımlarına kıyasla daha yüksek sayıda TT- ve G-bazları nedeniyle özellikle telomerlere zarar verir. UV, özellikle TT- ve G-bazlarını hedef alır, t-loop konfigürasyonunu dengesizleştirir [56]. Bununla birlikte, UV'ye maruz kalma, deride reaktif oksijen ürünleri üreterek telomer kısalmasına neden olabilir. UV ciltte reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu indüklediğinden ve telomer kısalması reaktif oksijen ürünleri tarafından hızlandırıldığından, UV'ye maruz kalan cildin, UV'den korunan cilde kıyasla daha kısa telomerlere sahip olabileceği varsayılmıştır [57].

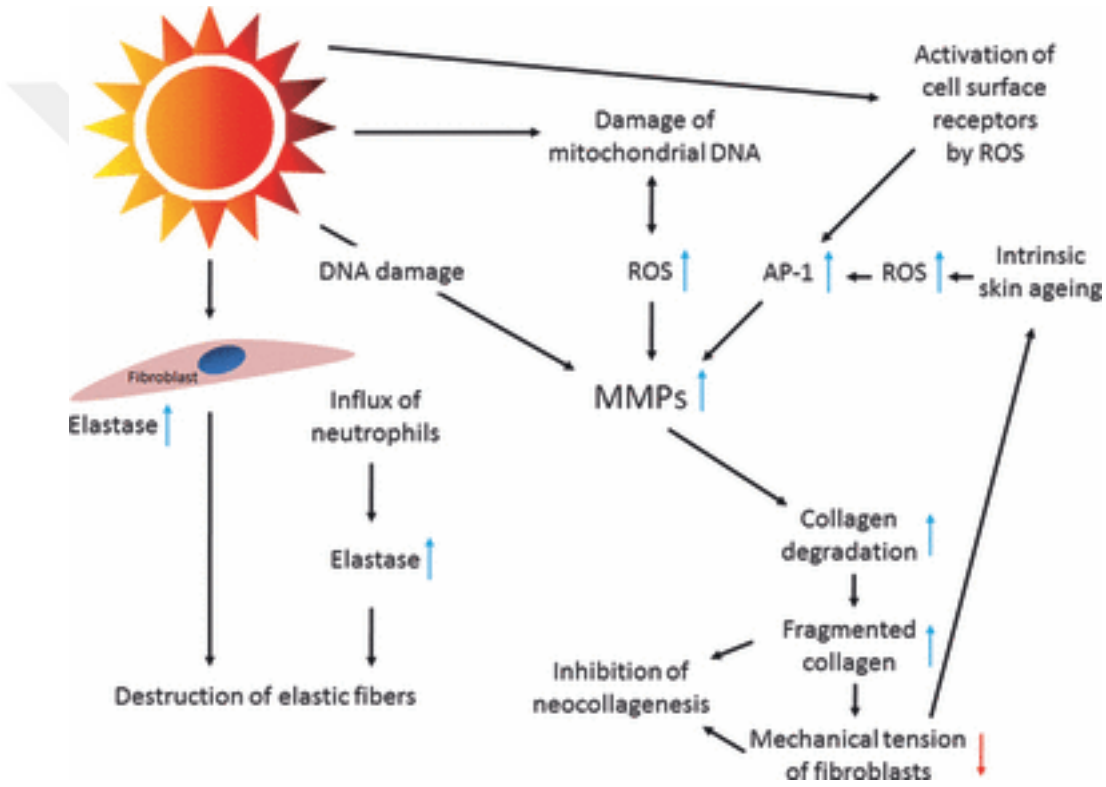
2.2.2.3. Matriks Metalloproteinazlar ve Sinyal İletim Yolları

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), cildin dermal bağ dokusunun yapısını oluşturan ekstraselüler matriks proteinlerinin çoğunu parçalama kapasitesine sahip önemli bir çinko içeren proteinaz ailesidir [58]. İnsan derisine UVB ışınlanmasından sonra MMP ekspresyonu indüklenir ve aktive edilir [59]. Ekstraselüler matriksin ana yapısal proteini olan tip I kollajendir ve fibroblastlar tarafından salgılanır. Suberitematöz UVB dozlarına maruz kalan deride MMP'lerin miktarı artmaktadır [59]. Bunlar içinden MMP-1, tip I kollajenin yıkımını başlatır ve bu nedenle ekstraselüler matriks destrüksiyonunda önemlidir. UV kaynaklı oksidatif stres, hücre yüzeyi reseptörlerinin ve sinyal kaskadlarını aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon, ekstraselüler matriksin bozulmasına ve neokollajenezin aşağı regülasyonuna neden olur. Böylece UV'ye maruz kalma aynı zamanda kollajen üretiminde azalmaya da neden olur [60].

2.2.2.4. Mekanik Gerginlik ve Ekstraselüler Matriks

Mekanik gerilim kaybı, yaşlanmış ciltte saptanabilen moleküler değişikliklere zemin hazırlar. Yaşlanma sürecinin arkasındaki azalmış neokollajenez, fibroblastların azalmış mekanik stimülasyonuna da bağlanabilir [35]. Yaşlanmış ciltte fragmente kollajenlere ve kollajen ile fibroblastlar arasındaki zayıflamış bağlantılara bağlı olarak fibroblastlarda kollaps gelişir. Bu süreç matriks metalloproteinazlarda, protein oksidasyonunda, hücre içi sinyal yolaklarında artmaya; kollajen üretiminde azalmaya neden olan döngü ile sonuçlanır [61].

Elastik liflerin bozulması, cilt yaşlanma süreçlerinde ve özellikle kırışıklık oluşumunda da önemlidir. Hayvan deneylerinde elde edilen bulgular, cilt elastikiyetinin kaybı ile oluşan kırışıklıkların nedeni olarak, tekrarlanan UVB maruziyeti olduğunu düşündürmektedir. Fibroblast elastaz ekspresyonu, keratinositlerin UVB ile indüklenen sitokin salgılanmasıyla uyarılır. Fibroblast elastazın artmış aktivitesi, kırışık oluşumunu kolaylaştıran elastik lif yıkımına neden olur [62].



Şekil 13: Cilt yaşlanmasındaki patojenik faktörlerin şematik gösterimi

2.2.2.5. Vasküler Değişiklikler

Yaşlanan deride dermal vaskülarizasyon değişiklikleri de olur. Foto yaşlanmış derinin papiller dermisinde hem damar boyutu hem de yoğunluğu önemli ölçüde azalır. Bununla birlikte, kendinden yaşlanmış ciltte ise sadece damar boyutunda bir azalma görülür [63]. İnsan cildi, UV ışığı, kızılötesi (IR) radyasyonu ve ısı gibi çeşitli

çevresel koşullardan etkilenir. Bu uyaranlar cilt anjiyogenezisini de etkiler. Akut UV maruziyeti cilt anjiyogenezisini uyarmasına rağmen, kronik maruziyete uğramış ciltte kan damarları azalır. Akut ve kronik UV radyasyonunun cilt anjiyogenezisi üzerindeki bu farklı etkilerinin nedeni bilinmemektedir. Akut UV bu etkisini, vasküler endotelyal büyüme faktörünün yukarı regülasyonu ve güçlü bir anjiyogenez inhibitörü olan trombospondin-1'in inhibisyonu yoluyla anjiyogenezi indükleyerek gösterir [63].

2.2.2.6. Protein Oksidasyonu ve Oksidatif Stres

Serbest radikalleri, reaktif oksijen ürünlerinin birikimi yoluyla cildin yaşlanma sürecine büyük etkileri olduğu kabul edilir. Oksidan ve antioksidan moleküllerin oranındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır [64]. Hücrelerde meydana gelen oksidatif stres, hücre membranı fosfolipidlerinin oksidasyonuna yol açarak transmembran sinyal yolunun bozulmasına neden olur [65]. Genel olarak, artan reaktif oksijen ürünü üretimi, MAPK'nın aktivasyonuna yol açar. MAPK, AP-1'i indükler, bu da MMP'lerin ekspresyonunu arttırır, bu da yaşlı ciltte kollajenin azalmasına neden olur [66]. Oksidatif stres ayrıca hücresel lipidler, proteinler ve DNA gibi makro moleküllerin oksidasyonunun artmasına da katkıda bulunur. Bu da yaşla birlikte hücresel işlev bozukluğuna neden olur. Yaşa bağlı hasarlı, oksitlenmiş ve kümelenmiş protein birikimi de yaşlanmaya neden olur [67].

Yaşlanan hücreler, oksitlenmiş proteinlerin artmasına bağlı olarak azalan proteazom aktivitesi gösterir [68]. Oksitlenmiş proteinleri parçalayan, bir multikatalitik proteaz olan proteazomun aktivitesi yaşla birlikte azalır [69]. Protein oksidasyonu, UV kaynaklı antioksidan enzim ekspresyonunun tükenmesinden kaynaklanır. Foto yaşlanmış cildin epidermisi, ışıktan korunmuş cilde göre büyük ölçüde daha düşük antioksidan enzim seviyelerine sahiptir. Dermisteki antioksidan enzimlerin seviyeleri epidermistekilerden büyük ölçüde düşük olduğundan, foto yaşlanmış ciltte, üst dermiste oksitlenmiş proteinlerin birikimi çok fazla olur. Oksitlenmiş ve çapraz bağlı proteinlerin birikmesi, proteinlerin ve lipofusin'in agregasyonu ile sonuçlanır ve tüm proteinleri aşamalı olarak inhibe eder.

2.2.3. Yaşlanmış Deride Klinik ve Histolojik Değişiklikler

İntrensek yaşlanmış ciltte, tek formlu pigmentasyonun yanında, elastikiyet kaybı, sigara kağıdı gibi buruşma, seyrekleşmiş kıl kökleri, ter bezleri ve yağ bezleri görülür.

Kümülatif UV dozu ve Fitzpatrick sınıflamasına göre cilt tipi, güneş kaynaklı deri değişikliklerinin derecesini belirler (Tablo 1). Cilt tipi I ve II olan kişilerde fokal depigmentasyon, epidermal atrofi, çil, psödoskarlar ve atrofik cilt değişiklikleri görülebilir. Ayrıca malign veya malign olmayan cilt tümörü gelişebilir. Buna karşılık, cilt tipi III ve IV olan kişilerde yaygın geri dönüşü olmayan hiperpigmentasyon, kösele görünüm, derin kırışıklıklar ve lentigo görülür [35].

Tablo 1: Fitzpatrick sınıflaması [70]

Tip I	Her zaman yanar, asla bronzlaşmaz (soluk; çilli ten)
Tip II	Genellikle yanar, minimum düzeyde bronzlaşır
Tip III	Bazen hafif yanıklar görülür, tekdüze bronzlaşır
Tip IV	Minimum düzeyde yanar, her zaman iyi bronzlaşır (kahverengi ten)
Tip V	Nadiren yanar, çok kolay bronzlaşır (koyu kahverengi ten)
Tip VI	Asla yanmaz (cilt rengi koyu kahverengi ile en koyu kahverengi arasındadır)

Hücre siklus sürelerinde belirgin uzama olması nedeniyle, epidermis yaşlı insanlarda çok daha yavaş yenilenir. Epidermal döngü hızı, yaşamın sekizinci dekadında %50'ye kadar düşer. Ayrıca, intrensek yaşlanmış ciltte, %10-50 arasında değişen, özellikle stratum spinosum'u etkileyen epidermal atrofi görülür [71].

Melanosit sayısı, 30 yaşından itibaren her on yılda %8-20 oranında azalır [72]. Langerhans hücreleri, morfolojik değişiklikler gösterir ve işlevleri bozulur. Işıktan korunmuş yaşlı derinin dermisi, daha genç deriye göre daha az mast hücresi ve fibroblast içerir, ayrıca kollajen lifleri ve elastik lifleri daha seyrektir [73].

Güneşe maruz kalan bölgelerdeki epidermis, intrensek yaşlanmış cilde göre daha kalındır, buna karşın şiddetli foto hasar epidermal atrofiye neden olur [74]. Güneş kaynaklı moleküler etkilenme öncelikle dermiste ve dermoepidermal bileşkede görülür. Histopatolojik olarak, foto yaşlanmış ciltte solar elastoz, yani dermiste bozulmuş elastik doku birikimi görülür. Elastotik materyal elastin, fibrillin, glikozaminoglikan, hyalüronik asit ve büyük bir kondroitin sülfat proteoglikanından oluşur. Solar elastozun patogenezi henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak hem degradasyondan hem de de novo sentezden kaynaklandığı düşünülmektedir [75].

2.3. Yaşlanan Deride Tedavi

Foto ve kronolojik yaşlanmanın dermal ve epidermal belirtilerini tersine çevirmeye çalışan ciltte yaşlanma karşıtı stratejiler, aşağıdaki gibi bir tablo altında gruplandırılabilir. [76] (Tablo 2).

2.3.1. Yumuşak Doku Dolguları

Yumuşak doku dolguları, kısa uygulama ve iyileşme süresiyle yüz gençleştirme arayan hastalar için ideal bir seçenektir. Ameliyat gerektirmeyen genç hastalar için bu malzemeler uygun bir seçenek sunarken, daha yaşlı hastalarda optimal bir sonuç elde etmek için ameliyat ile dolgu maddeleri ve diğer yüzey tedavileri ile birleştirilebilir.

Cildin ve altta yatan yumuşak dokunun konturunu değiştirmek için enjekte edilen dolgu maddelerinin kullanımı yeni değildir ve tarih boyunca ilgi odağı olmuştur. Bu hedefe yönelik etkili ve güvenli ajanlar ancak son yıllarda kullanılabilir hale gelmiştir. Parafin ilk olarak 1800'lerin başında kullanıldı, ancak önemli komplikasyonlarla karşılaşıldı [77]. Yağ enjeksiyonları 1890'lı yılların başlarında kullanılmaya başlandı. 1980'lerde enjekte edilebilir yarı kalıcı kollajen dolgu maddeleri pazar lideri haline geldi. Daha önceki substratlara kıyasla daha güvenliydi, ancak yüksek bir alerji ve inflamasyon insidansı görüldü [78]. Günümüzde birçok enjekte edilebilen materyal (dolgu maddesi) kullanılmaktadır.

Tablo 2: Cilt yaşlanma karşıtı stratejileri [76]

Kozmetik Bakım	1. Günlük deri bakımı 2. Doğru güneş koruması 3. Non-invaziv estetik prosedürler
Topikal Ajanlar	1. Antioksidanlar 2. Hücre regüle edici ajanlar
İnvaziv Uygulamalar	1. Kimyasal soyma 2. Görülebilir ışık uygulamaları 3. Yoğun atımlı ışık (IPL) uygulamaları 4. Lazer uygulamaları 5. Radyofrekans uygulamaları 6. Biyouyarıcı ajan enjeksiyonları 7. Dinamik kırışıklıkların önlenmesi (Botulinum toksini) 8. Statik-anatomik kırışıklıkların düzeltilmesi 9. Yağ dağılımının düzenlenmesi, kontur ve hacim düzenlenmesi (Dolgular)
Sistemik Ajanlar	1. Hormon replasman tedavisi 2. Antioksidanlar
Dış Etkenlerden Korunma, Yaşamın Düzenlenmesi	1. Tütün kullanımı 2. Hava kirliliği 3. UV maruziyeti 4. Günlük Stres 5. Beslenme düzenlenmesi 6. Fiziksel aktivite artırılması 7. Genel sağlık kontrolü sağlanması

Mevcut ürünlerin sayısı ve çeşitliliği çok fazla olsa da ideal dolgu maddesi henüz bulunamamıştır. İdeal bir dolgu maddesinin tanımı tartışmalı olabilir, ancak üzerinde anlaşılan bazı temel nitelikler vardır. İdeal dolgu maddesinden beklenen özellikler aşağıdaki tabloda yer aldığı şekilde özetlenebilir [79] (Tablo 3).

Tablo 3: İdeal Dolgu Maddesinin Özellikleri [79]

Başlık	**Beklenen Özellik**
Materyal	Biyouyumluk
	Antijenik olmama
	Toksik olmama
	Karsinojenik olmama
	Teratojenik olmama
Performans	Tekrarlanabilme
	Kalıcı Sonuç
	Kalıcı hacim
	Şekillendirilebilme
	Yüksek derecede güvenli olma
	Minimal uzak doku reaksiyonu
	Enjeksiyon alanından minimal migrasyon
Teknik	Kolay uygulanabilir olma
	İstenilen bölgeye enjeksiyonu sağlayacak formda olma
	Uygun enjeksiyonu sağlayacak şekilde değişken olmayan olma
Subjektif Tatmin	Öngörülebilir sonuç
	Minimal beklenmeyen etki
	Hızlı sonuç verme
Diğer	Profesyonel topluluk ya da hükümetlerce onaylanma
	Çok yönlü uygulama imkânı
	Ulaşılabilir ve ucuz olma
	Geri dönüşümlü olma

Halihazırda mevcut ve uygulamada olan dolgu maddeleri, yapısına göre 3 ana kategoriye ayrılabilir: Otolog dolgular, sentetik dolgular ve biyolojik dolgular (Tablo 4).

Tablo 4: Dolgu maddesi çeşitleri

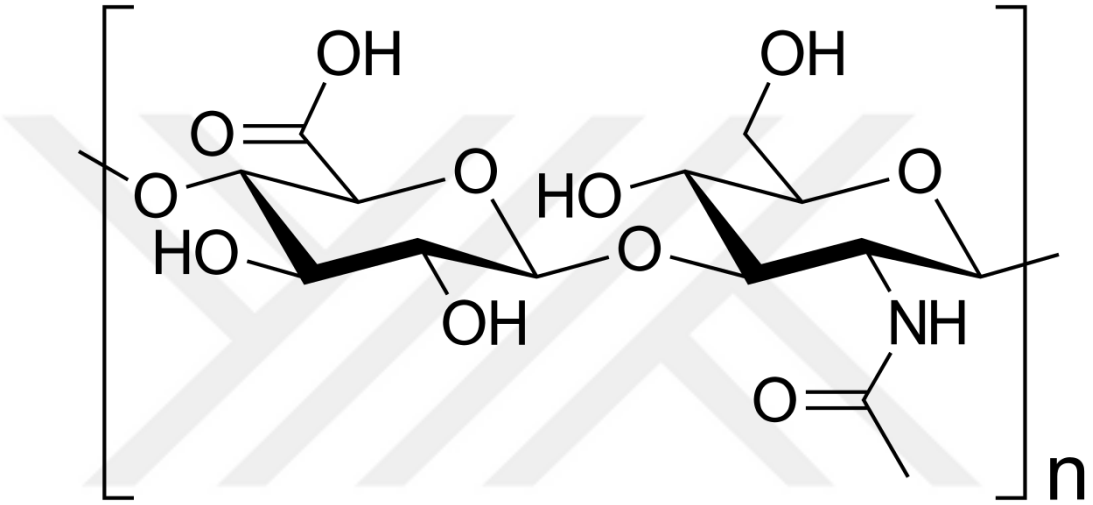
Dolgu Maddeleri	Otolog	Yağ grefti, dermis, fasya, kartilaj vs.
	Biyolojik	Kollajen, hyalüronik asit, dermal matriks vs.
	Sentetik	Silikon, polimetil metakrilat, kalsiyum hidroksiapatit vs.

Otolog dolgular uygulanacak kişinin kendi dokularından elde edilirken, sentetik dolguların ise kalıcılığı daha ön planda yer almaktadır. Biyolojik dolgu maddeleri insanlar, hayvanlar veya bakteriler gibi organik kaynaklardan üretilirler ve kullanıma hazır olarak temin edilebilmektedir. Ancak allerjenite, immünojenite gibi dezavantajlara sahiptir.

2.4. Hyalüronik Asit Dolguları

Hyalüronik asit, N-asetil glukozamin ve glukuronik asidin doğal olarak oluşan lineer polimerik dimeridir. Hyalüronik asit sinoviyal sıvının, deri, kıkırdak ve kemiğin bağ dokularının bir bileşeni olmakla birlikte, mukopolisakkaritlerin yapı taşı olarak da görev yapmaktadır (Şekil 14). Yetişkin insan vücudunun, %50'den fazlası deride olmak üzere toplam 12-15 g hyalüronik asit içerdiği tahmin edilmektedir [80]. Hyalüronik asit insan cildine hacim kazandırır, aynı zamanda ciltte amortisör ve kayganlaştırıcı görevi görür. Bu moleküller evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur. Türe özgü olmamasından dolayı sınırlı bir immünolojik ret potansiyeline sahiptir. İşlenmemiş moleküler konfigürasyonda, hızla parçalanıp metabolize edilmesi sadece birkaç gün sürer [81]. Doğal hyalüronik asitin, dokulardaki hızlı döngüsü ve bozulma hızı nedeniyle fonksiyonel ve estetik tedavide kullanımı kısıtlıdır. Bu problem çapraz bağlarla daha kararlı hale getirilen hyalüronik asit ile giderilmiştir

[82]. Son derece hidrofilik olan hyalüronik asit etrafında suyu bağlayarak bir hacim oluşturur. Çapraz bağlı hyalüronik asidin 1 gramı yaklaşık 6 litre suyu bağlayabilir [81]. Hyalüronik asit kitlesi, etrafındaki dokular tarafından dış yüzeyinden itibaren kademeli olarak parçalandıkça içteki hyalüronik asit molekülleri daha fazla suyu bağlar. Böylece dolgu parçalandıkça oluşturduğu hacmi korur. Buna "izovolümetrik degradasyon" denir. Hyalüronik asit neredeyse tamamen parçalana kadar oluşturduğu dolgu hacmini koruyabilmesinin nedeni izovolümetrik degradasyondur [81], [83].



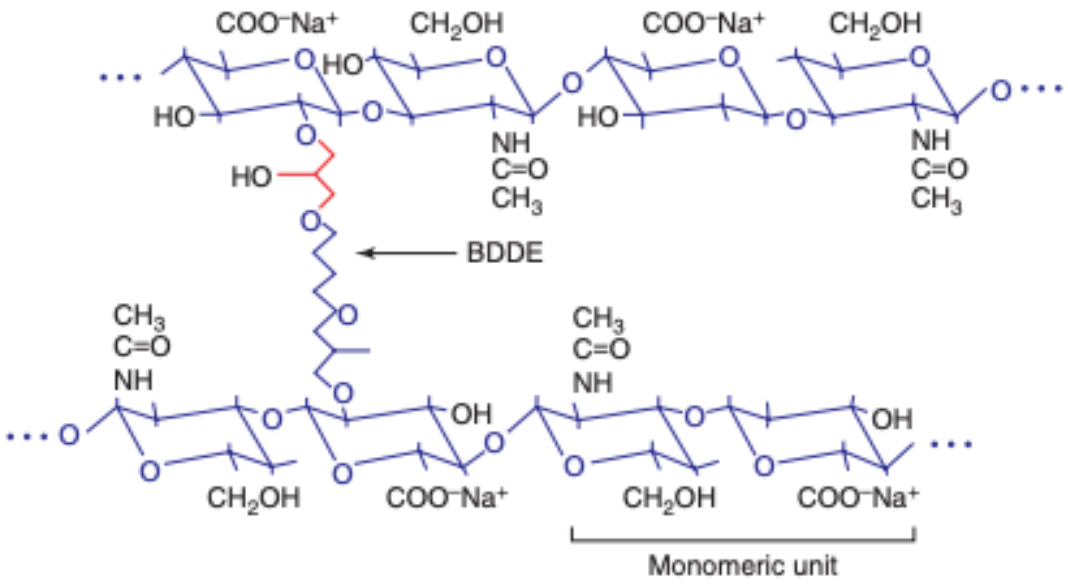
Şekil 14: Hyalüronik asitin kimyasal yapısı [83]

Hyalüronik asit dolguları yapısal olarak hyalüronik aside çok benzemektedir. İnsan vücudunda doğal hyalüronidaz bulunduğundan çapraz bağlarla daha kararlı hale getirilen hyalüronik asit dolguları geliştirilmiştir [82]. 1,4-bütandiol diglisidil eter (BDDE) yaygın kullanılan çapraz bağlayıcıdır. Dolgunun özellikleri BDDE miktarı, BDDE ile tepkileşim zamanı ve tepkime ısı derecesi gibi faktörlere bağlıdır [84].

2.4.1. Hyalüronik Asit Dolgularının Üretim Süreci

Hyalüronik asit dolgular; ham hyalüronik asit tozu ile çapraz bağlayıcı karışımı kullanılarak hazırlanırlar. Üretim sırasında firmalar farklı imalat süreci, tepkime ısısı ve süresi, farklı ham ürünler ve farklı miktarda çapraz bağlayıcı kullanmaktadırlar [85]. Dolguların üretiminde farklı yöntemler kullanılır. Örneğin bazı ürünler 2-3 saat süre ile 50°C sıcaklıkta, bazıları ise 4 saatte 45°C sıcaklıkta üretilmektedir [86].

Üretim aşamasında önemli süreçlerden biri ham hyalüronik asidin sodyum hidroksitte (NaOH) çözünmesidir. pH<8.0 ortamda hyalüronik asitin karboksil zincirinin molekül yapısı değişerek ester bağı, pH>10.0 ortamda ise hidroksil zinciri eter bağı oluşturabilmektedir. Uygun ortamda oluşan bu eter bağı ile hyalüronik asit, çapraz bağlayıcı olan BDDE'ye bağlanır (Şekil 15). Oluşan bu bağın kuvvetli olması gerekir. Alkali olan NaOH insan vücuduna zararlı olduğundan işlem sonrası tüm yüzeylerin yıkanması gereklidir. Hyalüronik aside bağlanmamış, serbest halde kalan BDDE de işlem sonrası yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bu sebeple yıkama önemli bir işlemdir [84]. Dolgu maddelerinde kalan serbest BDDE kronik inflamasyona neden olmaktadır. Bu yüzden serbest kalan BDDE'nin dolgudan uzaklaştırılmaması büyük sorun oluşturur [85].



Şekil 15: Hyalüronik asidin BDDE ile çapraz bağlı hale gelmesi[83]

2.4.2. Hyalüronik Asit Dolgularının Özellikleri

Piyasada farklı yöntemlerle üretilen ve bu yüzden de farklı özellikleri olan yüzlerce dolgu ürünü mevcuttur.

2.4.2.1. Bifazik ve Monofazik Dolgular

Fazın tanımı "International Union of Pure and Applied Chemistry Gold Book" kitabına göre" kimyasal bileşim ve fiziksel duruma göre tek tip bir malzeme sisteminin varlığı" şeklindedir [87]. Bu tanıma göre bifazik bir malzeme kimyasal bileşim ve/veya fiziksel durum açısından homojen olmayan malzemedir. Bifazik bir malzeme iki veya daha fazla maddeden oluşan ve farklı bölgelerinde farklı kimyasal bileşenleri bulunan malzemedir. Böyle bir karışımın günlük yaşamdan bir örneği, sıvı yağ ve suyun karıştırıldığı salata sosudur. Yağ ve su birbirleri içinde çözünmedikleri için kâsede her zaman farklı bölgeleri dolduracaktır. Bazı yerlerde sadece yağ olacak, bazı yerlerde sadece su olacak. Bifazik bir sıvı/sıvı sistemi emülsiyon olarak adlandırılabilir. Bifazik bir malzeme, baştan sona aynı kimyasal bileşime sahip olmasına rağmen, iki farklı fiziksel durumdaki bir malzemeden de oluşabilir. Buna örnek buzlu sudur. Bifazik bir katı/sıvı sistem süspansiyon olarak adlandırılabilir [88]. Monofazik malzeme, bir malzemeden oluşabileceği gibi iki veya daha fazla bileşenin karışımından da oluşabilir. Örneğin tuzlu suda hem su hem de tuz vardır, ancak tuz suda eşit olarak dağıldığı için bileşim her yerde aynıdır ve bu nedenle tuzlu su monofazik bir malzeme olarak tanımlanmalıdır. Aslında, farklı konumlardaki bileşimin farklı olduğu kanıtlanamayan tüm malzemeler monofazik olarak kabul edilmelidir [88]. Hyalüronik asit dolgular her ne kadar daha öncesinde bifazik ve monofazik olarak sınıflandırılsa da bunun bilimsel olarak yanlış olduğu gösterilmiştir [88]. Farklı partikül boyutlarına sahip bifazik diye tabir edilen dolgular, yapılan kimyasal ve fiziksel testlere göre monofazik gibi davrandıkları tespit edilmiştir [88]. Daha önceki sınıflandırmaya göre bifazik dolgular, partiküllerinden dolayı daha yüksek G' (depolama modülü) değerine sahiptir. Monofaziklerde ise bu değer daha düşük, bağlama kapasitesi ise daha büyüktür.

2.4.2.2. Hyalüronik Asit Konsantrasyonu

Konsantrasyon, bir mililitre (ml) dolguda bulunan hyalüronik asit miktarını gösterir. Örneğin 20 mg hyalüronik asit içeren dolgunun konsantrasyonu 20 mg/ml'dir. Miktar yükseldikçe dolgunun sertliği ve dayanıklılığı da artar [85]. İnsan vücudunda bulunan hyalüronik asitin 5.5-6 mg'ı 1 ml suyu bağlar. Dolgular hazırlanırken bağlama kapasitesine göre konsantrasyonu ayarlanır. Eğer bu dengenin

üzerinde hazırlanırsa dolgu uygulaması sonrası daha fazla etraftan su bağlayacağı için kontrolsüz ödem gelişir. Dolgu uygulamasında görülen kontrollü ödemin sebebi konsantrasyona göre su bağlamasıdır [83].

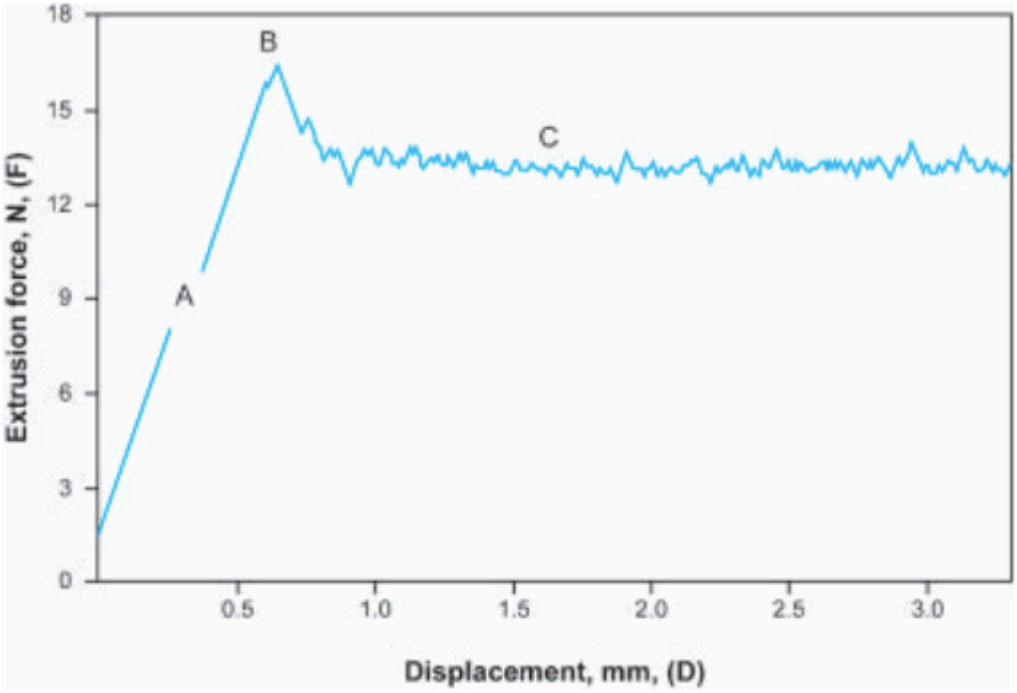
2.4.2.3. Partikül Boyutu

Jel partikül boyutu, hyalüronik asit dolgu maddelerinin kullanımını etkileyen bir diğer önemli özelliktir. Hyalüronik asit dolgu maddesi üretim sürecindeki çapraz bağlama adımı, jelatin hazırlanması gibi bir tozu sıcak su ile karıştırıp soğutulmasına benzer. Bu adımdan sonra büyük, bağlı bir jel kütlesi elde edilir. Bu büyük jel kütlesi daha sonra enjeksiyona izin vermesi için boyutlandırılmalıdır. Boyutlandırma, jel kütlesinin bir dizi elekten geçirilme işlemiyle gerçekleştirilebilir [83]. Bu yöntemle üretilen hyalüronik asit dolgu maddeleri, ortalama olarak istenilen boyutta jel parçacıkları içerir. Üretim sürecinde uygulanan özel eleme yöntemine göre farklı ortalama partikül boyutlarına sahip ürün elde edilebilir. Dolgu ürünleri için maksimum partikül boyutu vardır. Çünkü çok büyük partikül boyutlu ürünler enjektörden kolayca dışarı çıkmaz ve enjeksiyon sırasında iğneyi tıkayabilir [83].

Partikül boyutu ile dolgu maddesinin vücutta bozulma hızı arasında ilişki vardır. Büyük hyalüronik asit partiküllerinde, enzimler partikül içine kolayca nüfuz edemez. Enzimlerin onları parçalaması için hacimlerine kıyasla sınırlı yüzey alanı vardır. Daha küçük hyalüronik asit parçacıkları, enzimlerin onları daha kolay parçalayabilmeleri için daha geniş yüzey alanı sunar [83]. Partikül boyutu ne kadar küçükse hyalüronik asit dolgusu o kadar hızlı bozulur. Küçük partikül boyutlu dolgular dermise, büyük partikül boyutlu dolgular ise subkutan doku ya da daha derin dokulara uygulanması önerilir.

2.4.2.4. Enjeksiyon Kuvveti (Püskürme Kuvveti)

Enjeksiyon kuvveti dolgunun ne kadar rahat enjekte edilebildiğini gösteren bir parametredir. Enjeksiyon kuvvetinin belirlenmesi için standart çaplı iğneler kullanılır. Ölçüm makinesinde elde edilen güç (N)/mm grafiğinde, ulaşılan plato seviyesi dolgunun yoğunluğuna bağlıdır (Şekil 16). Burada görülen en yüksek nokta verim noktası olarak isimlendirilir. İlk başta görülen yükselişteki eğrinin eğimi ise jelin sertliği ile ilgilidir [83].



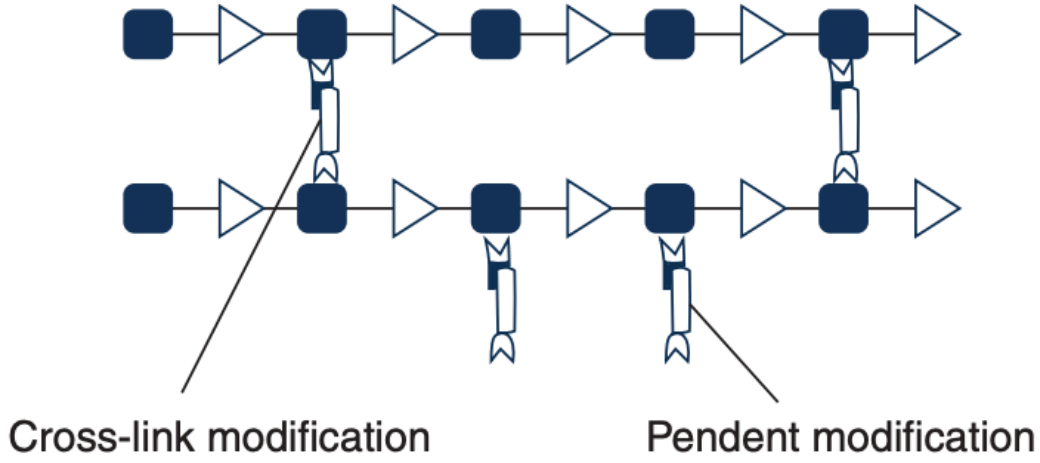
Şekil 16: Enjeksiyon kuvveti ölçüm grafisi [83]

Verim noktasından sonra ani, hızlı, yüksek miktarda dolgu uygulaması sonucu vasküler bası komplikasyonları gelişebilir. Plato döneminde inişli çıkışlı bir grafik, partikül boyutlarının eşit olmadığı dolgularda görülür.

Küçük çaplı enjektör ya da kanül kullanıldığında daha yüksek güç uygulamak gerekir. Buna bağlı oluşacak yüksek basınç ciddi damar hasarına neden olabilmektedir [85]. Küçük çaplı enjektör kullanımı damar yaralanma riskini azaltsa da olası bir damar yaralanmasında, yüksek basınçtan dolayı ciddi emboli riski oluşmaktadır. Büyük çaplı enjektörlerde ise damar içi enjeksiyon riski daha yüksektir. Ancak basınç dağılacağı için emboli riski daha düşüktür [85].

2.4.2.5. Çapraz Bağlanma Oranı (Modifikasyon Derecesi)

Hyalüronik asit dolguları üretilirken çapraz bağ oluşturma aşamasında kullanılan BDDE'nin fazla miktarda kullanımı sonucu daha fazla çapraz bağ elde edileceği için daha dayanıklı ve sert dolgular elde edilmektedir. Çapraz bağ sürecinde BDDE hyalüronik asit zincirlerine iki uçtan (bilateral) bağlanır (Şekil 16). Bu şekildeki modifikasyona çapraz bağlı modifikasyon denir. BDDE'nin tek uçtan bağlanan tipide mevcuttur. Bu tür tek taraflı (unilateral) bağlanmaya asılı modifikasyon ya da sarkan modifikasyon denir [85] (Şekil 17). Asılı modifikasyon dolgu üretimde yararsızdır.



Şekil 17: BDDE'nin çapraz bağlı ve asılı modifikasyonlarının şematik görünümü [85]

Modifikasyon derecesi dolgu materyalinde hem asılı tipi hem de çapraz bağlı tipi gösteren parametredir. Bu parametre nükleer manyetik rezonans, kütle spektrometresi, boyut dışlama kromotografisi kombinasyonları ile hesaplanmaktadır. Yüksek modifikasyon derecesine sahip ve yüksek asılı tip modifikasyonu bulunan dolgularda komplikasyon gelişme riski yüksektir [85]. Bir diğer çapraz bağlayıcı olarak kullanılan bileşik divinil sulfondur. Ancak toksik madde olduğu için günümüzde çok nadir kullanılmaktadır.

2.4.2.6. Reoloji

Reoloji dolgunun özelliklerini değerlendiren objektif bir metotdur. Aynı zamanda reoloji sıvıların yoğunluk, elastisite, plastisite, tiksotropi ve yapışkanlık özelliklerini inceleyen bilim dalıdır [89]. Katı bir cismin basınç altında, elastik özelliği sayesinde kalıcı deformiteye uğrayabilme yeteneğine plastisite denir. Bazı maddelerin, karıştırıldığında sıvı haline gelme, bekletildiğinde ise yarı katı hale dönüşebilme özelliğine tiksotropi denir [90]. Hyalüronik asit dolgular enjektördeyken jel halde enjeksiyon sırasında ise sıvı halde bulunur. Dolgu reolojisinin başlıca parametreleri elastik modülü, yoğunluk modülü, kompleks yoğunluk, tanjant delta, faz açısı ve elastisitedir [85], [89], [91].

- G′ (elastik modülü, depolama modülü, deformasyona direnç): Deformasyon sırasında jel tarafından depolanan ve daha sonra orijinal şekli geri kazanmak için kullanılan G*'nin enerji fraksiyonunu temsil eder. G', bir jelin elastik davranışını veya kayma deformasyonundan sonra şeklini ne kadar geri kazanabileceğini ölçer. Örneğin, vulkanize kauçuk, gerilim altında anında deforme olduğundan ve gerilim kaldırıldıktan sonra şeklini tamamen geri kazandığından (yani, G* ≈ G′) tamamen elastik bir malzemedir [91]. G′ değeri arttıkça deformasyon riski azalır.
- G″ (kayıp modülü, viskoz modül): İç sürtünme yoluyla kesme deformasyonunda kaybedilen G*'nin enerji fraksiyonunu temsil eder. Hyalüronik asit dolgu maddesi tamamen viskoz olmadığı için G" doğrudan viskozite ile ilgili değildir. Bunun yerine, bu terim, kayma gerilimi kaldırıldıktan sonra jelin şeklini tamamen geri kazanamaması durumunu yansıtır [91].
- G* (kompleks modül): malzemeyi kesme gerilimi kullanarak deforme etmek için gereken toplam enerjidir. Bu terime yaygın olarak dolgu maddesi "sertliği" denir ve tek bir çapraz bağlı dolgu biriminin şeklini değiştirmenin ne kadar zor olduğunu gösterir. G*, tüm jel tortusunun sertliğini değil, birden fazla çapraz bağlı HA biriminin "sertliğini" yansıtır [91]. Şu formülle hesaplanır: $G^* = \sqrt[2]{(G')^2 + (G'')^2}$

- Tan δ (tanjant delta): Malzemenin esnekliğini ifade eder. G*'nin viskoz bileşenlerinin elastik bileşenlerine oranının bir ölçüsüdür, G′/ G″ ile hesaplanır. Tan δ, malzemenin esas olarak elastik olup olmadığını (tan δ<1), jel benzeri bir davranış sergileyip sergilemediğini veya esas olarak viskoz olup olmadığını (tan δ>1) belirler. Çapraz bağlı hyalüronik asit dolgu maddelerinde, tan δ genellikle düşüktür (0,05 ile 0,80 arasında değişir), bu da düşük kesme gerilimi altındaki elastik (yani jel benzeri) davranışın viskoz (yani sıvı) davranışa baskın olduğu anlamına gelir. Düşük tan δ genellikle daha yüksek G' ile ilişkilidir, çünkü hyalüronik asit dolgular her zaman düşük G' değerine sahiptir [91].
- Faz açısı: Bu değer tan δ değerinin açı değerine dönüştürülmesi ile hesaplanır. Örneğin "tan δ=1" olduğunda " faz açısı=90°" olur [85].

2.5. Hyalüronik Asit Dolgu Uygulama Komplikasyonları ve Tedavileri

Hyalüronik asit dolgularının komplikasyon insidansının düşük ve yan etkilerin çoğu hafif olmasına rağmen, işlem sayısındaki artış, komplikasyon sayısında eş zamanlı artışa neden olmuştur [92].

Komplikasyonlar hastayla ilişkili, üretime dayalı ve uygulanan prosedürle ilişkili nedenlere bağlı olarak gelişebilir, ancak çoğunlukla multifaktöriyeldir [93].

Dolgu komplikasyonları; şiddetine göre (hafif, orta veya şiddetli), doğasına göre (iskemik ve iskemik olmayan komplikasyonlar) veya başlangıç zamanına göre (erken veya geç) sınıflandırılabilir [94]. Başlangıç zamanına göre yapılan sınıflandırma altta yatan potansiyel etiyoloji ile korelasyon içinde olmasından dolayı bu şekilde sınıflandırma daha doğru olacaktır [95]. Buna göre komplikasyonlar ani başlayan (işlemden sonra ilk 24 saatte), erken başlayan (24 saatten 4 haftaya kadar), ve geç başlayan (4 haftadan sonra) olmak üzere sınıflandırılabilir [93].

Dolgu komplikasyonlarının yönetimi ile ilgili son yıllarda çokça makaleler ortaya çıkmasına rağmen estetik alanında optimal komplikasyon yönetimi için bir kılavuz halen bir ihtiyaç olmaya devam etmektedir.

2.5.1. Ani ve Erken Başlayan Dermal Dolgu Komplikasyonları

Hyalüronik asit dolgusu uygulamalarına bağlı ani ve erken başlayan komplikasyonlar içinde; morarıklık ve ekimoz, şişlik ve ödem, eritem, enfeksiyon, herpetik aktivasyon, disestezi, parestezi, anestezi, topaklanma ve yumrular, vasküler komplikasyonlar görülür [93].

2.5.1.1. Morarıklık ve Ekimoz

Tüm dolgu maddeleri morarıklık yapma potansiyeline sahiptir [96]. En sık görülen minör komplikasyondur. Kılcal damar rüptürü ve kan durgunluğu morarmanın asıl sebebidir. Fanlama ve iplik geçirme teknikleri kullanılarak dermal ve subdermal düzlemlere yapılan enjeksiyondan sonra morarma daha sık görülür [93].

İşlem sonrası soğuk kompres, arnika, aloe vera veya K vitamini kremleri ile morarıklık tedavi edilebilir [97]. Dolgu yavaşça enjekte edilerek morarıklık riski azaltılabilir. Eğer morarma görülürse kompres ile bastırılarak azaltılabilir [92]. Nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar, birçok vitamin ve bitkisel takviyeler, antitrombosit ve antikoagülasyon ilaçları da dahil olmak üzere, dolgu uygulamasından 7-10 gün önce (tedavi eden hekime danışılarak) morarma riskini azaltmak için kesilmesi önerilir [97], [98]. Morarıklık riskini azaltmak için oral antikoagülan alan hastalara fazladan özen gösterilmesi önerilir [93]. Antikoagülan tedavi iyi dengelenmişse, tedavi bırakıldığında; antikuagülan ilişkili hastalığın riski, kanama/morarma riskinden daha fazladır.

2.5.1.2. Şişlik ve Ödem

İşlemden hemen sonraki dönemde bazı geçici şişlikler normaldir ve tüm dolgu maddelerinde görülür, ancak kullanılan spesifik ürüne bağlı olarak zamanlama ve şiddet değişebilir [96], [97] . Enjeksiyon hacmi ve tekniğinin yanı sıra dermografizm gibi hasta faktörleri de şişlik miktarını etkileyebilir. En sık etkilenen bölgeler dudaklar ve periorbital bölgedir. Uzun süreli dudak büyütme işlemi olan hastalarda dudaklarda geçici bir şişlik meydana gelebilir. Bu şişlik son derece nadir görülen, bir antikor aracılı ödem olan anjioödem ile karıştırılmamalıdır [99]. Dolgu maddeleri esasen yabancı cisimler olduğundan, bazı hastalarda immünoglobulin E (IgE) aracılı immün

yanıta (Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonu) bağlı aşırı duyarlılık gelişebilir. Anjioödem, maruziyetten saatler sonra ortaya çıkar, ancak reaksiyonlar şiddetli olabilir ve birkaç hafta sürebilir [100]. Bu anjioödem genellikle birkaç gün içinde antihistaminikler ve/veya oral steroidlerle azalır. Olası enfeksiyonu dışlamak için hasta yakından izlenmelidir. Ek olarak, tipik olarak enjeksiyondan 1 gün sonra ortaya çıkan gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonları; endürasyon, eritem ve ödem ile karakterizedir. Bu immun yanıt antikorlardan ziyade T lenfositleri aracılı immun yanıttır. Gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonları, antihistaminiklere yanıt vermez. Hyalüronik asit dolgu enjeksiyonuna bağlı böyle bir durumunda, hyalüronidaz ile tedavi gerekir.

Ödem ve şişliğin tedavisinde soğuk kompresler, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar ve arnica faydalıdır [93].

2.5.1.3. Eritem

Enjeksiyondan hemen sonra bir miktar cilt kızarıklığı normaldir. Eritem birkaç günden fazla devam ederse, aşırı duyarlılık reaksiyonu olasıdır. Rozasea tedavisi, oral tetrasiklin veya izotretinoin dahil olmak üzere etkili olabilir. Kalıcı eritem için orta kuvvette bir topikal steroid ilave tedavi olarak tavsiye edilmektedir [96]. Atrofiye ve telenjiektazilere neden olabileceğinden, yüksek potensli steroidlerin uzun süreli kullanımından kaçınılmalıdır. Lazerler, telenjiektazi ve eritem tedavisinde etkili olabilir. K vitamini kremi, yüzdeki morluklara ek olarak eritemin çözülmesini hızlandırmada faydalıdır [101]. Rozasea hastalarında enjeksiyon sonrası eritem gelişme riski normal popülasyona göre daha yüksektir ve prosedüre başlamadan önce hastalar bu konuda uyarılmalıdır [96].

2.5.1.4. Enfeksiyon

Cildin yüzey bütünlüğünü bozan herhangi bir prosedür, enfeksiyon riski taşır ve dolgu maddelerinin enjekte edilmesi de buna örnektir. Enjeksiyon bölgesinde akut inflamasyon veya apse olarak görülen akut enfeksiyonlar tipik olarak ciltte bulunan Staphylococcus aureus veya Streptococcus pyogenes gibi yaygın patojenlerden kaynaklanır [93]. Tedavi edilmezse, özellikle yaşlı kişilerde veya bağışıklık sisteminde çeşitli seviyelerde yetmezliği hastalarda sepsise yol açabilir. Hafif formlar

oral antibiyotiklerle tedavi edilebilirken, daha ciddi formlarda intravenöz antibiyotik ve hastaneye yatış gerekebilir [102].

2.5.1.5. Herpes

Dolgu enjeksiyonları, herpes virüsü enfeksiyonunun yeniden aktivasyonuna yol açabilir. Herpetik nükslerin çoğu perioral bölgede, nazal mukoza ve sert damak mukozasında görülür [23], [92], [96]–[98]. Herpese bağlı şiddetli uçuk öyküsü (3 ataktan fazla) olan hastalarda, hassas bölgelere enjeksiyon planlandığında tedaviden önce profilaktik olarak herpese yönelik antiviral reçete edilmelidir (örn: Valasiklovir 1 g/24 saat dolgu enjeksiyonundan 1 gün önce ve 3 gün sonra) [93]. Ek olarak, aktif herpes lezyonları olan hastalarda, enjeksiyonlar atak tamamen geçene kadar ertelenmelidir.

2.5.1.6. Disestezi, Parestezi ve Anestezi

Estetik bir işlem sırasında sinir hasarı çok nadir de olsa direkt travma, sinire dolgu enjeksiyonu, ürünün dokuya baskı yapması gibi farklı sebepler sonucunda ortaya çıkabilir. Sinir hasarı geçici, geri dönüşümlü veya kalıcı olabilir. Disestezi, parestezi ve anestezinin en sık görüldüğü yer infraorbital sinirdir. Daha seyrek olarak, geçici Bell paralizisi veya marjinal mandibular sinir disfonksiyonu görülür. Bu durum birkaç hafta sürebilir [92], [96], [97]. Bell paralizisi olan hastaların %71'inde tam ve spontan düzelme görülse de kalan %29'unda ömür boyu kalıcı hemifasiyal zayıflık gelişir. Bell paralizinin akut tedavisinin temel dayanağı, kısa süreli yüksek doz (örn: 1 mg/kg) oral steroidlerdir [103]. Tedavi için ek olarak meatal segmentin cerrahi dekompresyonu, antiviral tedavi, elektroterapi, fizik tedavi ve akupunktur önerilmiştir. Ancak kanıtlar kullanımlarını desteklememektedir [103].

2.5.1.7. Topaklanmalar ve Yumrular

Topaklar ve yumrular, dolgu enjeksiyonlarıyla ilişkili en yaygın komplikasyonlardan biridir [97]. Tiplerine (inflamatuar olmayan, inflamatuar veya enfeksiyöz) ve çıkış zamanlarına (erken, geç veya gecikmiş) göre sınıflandırılabilirler [95]. Birkaç nedenden kaynaklanabileceklerinden dolayı tanı koymak için sorgulama yapılması gerekebilir. Genel bir kural olarak, günler veya haftalar içinde ortaya

çıkanlar ağrısız olma eğilimindedir ve büyük olasılıkla aşırı dolgu kullanımı, yüzeyel uygulama, endikasyon için yanlış ürün gibi optimal olmayan tekniklerin sonucunda gelişirler [104]. Uygulama sonrası erken dönemde oluşan topaklar masaja yanıt verebilir [93]. İnflamasyona bağlı oluşanlarda, inflamasyon geriliyorsa düzeltmeye gerek olmaz. İnflamatuar olmayanlarda aşırı uygulamayı düzeltmek için aspirasyon, drenaj, hyalüronidaz uygulamak gerekebilir [93]. İnflamasyon sonrası hiperpigmentasyonu tedavi etmek için ise lazer, güneşten koruma veya depigmentasyon kremleri önerilebilir.

2.5.1.8. Vasküler Komplikasyon

Dolgu enjeksiyonundan sonra gelişebilecek vasküler komplikasyon, ciddi ve ani bir komplikasyondur. Genel olarak 3 farklı mekanizma ile gelişir. Bunlar eksternal vasküler kompresyon, vasküler spazm ve intravasküler embolizasyon olarak sayılabilir [105]. Vasküler bir olayın tanınması ve potansiyel olarak geri dönüşü olmayan komplikasyonlardan kaçınmak için hızlı ve agresif tedavi gereklidir [106], [107]. Vasküler tıkanıklığın iki ana tanısal semptomu ağrı ve cilt rengindeki değişikliklerdir. Arter tıkanıklığında ani, şiddetli ağrı ve renk değişiklikleri (beyaz noktalar) görülürken, ven tıkanıklığında daha az şiddetli, donuk veya gecikmiş ağrı görülebilir ya da bazı durumlarda ağrı olmayabilir [104]. Vasküler komplikasyonlar, diğer komplikasyonlara kıyasla çok sık görülmeyen olaylar olduğundan, önleme ve tedavi için mevcut öneriler neredeyse tamamen uzman görüşüne ve fikir birliği raporlarına dayanmaktadır [93], [96]–[98], [108], [109].

Vasküler komplikasyondan şüphelenildiğinde, enjeksiyonun hemen durdurulması ve tedaviye hızla başlanması çok önemlidir. Tedavide amaç, etkilenen bölgeye kan akışını kolaylaştırmaktır. Tedavi stratejileri arasında hyalüronidaz enjeksiyonu, sıcak kompres uygulama, bölgeye masaj yapma ve vazodilatasyonu desteklemek yer alır [104], [110], [111]. Hyalüronidaz, kullanılan dolgu maddesine bakılmaksızın hemen enjekte edilmelidir. Semptomların mevcut olduğu durumlarda günlük olarak liberal dozlarda uygulanmalıdır. İntravasküler enfarktüs için yüksek dozlarda hyalüronidaz (200-300 U) önerilmiştir. Akut iskemiyi tedavi etmek için hyalüronidaz, sadece hyalüronik asit uygulanan bölge değil, tüm iskemik alana enjekte edilmelidir. İyileşme yoksa işlem klinik düzelme sağlanana kadar saatlik olarak

tekrarlanmalıdır. Vasküler bozukluğu tersine çevrilmek için 1500 IU'ya kadar dozlar gerekebilir [97], [98], [109]. İntravasküler enjeksiyon riski azaltmak için kullanılacak stratejiler aşağıda sıralanmıştır [93].

a. Enjeksiyondan önce aspirasyon uygulamak

b. Yüksek riskli alanlarda daha düşük hacimde seri enjeksiyonların yapılması

c. Bir seferde bir tarafı uygulama yapmak

d. Ana arterlerin dalların yüzeyinde daha fazla alan sağlamak için cildi sıkıştırmak/çadırlamak

e. Baskın olmayan parmakla supratroklear damarların orijininin manuel olarak tıkanmak

f. Künt kanüller kullanmak

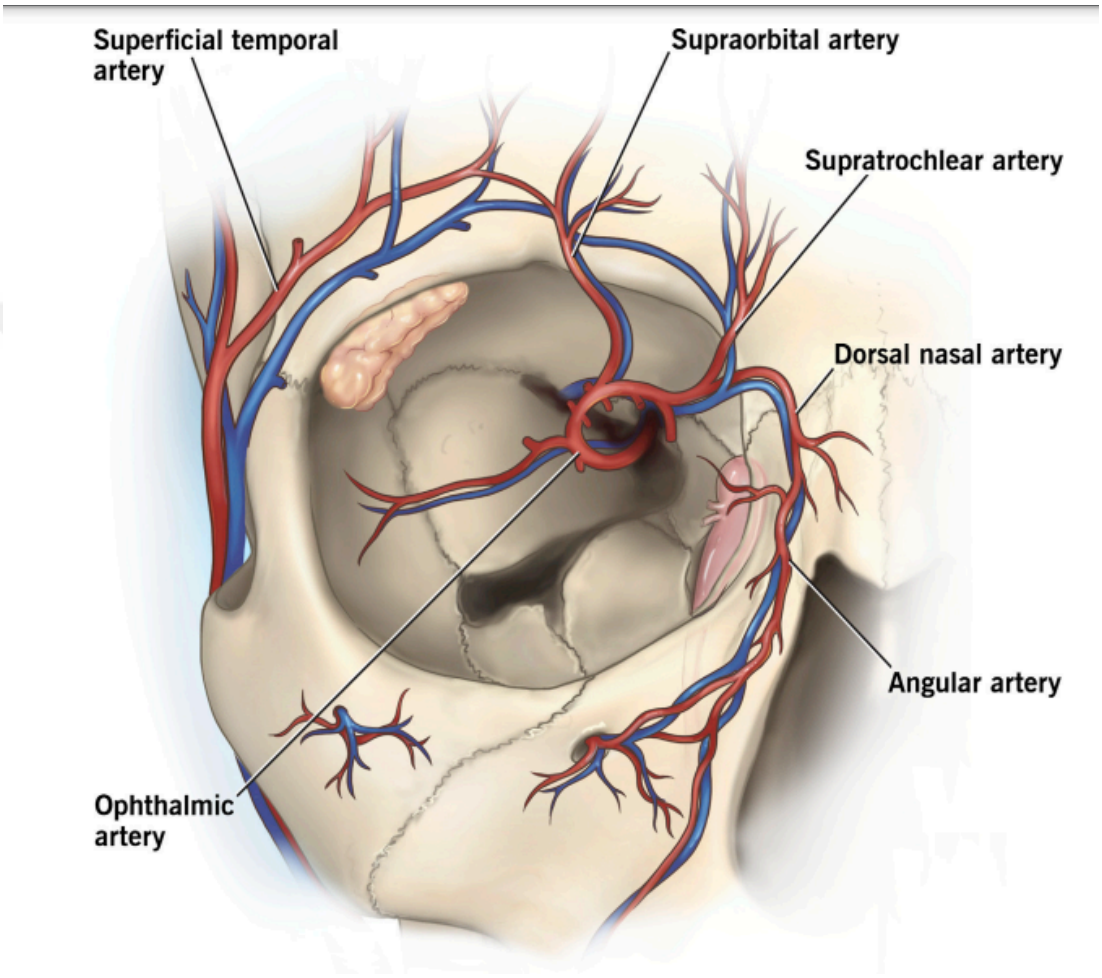
Bu stratejiler vasküler komplikasyon riskini azaltabilir ama kesinlikle bu riski ortadan kaldırmaz. Bu tür komplikasyonların görülme sıklığını en aza indirmek için çok iyi bir yüz anatomisi bilgisine sahip olmak çok önemlidir [93].

2.5.1.8.1. Retinal Arter Tıkanıklığı

Santral retinal arterin (SRA) veya bazı dallarının tıkanmasına bağlı görme kaybı, otolog yağ, hyalüronik asit veya kollajen gibi yumuşak doku dolgu maddeleri ile yapılan estetik bir prosedürden sonra ortaya çıkabilen nadir fakat katastrofik bir komplikasyondur [112]. Literatür incelendiğinde 2018 yılına kadar bildirilmiş 146 adet olgu bulunmaktadır [113]. Yüksek komplikasyon riski ile tanımlanan enjeksiyon bölgeleri glabella (%38.8), nazal bölge (%25.5), nazolabial kıvrım (%13.3) ve alın bölgesidir (%12.2) [114]. Dolgu türü ile ilgili olarak, otolog yağ en yaygın neden olan materyal iken (%47.9), bunu hyalüronik asit (%23.5) izlemektedir [114].

Dolgu kaynaklı görme kaybının ana mekanizması, dolgu maddesinin vasküler yollarla oftalmik arterin embolizasyonuna yol açan, doğrudan intraarteriyel dolgu enjeksiyonundan kaynaklanmaktadır. Arter basıncını ve viskoz akıştan kaynaklanan sürtünme kuvvetlerini aşan basınçlarda enjekte edilen dolgu, oftalmik arter embolizasyonuna neden olabilir. Yeterli basınçla, dolgu malzemesi başlangıçta damar içinde retrograd olarak hareket eder. Daha sonra enjeksiyon basıncının düşmesinden dolayı dolgu malzemesi kan akışı ile anterograd bir yönde hareket eder ve oftalmik

arter dolaşımı bozacak şekilde emboli oluşturur [113]. Oftalmik arterin ana dalları supratroklear, supraorbital, dorsal nazal, lakrimal, etmoidal, palpebral, musküler, posterior siliyer ve santral retinal arterdir. Fasiyal arter, angular arter yoluyla oftalmik arter ile anastomoz yapabilir (Şekil 18).



Şekil 18: Sağ Orbitanın vasküler anatomisi [113]

Kadavra çalışmasında, tüm kadavralarda supratroklear, supraorbital ve dorsal nazal arter doğrudan oftalmik artere bağlı olduğu ve angular arter %54 oranında oftalmik arterle anastomoz yaptığı bulunmuştur [115]. Bu arterler oftalmik artere, yüzün diğer arterlerine göre daha doğrudan yollar sunabilse de oftalmik arter ile yüz arterleri arasında birçok anastomoz vardır. Bu nedenle yüzün hemen her bölgesindeki bir dolgu uygulamasının görmeyi tehdit eden komplikasyon oluşturma riski vardır [114]. Görme kaybının derecesi, oftalmik arter içindeki tıkanıklık düzeyine bağlıdır

ve muhtemelen dolgunun partikül boyutu ile ilişkilidir. Oftalmik arterin çapı yaklaşık 2 mm, santral retinal arterin ise yaklaşık 160 μm'dir. Dolgu ürünü damardan daha büyükse, ileri yönde iskemi meydana gelir. Dolguya bağlı görme kaybında en sık görülen tıkanıklık tipi oftalmik arter tıkanıklığı olup, bunu santral retinal arter tıkanıklığı ve retina arter dal tıkanıklığı takip eder. Oftalmik arter tıkanıklığı sadece santral retinal arterde değil, aynı zamanda uç dalların (siliyer arterler) tıkanmasına da neden olur. Bunu bağlı olarak pitoz, oftalmopleji ve ön segment iskemisi ile sonuçlanabilir [113], [116]. Dolgu kaynaklı görme kaybı yaşayan vakalarda, dolgu embolizasyonu muhtemelen oftalmik arterin ötesinde birçok arterde gerçekleşir. Cho ve arkadaşlarının kadavra başı perfüzyon modelinde, supratroklear arter enjeksiyonu sonrası oftalmik artere ek olarak dorsal nazal ve supraorbital arterde de dolgu görülmüştür [117]. Bu da dolguya bağlı görme kaygı gelişenlerde görülen cilt nekrozu bulgularının nedenini açıklar.

Estetik bir işlem için uygulanan hyalüronik asit dolgu uygulamalarında iskemi ve görme kaybı gibi komplikasyonların gelişmesi, durumu katastrofik hale getirmektedir. Göz görmeyle ilişkili duyu organımız olmakla birlikte ışık algılama ile ilgili reseptörlerin bulunduğu retina kısmı vasküleritesi yüksek ve iskemiye toleransı düşük bir tabakadır. Aynı zamanda yüz bölgesinde gelişebilecek iskemiye bağlı cilt ve ciltaltı doku nekrozu deformite ve kalıcı ize neden olacaktır. Bu sebeple kalıcı hasara sebebiyet vermemek için erken müdahale önemli yer tutmaktadır. Arteriyel iskemiye bağlı görme kaybı ve diğer komplikasyonlarda literatür araştırıldığında, uzman görüşü niteliğinde çeşitli tedavi modaliteleri bulunmaktadır [93]. Bunlar arasında hyalüronidaz uygulamaları (intravenöz veya retrobulber enjeksiyon şeklinde), ürokinaz gibi trombolitik ajanlar, antiagregan ilaçlar, fosfodiesteraz inhibitörleri, nitrik oksit döngüsü üzerinden vazodilatasyon yapan ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri bulunmaktadır [93], [113], [118]–[121]. Dolgu uygulamaları milyarlarca dolarlık bir endüstridir ve her geçen gün büyümektedir. Bu kadar büyük bir uygulama alanı ve sıklığı bulunan hyalüronik asit dolgu uygulamalarının komplikasyonları da az görülmemektedir. Artan uygulamaya bağlı olarak sıklığı da artacaktır.

2.5.2. Geç Başlayan Dermal Dolgu Komplikasyonları

Hyalüronik asit dolgusu uygulamalarına bağlı geç başlayan komplikasyonlar içinde; morarıklık, ödem, ciltte renk değişikliği, enfeksiyon, nodül formasyonu görülür [93].

2.5.2.1. Morarıklık

Morarma genellikle erken başlangıçlı bir komplikasyon olmasına rağmen, nadir de olsa kalıcı lekelenme ortaya çıkabilir. Ebat olarak büyük veya kozmetik olarak rahatsız edici bu gibi purpuralarda, iyileşmeyi hızlandırmak için PDL (Pulsed Dye Light-Darbeli Boya Işığı) veya potasyum titanil fosfat lazerleri gibi vasküler lazerler kullanılabilir [96], [97].

2.5.2.2. Ödem

Anjioödem: Anjioödem tipik olarak erken başlar; ancak 6 haftadan uzun süren ataklar görülebilir. Bu vakaların tedavisi genellikle zordur ve ilaca verilen yanıt değişkendir. Terapötik yaklaşıma basamaklı şekilde uygulanır, yetersiz yanıt alınırsa bir sonraki adıma geçilir. Ödem, etkili olan en küçük oral steroid dozu ile kontrol edilmelidir [96]. Topikal veya lezyon içi steroidler veya immünsupresif ajanlar dahil olmak üzere ileri tedavi seçenekleri önerilmiştir [92].

Antikor Aracılı Olmayan (Gecikmiş) Ödem: Endürasyon, eritem ve ödem ile karakterize gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonları genellikle enjeksiyondan 1 gün sonra ortaya çıkar, ancak enjeksiyondan birkaç hafta sonra görülebilir ve aylarca sürebilir [122]. Bu reaksiyonlarda antihistaminikler etkili değildir. En iyi yaklaşım alerjeni vücuttan uzaklaştırmaktır. Hyalüronidaz ile tedavi de mümkündür. Diğer dolgu maddelerinde, dolgu emilene kadar steroid tedavisi, lazer tedavisi ve/veya ekstrüzyon gerektirebilir [123]. Son çare olarak eksizyon yapmak gerekebilir [93].

Malar Ödem: Malar ödem, infraorbital çukura ve gözyaşı oluklarına enjekte edildiğinde tüm dolgu uygulamalarında sıklıkla bildirilen ciddi bir komplikasyondur [124]. Malar ödem fenomeni, alt göz kapağının anatomisiyle alakalıdır. Dolgu maddesi ya malar septumun geçirimsiz bariyerini arttırmasından dolayı lenfatik drenajı engelleyerek ya da enjeksiyon hacminin çok büyük olmasından dolayı

lenfatiklere doğrudan baskı yaparak ödeme neden olabilir [124]. Malar ödem uzun sürelidir ve tedaviye kötü yanıt verir. Terapötik uygulamalar arasında baş elevasyonu, soğuk kompres uygulama, günlük manuel kompresyon uygulama, lenfatik drenaj mesajı ve metilprednizolon uygulaması yer alır. Hyalüronidaz ile dolgu hacmini azaltma da uygulanabilir [124]. En iyi önleyici yaklaşım, daha az dolgu hacmi ve dolguyu hemen periost öncesi seviyede, malar septumun derinliklerine uygulamaktır [124].

2.5.2.3. Ciltte Renk Değişikliği

Neovaskülarizasyon: Doku genişlemesine ve masaja bağlı gelişen doku travması, yeni kılcal damarların oluşmasını tetikler. Ayrıca bu damarların görünümünü de kolaylaştırabilir. Bu yeni damarlar işlemden günler veya haftalar sonra ortaya çıkabilir, ancak tedavi gerekmeksizin 3-12 ay içinde kaybolmalıdır. Lazer tedavisinin, iyileşmesi geciken bu durumlarda etkili olduğu gösterilmiştir [93].

Hiperpigmentasyon: Hiperpigmentasyon, dolgu uygulaması sonrası, özellikle Fitzpatrick cilt tipleri IV-VI olan kişilerde daha sık görülmekle birlikte tüm cilt tiplerinde de görülebilir [125], [126]. Bu sorunu yönetmek için ilk yaklaşımı topikal hidrokinon (%2–8) ve Retin-A (tretinoin) gibi renk açıcı uygulamalara ek olarak geniş spektrumlu güneş koruyucu uygulaması yapılabilir [96]. Dirençli postinflamatuar hiperpigmentasyon durumlarında kimyasal peeling de kullanılabilir. Bu uygulamaların da başarısız olması durumunda, bir sonraki aşama olarak IPL (Intense Pulsed Light-Yoğun Atımlı Işık), PDL (Pulsed Dye Light-Darbeli Boya Işığı) veya fraksiyonel lazer kullanılabilir [96], [126].

Tyndall Etkisi: Partiküllü hyalüronik asit dolgu maddeleri yüzeyel dermise veya epidermise uygunsuz bir şekilde enjekte edildiğinde, "Raleigh saçılması" veya "Tyndall etkisi" olarak adlandırılan mavimsi bir renk tonuna neden olur [127]. Herhangi bir işlem uygulanmazsa uzun yıllar kalabilir [97]. Tedavide ilk tercih hyalüronidaz olmalıdır. Hyalüronidaza iyi yanıt alınamayan hastalar için, küçük çaplı bir iğne veya cerrahi bisturi ile dolgu drene edilerek dispigmentasyon tedavi edilebilir [93], [128], [129].

2.5.2.4. Enfeksiyon

Genellikle enjeksiyondan 2 hafta sonra veya daha sonra gelişen geç başlangıçlı kronik enfeksiyonlar, daha geniş bir alanı etkileme eğilimindedir. Etken, atipik bir organizma (Mikobakteri, Escherichia coli vs.) olabilir. Bu etkenler tanı ve tedavisi zor olan enfeksiyona ve kronik bir inflamatuar yanıta neden olurlar [93]. Akut enfeksiyondakine benzer tedavi uygulanmalıdır. Enfeksiyon türünü tespit etmek ve antibiyogram uygulamak için bakteri kültürü ve klinik değerlendirme yapılmalıdır. Enfeksiyon durumunda steroid kullanımından kaçınılması gerektiği için hipersensitivite ile ayırıcı tanı yapılması önemlidir. Antibiyogram sonuçlanana kadar Atipik etkenlere ve kronik enfeksiyon yapan etkenlere yönelik ampirik antibiyoterapi başlanmalıdır [93].

2.5.2.5. Nodül Formasyonu

Nodüller, dermal dolgu maddelerinin kullanımından kaynaklanan yaygın komplikasyonlardır. İnflamatuar veya noninflamatuar olarak sınıflandırılır.

İnflamatuar Nodüller: Geç başlangıçlı nodüller genellikle inflamatuardır (dolgu malzemesine karşı bağışıklık tepkileri) ve/veya biyofilm ile ilişkilidir [130], [131]. Biyofilm, bakterilerin kendi salgıladıkları yoğun polimerlerle kendilerini çevreleyerek oluşturduğu, paketlenmiş bakteri topluluğudur. Biyofilm doğada yaygın bulunur. Dolgu uygulamasına bağlı gecikmiş inflamatuar komplikasyon gösteren hastalarda, kültür testi sıklıkla negatif olmasına karşın, biyopsilerde bakteriler saptanabilmektedir [132]. Bu nedenle, biyofilmden şüphelenilen geç başlayan nodül formasyonu görülen hastalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya floresan in situ hibridizasyon (FISH) testleri gibi moleküler tekniklerin kullanılması önemlidir [130]. Bakteriyel biyofilmden kaynaklanan inflamasyonu, düşük dereceli aşırı duyarlılık reaksiyonundan ayırt etmek son derece zor olabilir. Birçok bakteri türü biyofilm oluşturur ve biyofilmler kalınlaştıkça antibiyotik ve kültüre karşı daha dirençli hale gelirler. Tedavisi zor olsa da en hızlı ve etkili tedavi dolgu maddesinin çıkarılmasıdır. Hyalüronik asit dolgularda hyalüronidaz kullanılabilir. Hyalüronidaz enfeksiyonun yayılmasına neden olabileceği için kullanılırken son derece dikkatli olunmalıdır. Selülit gibi aktif enfeksiyon varlığında kullanılmamalıdır [108]. Diğer tedavi edici ajanlar arasında 5-FU (5- fluorourasil), PRP (Platelet Rich Plasma-

Trombosit Zengin Plazma) ve ampirik antibiyotik bulunur [93]. 5-FU'nun terapötik başarısının nedeni bilinmemekle birlikte, biyofilm oluşumunu engelleyen düzenleyici bir gen olan AriR geni ile etkileşime girdiği öne sürülmüştür [133]. PRP; antimikrobiyal etki, hyalüronik asidin bozulmasını hızlandırma etkisi ve biyofilmi yok etme etkisi olmak üzere üç farklı mekanizmayla etki gösterir [134], [135].

Noninflamatuar Nodüller (Yabancı Cisim Granülomları): Yabancı cisim granülomları, olağan mekanizmalarca parçalanamayan bir yabancı cisme tepki olarak vücudun bağışıklık sistemi tarafından oluşturulur. Tüm dolgu maddelerinde ortaya çıkabilmelerine rağmen, insidans çok nadirdir ve genellikle uygulamadan sonra en az birkaç aylık latent bir dönemden sonra ortaya çıkar [136], [137]. Hyalüronik asit dolgu maddelerine karşı gelişen bu granülomatöz reaksiyonlar hyalüronidaz ile tedavi edilebilir. Enfeksiyon ekarte edildiğinde veya var olan enfeksiyon tedavi edildikten sonra, oral veya intralezyonel steroid uygulanabilir. Granülomlar steroidlere iyi yanıt verir. Steroidler yeterli gelmezse, tedaviye 5-FU eklenmesi alınan yanıtı arttıracaktır. Medikal tedavilerin başarısızlığı durumunda, yapılacak tek şey cerrahi eksizyondur [92], [93], [96]–[98].

2.6. Hyalüronidaz

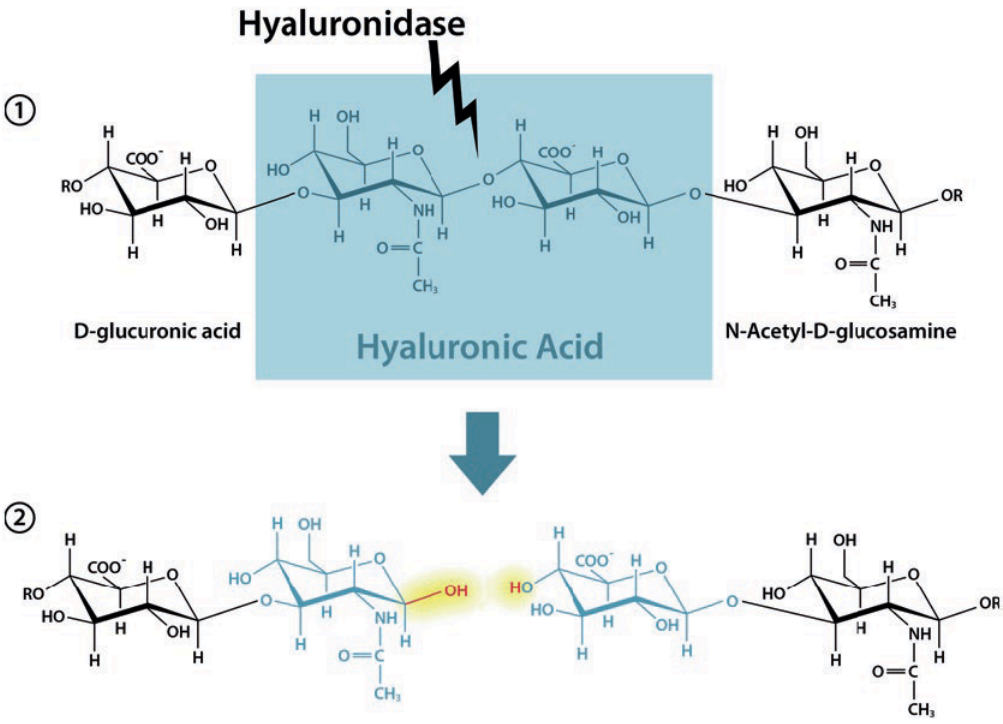
Hyalüronidaz, hyalüronik asidi depolimerize eden, dokularda birden fazla etki gösteren bir endoglikozidazdır. Hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunur. İlk olarak 1929'da Duran-Reynals tarafından tanımlandı [138]. Daha sonrasında ise 1942'de Duran-Reynals, hyalüronidaz (hyase, HYAL) ve hyalüronik asit etkileşimi üzerine "Doku geçirgenliği ve enfeksiyonda yayılma faktörleri" başlıklı kapsamlı bir incelemeyi yayınladı [139]. Beş yıl sonra Karl Meyer, “Hyalüronik asit ve hyalüronidazın biyolojik önemi” üzerine bir inceleme yayınladı [140]. Hyalüronik asit metabolizması, bir yanda sentezleyici hyalüronik asit sentaz enzimlerinin ve diğer yanda degrade edici hyalüronidaz (HYAL) enzimlerinin etkileşimi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir [140], [141]. Hyalüronidaz enzimi başlangıçta pnömokokların otolizatlarında tanımlansa da, Staphylococcus aureus (S. aureus) ve diğer bakterilerde, bazı hayvanların zehirlerinde ve spermlerinde de bulunur [140]. Spermatozoanın akrozomu ve membranında yüksek oranda hyalüronidaz bulunmasından dolayı, Duran-Reynals testis ekstraktlarının analizi sonucu “yayılma faktörü” olarak

adlandırdıkları hyalüronidaz aktivitesinin keşfetti [139], [142]. Çünkü hyalüronidaz esktraselüler matriksin bir elemanı olan hyalüronik asitin yapısal bütünlüğünü bozup, viskozitesini düşürerek doku geçirgenliğini arttırır. Böylece eşlik ettiği moleküllerin yayılımını ve dağılımını arttırır [143].

Günümüzde sentetik hyalüronidazlar, lokal anestezikler ve immünglobulinler dahil olmak üzere ilaçların yayılımını veya dağılımını artırmak için yardımcı maddeler olarak kullanılmakla birlikte, ekstravazasyon yönetiminde de yine hyalüronidazlar kullanılmaktadır. Ek olarak hyalüronidazlar, hyalüronik asit dolgu komplikasyonlarının yönetiminde de ana tedaviyi oluşturmaktadır [93], [96], [104], [113], [144], [145].

Hyalüronidazlar; enzimatik özelliklerine, hyalüronik asidi parçalama modlarına göre detaylandırılmış ve üç ayrı enzim sınıfını tanımlamıştır [146]. Bunlar; bakteriyel β-N-asetil heksozamidazlar, omurgalı endo-β-N-asetil heksozamidazlar ve endo-β-glukronidazlardır. Endo-β-glukronidazlar sülüklerde bulunur ve bu enzim sınıfı hakkında pek bir şey bilinmemekle birlikte, etki mekanizmalarının, omurgalı enzimleriyle daha yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir [147].

Hyalüronik asit indirgeyici hyalüronidazlarla ilgili olarak, şimdiye kadar iki kromozom üzerinde altı ilgili gen lokusu tanımlanmıştır. Bunlar; 3q21.3 kromozomunda HYAL1, HYAL2 ve HYAL3 genleri ve 7q31.3 kromozomunda HYAL4, PH20 (SPAM1 ya da HYAL5 olarak da adlandırılır) ve HYAL-P1 (HYAL6 olarak da adlandırılır) genleridir [148]. HYAL2, lizozomal hyalüronidaz olarak görev yaparken; PH20, sperm hyalüronidazı (sperm adezyon molekülü-sperm adhesion molecule 1-SPAM1) olarak görev yapar [149]. İnsan hyalüronidazlarının tümü, hyalüronik asidin β-N-asetil-heksozamin-glikosidik bağlarını parçalayan endo-β-N-asetil heksozamidazlardır (Şekil 19).



Şekil 19: Hyalüronidazın etki mekanizması [150]

Hyalüronidazlar pH'a bağlı aktivitelerine göre de kategorize edilebilirler. Asidik hyalüronidazlar 3-4 pH'ta aktiftir. HYAL1, HYAL2, HYAL3 ve HYAL4 asidik hyalüronidazlardır. PH20, nötr hyalüronidazdır ve pH 5-8'de aktiftir [80]. En aktif insan hyalüronidazı, döllenme sürecinde yer alan ve insan spermatozoasının baş ve akrozomunda yer alan PH20'dir. Somatik dokudaki hyalüronik asidin katabolizmasından sorumlu birincil hyalüronidazlar ise HYAL1 ve HYAL2'dir [151]. Hyalüronik asit ve metabolize edici enzimler, tümör biyolojisinin yanı sıra hidrasyon, yaşlanma, fertilizasyon, embriyogenez, proliferasyon, farklılaşma ve yara iyileşmesi gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde görev alır [151].

Hyalüronidazın biyolojik aktivitesinin erken keşfini takiben, enzimatik protein tanımlanmış, karakterize edilmiş ve terapötik kullanım için geliştirilmiştir [150]. Başlangıçta, hyalüronidazın yılan zehrindeki difüzyon arttırıcı etkisinden esinlenerek, intrakutan veya subkutan olarak uygulanan ilaçların difüzyon kinetiklerini arttırmak için kullanılmıştır [152]. Aynı zamanda oftalmolojide uygulamalar geliştirilmiştir. Burada hyalüronidaz peribulber anestezi ve vitreolizde kullanılır [153], [154]. Diğer bir kullanım alanı da intravenöz sitostatik tedavi sırasında, vinblastin ve etoposid gibi

infiltre toksik ilaçların ekstravazasyon durumudur. Bu ilaçların rezorpsiyonunu hızlandırır [155].

Hyalüronidaz son zamanlarda hyalüronik asit dolgu komplikasyonlarının yönetiminde de kullanılmaktadır. Hyalüronidaz enjeksiyonu sadece estetik olmayan aşırı dolgu uygulamalarını düzeltmekle kalmaz, aynı zamanda kronik ödem veya dolgu enjeksiyonlarından sonra görülebilen vasküler komplikasyonların tedavisinde de kullanılmaktadır [93]. Ayrıca hyalüronidaz uygulaması kronik ödem tedavisinde de faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu komplikasyon, hyalüronik asidin higroskopik etkisi ile ilişkilidir. Yine de hyalüronidazın mevcudiyetine rağmen, tüm hyalüronik asit dolgu maddelerinin enzim tarafından etkili bir şekilde asimile edilebilir olup olmadığı tartışmalıdır. Parçalanabilirlikteki farklılık ve parçalanabilirliğe karşı direnç; dolgu içindeki hyalüronik asit konsantrasyonuna, çapraz bağlanma derecesine, jel viskozitesine, jel sertliğine, yapışkan özelliklerine ve son olarak dolgu maddesinin vücuda uygulanmasından sonra geçen zamana bağlanabilir [156].

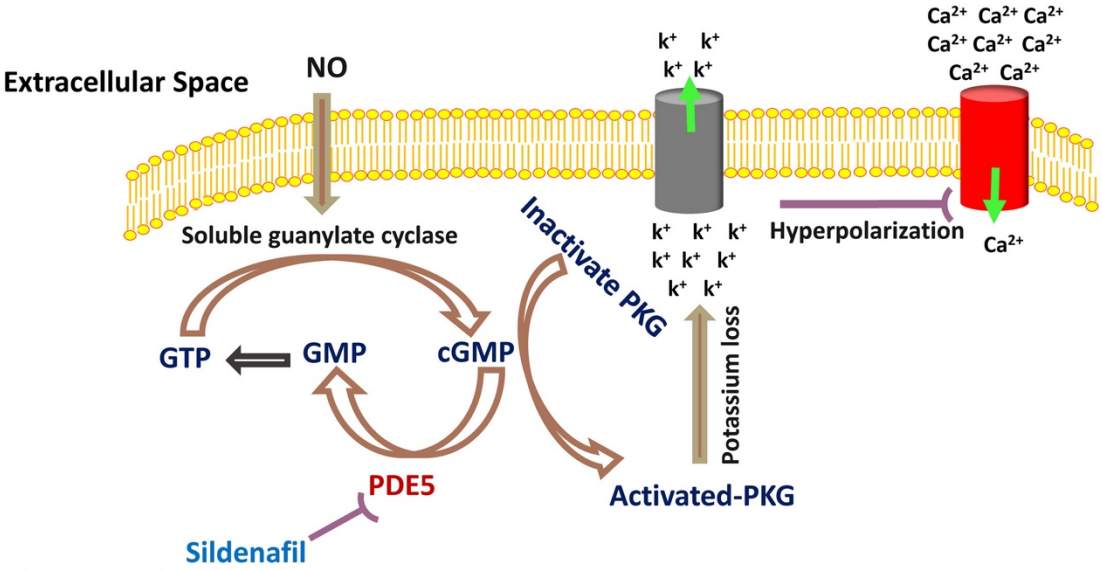
Hyalüronidazların ticari formülasyonları arasında sığır testisinden üretilen hyalüronidaz (BTH) , küçükbaş hayvan testisinden üretilen hyalüronidaz (OTH) ve rekombinant insan hyalüronidazından elde edilen hyalüronidaz (rHuPH20) yer alır [157]. Hayvan kaynaklı hyalüronidazlar; immünglobulinler ve proteazlar ile kontamine olabildiklerinden, hipersensitivite reaksiyonları veya anafilaksi gibi IgE aracılı immünojenik yanıt potansiyeli yüksek ürünlerdir [158]. 2005 yılında, doğal olarak oluşan insan hyalüronidazının yüksek oranda saflaştırılmış çözünür bir formu, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylandı. Preparat ismi rHuPH20 (örn: ENHANZE®, Halozyme Therapeutics, Inc., San Diego, CA, ABD) olan bu rekombinant ürün, ticari olarak temin edilebilen hayvandan kaynaklı hyalüronidazlarla karşılaştırıldığında daha yüksek oranda spesifik aktivite gösterir. Neredeyse %99'luk saflıkla elde edilen bu ürün, üstün bir güvenlik profili ve önemli ölçüde daha düşük bir immünojenik reaksiyon gösterir [159].

2.7. Sildenafil Sitrat

Vazokonstrüksiyon gelişiminin önemli bir kısmını nitrik oksit (NO) sisteminin inhibisyonu ile gerçekleşir [160]. Nitekim NO, vazodilatasyona yol açan vasküler düz kas gevşemesini indükleyen siklik guanozin-5-monofosfat (cGMP) ürettiği için güçlü

bir vazodilatördür. cGMP, fosfodiesterazlar tarafından hidrolize edilir. Fosfodiesteraz inhibisyonu sonucu cGMP düzeyi yüksek kalır ve vazodilatasyon gerçekleşir. Sildenafil, fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) inhibitörü ilaç sınıfına aittir. PDE5, penisin erektil dokusu olan korpus kavernozumda, retina ve vasküler endotelde bulunur [161]. Sildenafil başlangıçta bir antianjinal ajan olarak geliştirilmiştir. Ancak ilk geliştirildiği zaman erektil disfonksiyonda etkisinin olduğu görülmüştür [162], [163]. Daha sonrasında pulmoner arter hipertansiyonu (PAH) olan hastaların tedavisinde etkili olduğunu gösterildi [164]. Sildenafilin endotel hücre fonksiyonu ve hücresel apoptoz üzerine doğrudan etkisi ile doku iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğu da bilinmektedir [165]. Ayrıca, ilaç vasküler düz kas gevşemesini indükleyerek vazodilatasyonu uyarır [166]. Kılcal damarlar, düz kasa sahip olmamasına rağmen, arteriyolden gelen kan akışının miktarına bağlı olarak pasif olarak genişler ve böylece dokunun mikro dolaşım perfüzyonu artar. Sildenafil, trombosit agregasyonunu da engeller. Bu durum küçük damar tıkanıklığının önlenmesine yardımcı olur [167].

Sildenafil sitrat PDE5'in inhibisyonu yoluyla etki eder. PDE5, cGMP'yi katabolize etmekten ve onu GMP'ye dönüştürmekten sorumludur. cGMP'nin kendisi NO sinyal yolunun bir parçasıdır ve cGMP'ye bağımlı protein kinazı (PKG) aktive eder. PKG, diğer proteinleri fosforile eder ve kas gevşemesine katılır [168]. Bu proteinlerden biri, charybdotoxin duyarlı bir K^+ kanalıdır. Bu tip K^+ kanalının aktivasyonu, düz kas hücresinin hiperpolarizasyonu ve vazorelaksasyonu için kritik öneme sahiptir [169]. Sildenafil genel olarak guanilat siklazı inhibe etmez, sadece çözünür guanilat siklazı inhibe eder. NO, çözünür guanilat siklazı aktive eder ve bu enzim, kalan vazodilatasyon sinyal yolunu indüklemek için cGMP üretir (Şekil 20). NO/cGMP sinyal yolu vazorelaksasyonla sınırlı değildir. ve bilim adamları sildenafilin trombosit fonksiyonunu ve sinaptik iletimi düzenlemede rol oynadığını bulmuşlardır [170], [171]. PDE5, korpus kavernozum, kan damarları, deri, uterus, karaciğer, böbrek, mesane, prostat ve bağırsaklar gibi hemen hemen tüm organlarda eksprese edilir. Sildenafil, retinada bulunan PDE6'ya afinitesi, PDE5'te olduğu kadar güçlüdür. Buna bağlı retinada da benzer etkiler göstermektedir [172].



Şekil 20: Sildenafil etki mekanizması [173]

2.7. SPY Elit Floresans Görüntüleme

SPY Elite system ile indosiyanin yeşili kullanılarak yapılan floresans anjiyo görüntülemeye SPY Elit floresans görüntüleme adı verilmektedir.

2.7.1. İndosiyanin Yeşili

İndosiyanin yeşili kimyasal formülü C43H47N2O6S2Na olan, 775 dalton molekül ağırlıklı, suda çözünen bir trikarbosiyanin boyasıdır [174]. En fazla %5 sodyum iyodür içerir. Enjeksiyonun ardından indosiyanin yeşili hızlı bir şekilde çoğunluğu lipoproteinler olmak üzere plazma proteinlerine ve değişken düzeyde olmakla birlikte albümine (toplamda %2 - %30) bağlanır. İndosiyanin yeşili, plazmadan çok büyük oranda hepatik parankimal hücreler tarafından alınır ve tamamen safraya salgılanır. İndosiyanin yeşili anlamlı enterohepatik resirkülasyona uğramaz. Normal biyolojik yarı ömrü 2,5-3,0 dakikadır [174], [175]. İndosiyanin yeşili intravenöz dolaşıma verilebilen, belirgin yan etki oluşturmayan, kızıl ötesine yakın spektrumda (820 nm) floresan ölçüm yapılabilen bir boyar maddedir. Bu boya ilk olarak 1956 yılında klinik kullanıma girmiş, fakat günümüzde sadece Near infrared (NIR-kızıl ötesine yakın) floresan ölçümlerinde kullanılmaktadır. Bu ölçümlerde dokuların kan akımı gerçek zamanlı olarak görülebilmektedir [176]. Çoklu görüntü

yakalamalarına olanak tanımasıyla birlikte ve şu anda kardiyak output, karaciğer fonksiyonu değerlendirmesi, karaciğer kan akımı değerlendirmesi ve oftalmik vaskülerite değerlendirmesi için FDA tarafından onaylıdır. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi olarak başlıca klinik kullanım alanları olarak sentinel lenf nodu görüntülenmesi, flep, doku, ekstremite ve organ perfüzyonu değerlendirmesi ve görüntülenmesidir.

2.7.2. Kızıl Ötesine Yakın (NIR) Floresan Görüntüleme

Floresan anjiyografi (FA), intravenöz bir boyanın (floresan ve indosiyanin yeşili - ICG) bir ışık kaynağı tarafından uyarıldıktan sonra floresan ve kızılötesi enerji yaymasını baz alan gerçek zamanlı bir görüntüleme yöntemidir [177]. Preoperatif, intraoperatif ve postoperatif ortamda kan akışı ve doku perfüzyonunun değerlendirilmesini sağlar. Hızlı etki başlangıcı, kısa yarı ömrü, az yan etki profili nedenli klinikte daha çok indosiyanin yeşili kullanılmaktadır. Şu anda, çok sayıda ticari yakın kızılötesi ışık algılama cihazı (near infrared -NIR- light detection devices) mevcuttur [178]. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'de sık kullanılan cihazlar; SPY Elite System (Novadaq, Mississauga, Ontario, Canada), FLARE System (Curadel LLC, Worcester, MA, USA), PDE-Neo System (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), Fluobeam 800 System (Fluoptics, Grenoble, Fransa) ve IC-View System (Pulsion Medical Systems AG, Münih, Almanya) olmakla birlikte, SPY Elite System klinik çalışmalarda en sık rapor edilen sensör olmuştur. Bizim kliniğimizde de SPY Elite System bulunması nedenli bu sensör kullanılacaktır (Şekil 21).

SPY, çeşitli cerrahi işlemler sırasında lenfatikler ve kan damarları dahil dolaşımı ve ayrıca ilgili doku perfüzyonunu kızılötesine yakın floresan ile görüntülemek için kullanılan aktif bir cihazdır. Görüntüleme konsolunda aydınlatma modülünden gelen kızılötesine yakın (NIR) ışık fiber optik kabloyla görüntüleme başlığına iletilir. Görüntüleme başlığından NIR eksitasyon ışığı, ilgili alanın üzerine gelip aydınlatacak şekilde hastanın üzerine yerleştirilir. Hastaya 'indosiyanin yeşili' floresan görüntüleme maddesi enjekte edildiğinde, indosiyanin yeşili kandaki plazmaya bağlanarak kan dolaşımıyla ilgilenilen alana gider. SPY görüntüleme cihazı tarafından yayılan NIR eksitasyon ışığı indosiyanin yeşilinin floresan ışığı yaymasını sağlar. İndosiyanin yeşilinin floresan tepkisi sonrası görüntüleme başlığındaki NIR

kamerası tarafından görüntülenir ve oluşan görüntü sinyali bilgisayarda işlenip aynı anda bilgisayar belleğine kaydedilir ve video monitörlerde gerçek zamanlı olarak görüntülenir. SPY Elite system cihazı; yazılım programı ve ölçüm başlığı sayesinde ışıma miktarını, orijin alınan noktaya göre yüzdesel veya total ışıma miktarına göre sayısal olarak ölçebilmektedir [175].

SPY Elite system ile indosiyanin yeşili kullanılarak yapılan floresans anjiyo görüntülemeye SPY Elit floresans görüntüleme adı verilmektedir.

Şekil 21: Kliniğimizdeki SPY Elit System görüntüleme cihazı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel olarak kurguladığımız bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na yapılan başvuru ardından, kurul tarafından 40/2020 protokol numarası ile 24/02/2021 tarihinde yapılan toplantıda etik olarak uygun bulundu. Çalışmadaki cerrahi işlemler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'nda yapıldı. Floresans görüntülemeler Dokuz Eylül Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda, histopatolojik çalışmalar ise Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Projenin gerçekleştirilmesi için gereken finansal destek Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'nin (BAP) fonu ile sağlandı.

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım klavuzunda belirtilen şartlarda bakımı yapılan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'ndan sağlanan 28 adet 10-12 aylık, 2.5-3 kg ağırlığında, dişi Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı.

3.2. Deney Hayvanlarının Bakımı

Deney hayvanları uluslararası deney hayvanı bakım ve deney klavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 23 ±2 °C, 12 saat gündüz/gece siklusu) kafeslere alındı. Deney Hayvanları, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda standart koşullarda beslenerek takip edildi (Resim 1). Denekler standart tavşan yemi ve suyun yanında haftanın iki günü taze marul ve havuç ile beslendi. Cerrahi sonrası insizyon hattı; hiperemi, ödem, enfeksiyon takibi açısından günlük olarak klorheksidin ve steril gazlı bez ile konvansiyonel pansuman yapılarak izlendi. Pansuman malzemelerinin korunmasının sağlamak ve otomutilasyonu engellemek için kumaştan yapılmış koruyucular giydirildi.

Resim 1: Deneklerin barınma koşulları

3.3. Anestezi Uygulanması

Bu çalışmada kullanılan deneklerin anestezisi, 35 mg/kg ketamin (Ketalar 500mg/10ml Flakon Pfizer İlaçları Ltd. Şti.) ve 5 mg/kg ksilazin klorür (Basilazin 500mg/25ml Flakon Bavet İlaç A.Ş) uyluğa intramusküler olarak uygulanarak sağlandı.

3.4. Deney Grupları

Deney grupları oluşturulurken varyans dağılımını sağlamak için ve denek sayısının minimalize edilmesi amacı ile tüm gruplar 7'şer denek içerecek şekilde 4 denek grubu oluşturuldu. Her gruptaki deneklerin 2 kulağı da deneyde kullanıldı. Bu sayede hayvan sayısı azaltılmış olundu. Bir denekteki her iki kulağa da farklı mekanizmalar ile iskemi modeli oluşturuldu. 28 denekteki toplam 56 kulaktan 7' şerli olacak şekilde 8 grup elde edildi. Bu 8 gruptan 2 tane kontrol, 6 tane deney grubu oluşturuldu. Deneydeki tüm kulaklarda aynı ebatta (17,02 cm^2) santral auriküler arter ve ven bazlı deri ve kıkırdağı içeren kompozit flepler hazırlandı. Hayvanların sağ kulaklarındaki kompozit fleplerin santral arterleri hyalüronik asit dolgusunun intraarteriyel uygulanmasıyla oluşan embolizasyon ile, sol kulaklarındaki kompozit fleplerin santral arterine perivasküler hyalüronik asit dolgusu uygulanmasına bağlı eksternal kompresyon ile iskemik model oluşturuldu. Böylece 2 farklı iskemik deney modeli 1 denekte oluşturulmuş olundu. Daha sonra flepler tekrar aynı yerlerine sütüre edildi. Denek grubu 1'e herhangi bir tedavi uygulanmadı ve kontrol grupları olarak kullanıldı. Kontrol gruplarına herhangi bir tedavi uygulanmadı ve günlük olarak takip edildi. Denek grubu 2'ye; denek grubu 1'e ek olarak iskemi modelleri oluşturulduktan

sonra sadece hyalüronidaz tedavisi uygulandı. Denek grubu 3'e; denek grubu 1'e ek olarak sadece sildenafil sitrat tedavisi uygulandı. Deney grubu 4'e; denek grubu 1'e ek olarak hyalüronidaz ve sildenafil sitrat tedavisi uygulandı. Denekler iki hafta boyunca izlendi.

Denek Grubu 1:

Deney Grubu 1E (n:7)

- Deneklerin sağ kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile embolizasyon mekanizmasıyla iskemi yapılan flepler

Deney Grubu 1K (n:7)

- Deneklerin sol kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile eksternal kompresyon mekanizmasıyla iskemi yapılan flepler

Denek Grubu 2:

Deney Grubu 2E (n:7)

- Deneklerin sağ kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile embolizasyon mekanizmasıyla iskemi yapılan ve sadece hyalüronidaz uygulanan flepler

Deney Grubu 2K (n:7)

- Deneklerin sol kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile eksternal kompresyon mekanizmasıyla iskemi yapılan ve sadece hyalüronidaz uygulanan flepler

Denek Grubu 3:

Deney Grubu 3E (n:7)

- Deneklerin sağ kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile embolizasyon mekanizmasıyla iskemi yapılan ve sadece sildenafil sitrat uygulanan flepler

Deney Grubu 3K (n:7)

- Deneklerin sol kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile eksternal kompresyon mekanizmasıyla iskemi yapılan ve sadece sildenafil sitrat uygulanan flepler

Denek Grubu 4:

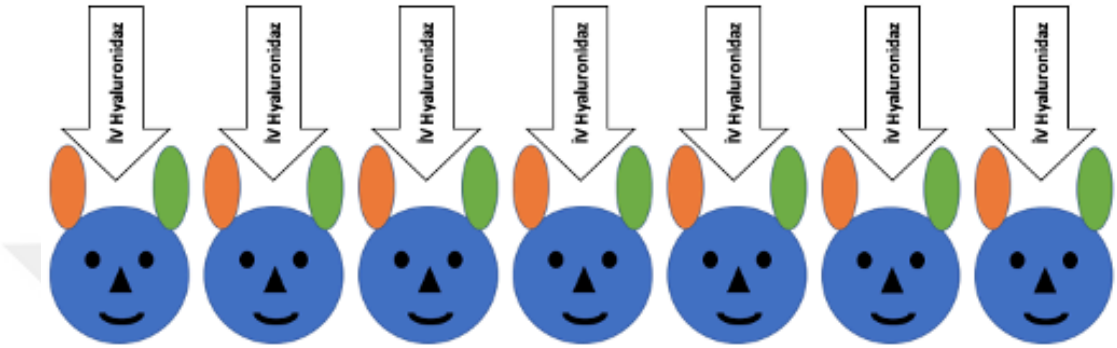
Deney grubu 4E (n:7)

- Deneklerin sağ kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile embolizasyon mekanizmasıyla iskemi yapılan; hyalüronidaz ve sildenafil sitrat uygulanan flepler

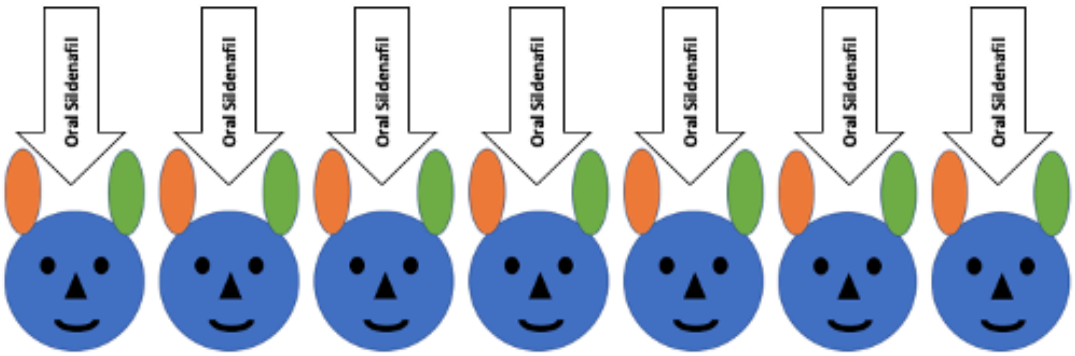
Deney grubu 4K (n:7)

- Deneklerin sol kulağındaki kompozit flebe hyalüronik asit dolgusu ile eksternal kompresyon mekanizmasıyla iskemi yapılan; hyalüronidaz ve sidenafil sitrat uygulanan flepler

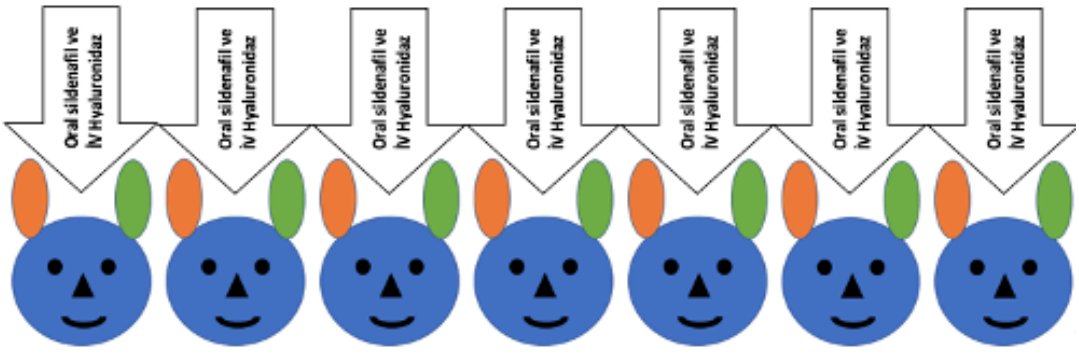
Denek Grubu 1: Sağ kulaklar deney grubu 1E, sol kulaklar deney grubu 1K



Denek Grubu 2: Sağ kulaklar deney grubu 2E, sol kulaklar deney grubu 2K



Denek Grubu 3:Sağ kulaklar deney grubu 3E, sol kulaklar deney grubu 3K



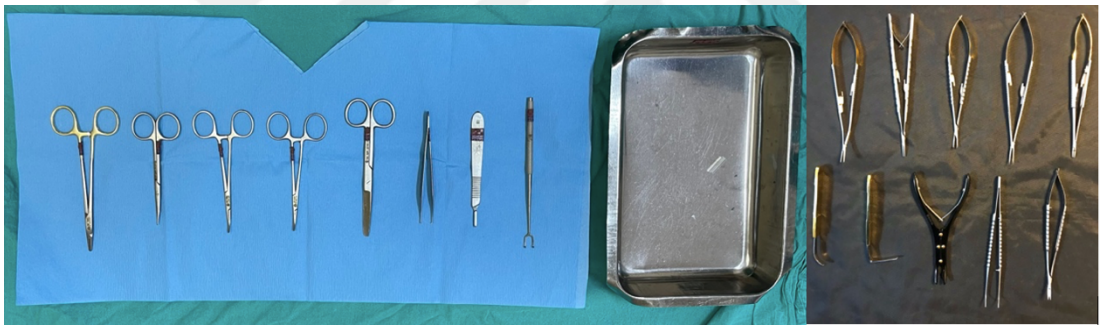
Denek Grubu 4: Sağ kulaklar deney grubu 4E, sol kulaklar deney grubu 4K

Şekil 22: Denek ve deney gruplarının şematik gösterilmesi

Deney gruplarında oluşturulan iskemi modellerinin lokal etkili olması, sağ kulaktaki iskemi modelinin sol kulaktakini etkilememesi nedeniyle bir tavşandaki her iki kulak birbirinden bağımsız değişken olarak çalışmada kullanıldı. Uygulanan tedaviler sistemik olması nedenli her deneğe tek tedavi uygulandı. Toplam çalışılan kulak sayısı 56 olduğu ve deneklerin her iki kulağında da çalışmaya dahil edildiği için toplam 28 denek kullanıldı. Bu şekilde gerekli denek sayısı azaltılarak hayvan deneylerindeki "4 R" temel ilkelerinden olan "Reduction" ilkesi gözetilmiş olundu.

3.5. Deneyde Kullanılan Malzemeler

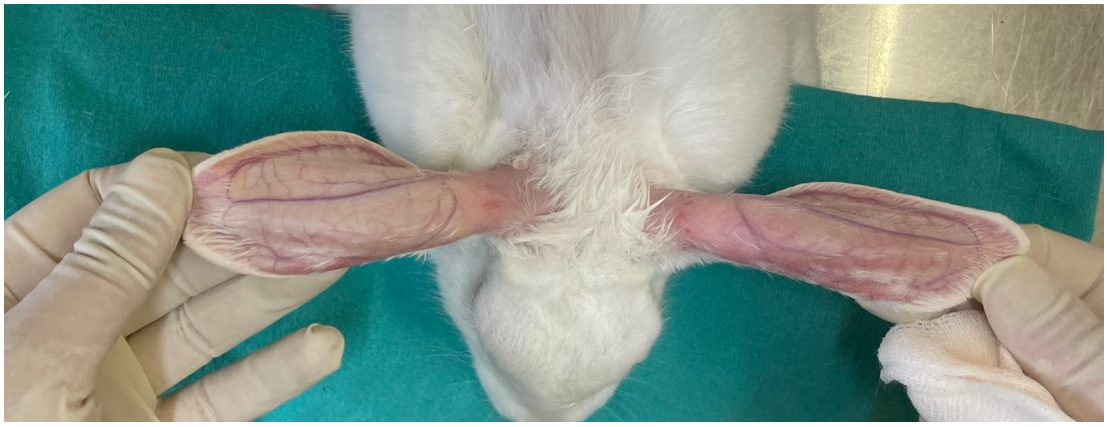
Cerrahi işlemler için; portegü, penset, makas, klemp, ekartör ve çiftli kanca kullanıldı. Mikroskop altında uygulanan mikrocerrahi işlemlerde mikropenset, mikroportegü ve mikromakas kullanıldı (Resim 2). Cerrahi aletler hidrojen peroksit ile sterile edildi.



Resim 2: Deneyde kullanılan cerrahi aletler

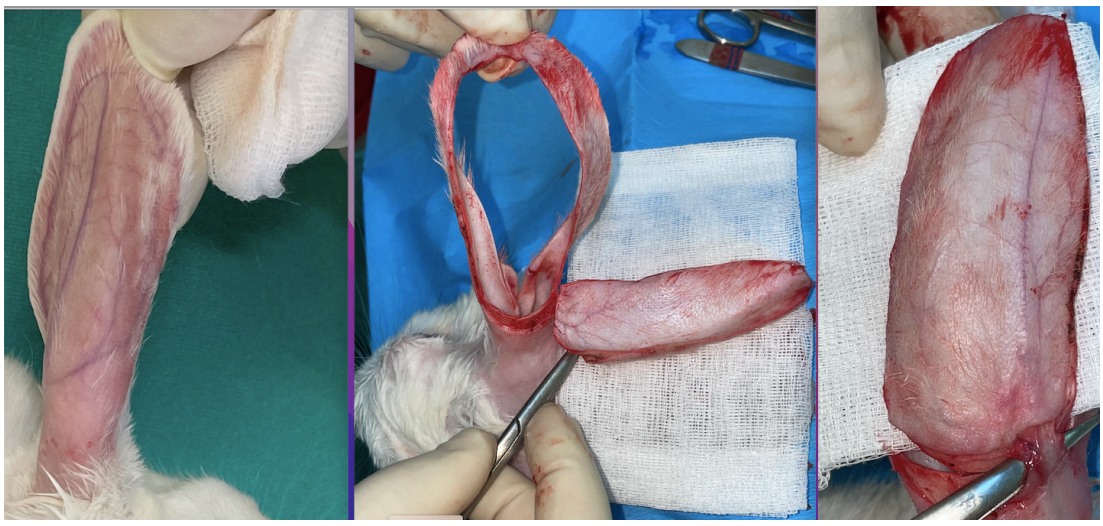
3.6. Cerrahi Teknik ve Deney Modeli

Çalışmamızda kullanılan deneklerin anestezisi, 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin klorür intramusküler olarak uygulanarak sağlandı. Gerekli anestezik etkinliğe ulaşıldıktan sonra kulaklarında ve boyun bölgesinde bulunan kıllar dokulara zarar vermeden traş edildi (Resim 3).



Resim 3: Deneklerin kulaklarının traş edilmiş hali

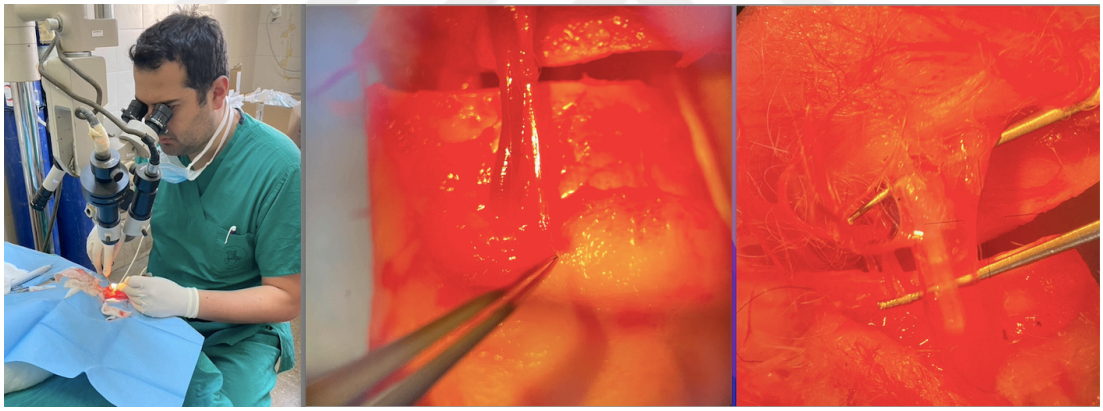
%4 lük klorheksidinli antiseptik solüsyon ile deneklerin kafaları ve boyunları silindikten sonra steril örtüler örtülerek steril saha oluşturuldu. 1 mg/kg prilokain (Priloc 20 mg/ml %2 çözelti içeren flakon VEM İlaç San. ve Tic. A.Ş.) kulak köküne infiltre edildi ve ek olarak duyu bloğu da sağlandı. Daha önceden hazırlanan 17,02 cm^2'lik alana sahip termoplastik flep kalıbına uygun olarak tüm hayvanların kulaklarından santral auriküler arter ve ven bazlı tam kalınlıkta cilt ve kıkırdağı içeren kompozit bir flep eleve edildi (Resim 4).



Resim 4: Kulak fleplerinin hazırlanması

Standart flep boyutları elde etmek için bu termoplastik kalıp baz alınarak insizyonlar yapıldı. Flepler tasarlanırken santral auriküler arterin veni çaprazladığı

yerin 1 cm proksimalinden başlanarak kesi yapıldı. Santral arter ve veni flebe dahil edilecek şekilde flepler tasarlandı. Fleplerin yan ve distal kısımları tam kat kesildikten sonra mikroskoba geçildi. Tüm damar ve sinir diseksiyonları cerrahi mikroskop (Carl Zeis OPMI 9-FC, Oberkochen, Almanya) altında yapıldı. Mikroskop altında flebin proksimal sınırının süperior cilt insizyonu altta bulunan nörovasküler demetlere zarar vermeyecek şekilde yapıldı. Cilt insizyonu sonrası nörovasküler demet etrafını saran fasyayla birlikte zemindeki kas, tendon, kıkırdak ve süperiorundaki cilt dokusundan diseke edildi. Nörovasküler demetin inferiorundaki kas, tendon ve kıkırdak tam kat insize edilerek flep eleve edilmiş olundu. Bu aşamadan sonra sağ kulaktaki flebin nörovasküler demetinde bulunan arter, ven ve sinirin etrafını saran fasya diseke edilip arter, ven ve sinir ayrı ayrı olacak şekilde iskeletize edildi. Flebe vasonervorumlardan gelecek kan akımını kesmek için, flep proksimal sınırından sinir total kesildi. Böylece sağ kulakta 1 arter ve 1 ven tarafından dolaşımı sağlanan; deri hiyalin kıkırdak, tendon içeren kompozit bir doku adası (flep) elde edilmiş olundu (Resim 5).



Resim 5: Soldan itibaren; birinci resim araştırmacının mikroskop altında çalışması, ikinci resim sağ kulakta arter ve venin hazırlanması, üçüncü resim sol kulakta arter ve venin hazırlanması

Sol kulakta ise nörovasküler demet korunarak yukardaki bahsedilen insizyonlar tamamlanarak flep elde edildi. Flebin nörovasküler demetini saran fasyadan sadece sinir diseke edilip ayrıldı. Flebe vasonervorumlardan gelecek kan akımını kesmek için, flep proksimal sınırından sinir total kesildi. Sağ kulak flebinden

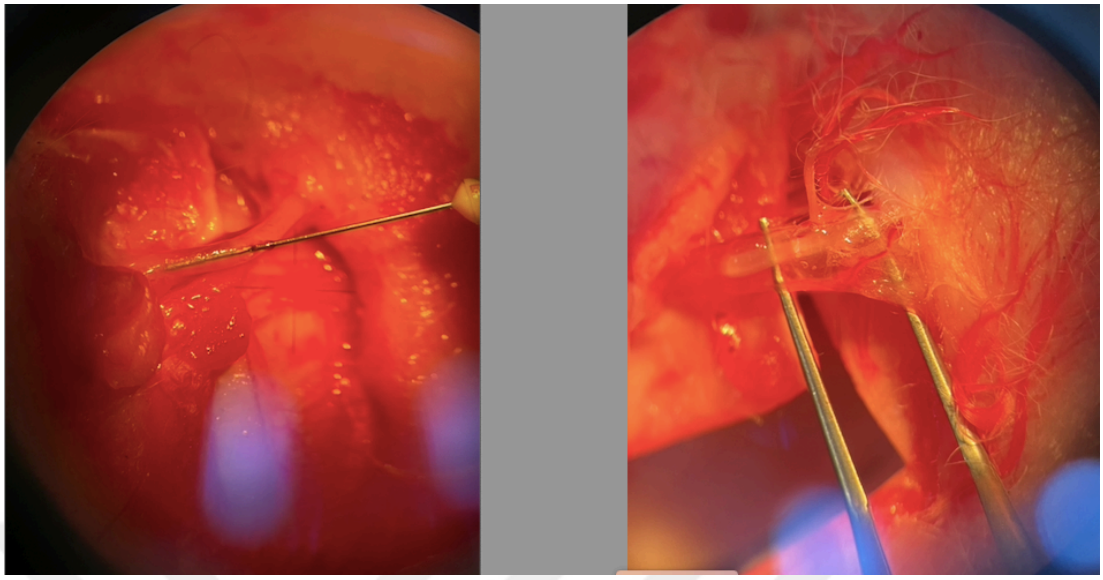
farklı olarak nörovasküler demeti saran fasyadan; arter ve ven de diseke edilip, iskeletize edilmedi. Sadece sinir ayrılıp kesildi (Resim 5).

Standardizasyon için tüm tavşanların sağ kulaklarına embolizasyon sol kulaklarına eksternal kompresyon modeli uygulandı. Tüm cerrahi işlemler aynı araştırmacı tarafından uygulandı. Tüm nörovasküler demete yönelik işlemler mikroskop altında yapıldı. Tüm cerrahi işlemler ve noninvaziv işlemler tüm deneklere uygulandı. Hyalüronidaz uygulanmayan deneklere, aynı şekilde %0,9 sodyum klorür sıvı aynı zamanda verildi. Sildenafil sitrat süspansiyon verilmeyen deneklere de aynı miktarda %0,9 sodyum klorür sıvı orogastrik sonda ile verildi.

3.6.1. Denek Grubu 1

Bu denek grubunda bulunan 7 adet tavşanın her iki kulağına daha önce bahsedildiği gibi flep yapıldıktan sonra, mikroskop altında; sağ kulağındaki flebin arterinin içine, 0.1 ml çapraz bağlı hyalüronik asit dolgusu (Regenyal İdea Cross-Linked Hyaluronic Acit, Regenyal Laboratories Srl, İtalya) 33 gauge iğne yardımıyla enjekte edilip emboliye bağlı iskemi modeli oluşturuldu (Resim 6 ve 7). Yine mikroskop altında deneğin sol kulağındaki vasküler demeti saran fasyanın içine, damar duvarının dışına 0.5 ml çapraz bağlı hyalüronik asit dolgusu 33 gauge iğne yardımıyla enjekte edilip eksternal kompresyona bağlı iskemi modeli oluşturuldu (Resim 7).

Resim 6: Hyalüronik asit dolgusu



Resim 7: Sağda hyalüronik asidin damar içine, solda ise damar etrafı fasyanın içine uygulanmış halinin mikroskop görüntüsü

Ardından flepler aynı yerlerine 5-0 keskin iğneli polipropilen sütür (5-0 Prolene Ethicon Johnson&Johnson Company) ile aynı yerlerinden 13 adet basit primer sütür ile sütüre edildi (Resim 8). Böylece bu grupta bulunan deneklerin sağ kulaklarında "deney grubu 1E", sol kulaklarında ise "deney grubu 1K" oluşturulmuş olundu.

Resim 8: Fleplerin sütüre edilmiş hali

Deneklerin mandibula simfizis bölgesinden 4 cm inferiorundan, orta hatta, 3 cm uzunluğunda, vertikal seyirli insizyon yapıldı. Cilt ve ciltaltı panniculus carnosus dokusu geçildi ve eksternal juguler ven yapıları ortaya konuldu. İskemi modelleri oluşturulduktan 4 saat sonra sol eksternal juguler vene 26 gauge iğne yardımıyla 2 mg/kg indosiyanin yeşili (Aurogreen, 25 mg indosiyanin yeşili, Tamil Nadu, Hindistan) uygulandı (Resim 9). Cihazın kamerası ölçüm yapılan fleplere 90° açı ile dik ve 30 cm uzaklıkta olacak şekilde ayarlandı. İndosiyanin yeşili uygulanmasından 20 saniye sonra SPY Elit System Görüntüleme Cihazı ile 10 saniye görüntü kaydedildi. Sağ kulaktaki flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (A alanı) dolaşımı referans alınarak Spy-Q Analysis Toolkit (2016 Novadaq Technologies Inc, Canada) programı ile kaydedilen bu 10 saniyelik görüntü işlendi ve üst katman analizi yapıldı. Üst katman algoritması olarak ortalama seçildi. Relatif kantifikasyon modu kullanıldı. Elde edilen görüntüler daha sonra Image J programında analiz edildi. Bu analizde flep görüntüden ayrılıp kanlanan yüzeyin alanı ve değeri flebin toplam alanına göre ortalaması alındı. Elde edilen sonuç flebin ortalama relatif perfüzyon ünite (RPU) değeri olarak parametrik (% olarak) değerde kaydedildi. Sol kulak için alınan görüntüde, flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (B alanı) dolaşımı referans alındı ve analiz aynı şekilde yapıldı (Resim 10).

Resim 9: Boyun bölgesinin hazırlanması ve juguler vene indosiyanin yeşili enjeksiyonu

Resim 10: Üstteki resim, ölçümdeki referans noktalar; alttaki resim, indosiyanin yeşili

İskeminin oluşmasından 4 saat sonra ise sağ eksternal juguler vene 10 ml %0,9 sodyum klorür yine 26 gauge iğne yardımıyla infiltre edildi. Ardından cilt 5-0 keskin iğneli polipropilen sütür ile sütüre edildi. İskemi uygulandıktan sonra 4. saatten başlamak üzere 0,35 ml/kg olacak şekilde %0,9 sodyum klorür, deneklere orogastrik sonda ile 24 saatte 1, 14 gün boyunca uygulandı.

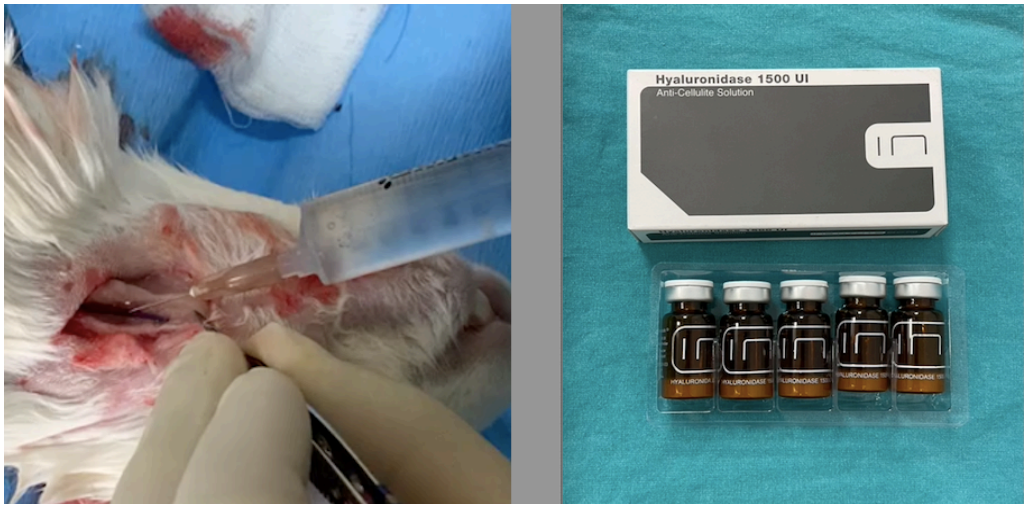
3.6.2. Denek Grubu 2

Bu denek grubunda bulunan 7 adet tavşanın kulaklarına denek grubu 1'de yapıldığı gibi iskemi modelleri oluşturuldu ve flepler aynı sütür materyali ile aynı sayıda ve aynı yerden yerlerine sütüre edildi.

Deneklerin mandibula simfizis bölgesinden 4 cm inferiorundan, orta hatta, 3 cm uzunluğunda, vertikal seyirli insizyon yapıldı. Cilt ve ciltaltı panniculus carnosus dokusu geçildi ve eksternal juguler ven yapıları ortaya konuldu. İskemi modelleri oluşturulduktan 4 saat sonra sol eksternal juguler vene 26 gauge iğne yardımıyla 2 mg/kg indosiyanin yeşili uygulandı (Resim 9). Cihazın kamerası ölçüm yapılan fleplere 90° açı ile dik ve 30 cm uzaklıkta olacak şekilde ayarlandı. İndosiyanin yeşili uygulanmasından 20 saniye sonra SPY Elit System Görüntüleme Cihazı ile 10 saniye görüntü kaydedildi. Sağ kulaktaki flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış

derinin (A alanı) dolaşımı referans alınarak Spy-Q Analysis Toolkit programı ile kaydedilen bu 10 saniyelik görüntü işlendi ve üst katman analizi yapıldı. Üst katman algoritması olarak ortalama seçildi. Relatif kantifikasyon modu kullanıldı. Elde edilen görüntüler daha sonra Image J programında analiz edildi. Bu analizde flep görüntüden ayrılıp kanlanan yüzeyin alanı ve değeri flebin toplam alanına göre ortalaması alındı. Elde edilen sonuç flebin ortalama relatif perfüzyon ünite (RPU) değeri olarak parametrik (% olarak) değerde kaydedildi. Sol kulak için alınan görüntüde, flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (B alanı) dolaşımı referans alındı ve analiz aynı şekilde yapıldı (Resim 10).

Toz halindeki 1500 IU (Internaitonal Unit) hyalüronidaz içeren flakon (Original Mesoceuticals 1500 IU, Istitute BCN Esthetics SL, Barselona, İspanya) toplamda 10 ml olacak şekilde %0,9 sodyum klorür ile sulandırıldı. İskeminin oluşmasından 4 saat sonra, floresans analizinden hemen sonra, sağ eksternal juguler vene 500 IU/kg olacak şekilde hazırlanmış hyalüronidaz solüsyonu 26 gauge iğne yardımıyla infiltre edildi (Resim 11). Sonrasında cilt 5-0 keskin iğneli polipropilen sütür ile sütüre edildi. Böylece sağ kulaklarda “deney grubu 2E”, sol kulaklarda ise “deney grubu 2K” oluşturulmuş olundu. İskemi uygulandıktan sonra 4. saatten başlamak üzere, floresans analizinden hemen sonra, 0,35 ml/kg olacak şekilde %0,9 sodyum klorür, deneklere orogastrik sonda ile 24 saatte 1, 14 gün boyunca uygulandı.



Resim 11: Hyalüronidaz uygulanması ve hyalüronidaz

3.6.3. Denek Grubu 3

Bu denek grubunda bulunan 7 adet tavşanın kulaklarına denek grubu 1'de yapıldığı gibi iskemi modelleri oluşturuldu ve flepler aynı sütür materyali ile aynı sayıda ve aynı yerden yerlerine sütüre edildi.

Deneklerin mandibula simfizis bölgesinden 4 cm inferiorundan, orta hatta, 3 cm uzunluğunda, vertikal seyirli insizyon yapıldı. Cilt ve ciltaltı panniculus carnosus dokusu geçildi ve eksternal juguler ven yapıları ortaya konuldu. İskemi modelleri oluşturulduktan 4 saat sonra sol eksternal juguler vene 26 gauge iğne yardımıyla 2 mg/kg indosiyanin yeşili uygulandı (Resim 9). Cihazın kamerası ölçüm yapılan fleplere 90° açı ile dik ve 30 cm uzaklıkta olacak şekilde ayarlandı. İndosiyanin yeşili uygulanmasından 20 saniye sonra SPY Elit System Görüntüleme Cihazı ile 10 saniye görüntü kaydedildi. Sağ kulaktaki flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (A alanı) dolaşımı referans alınarak Spy-Q Analysis Toolkit programı ile kaydedilen bu 10 saniyelik görüntü işlendi ve üst katman analizi yapıldı. Üst katman algoritması olarak ortalama seçildi. Relatif kantifikasyon modu kullanıldı. Elde edilen görüntüler daha sonra Image J programında analiz edildi. Bu analizde flep görüntüden ayrılıp kanlanan yüzeyin alanı ve değeri flebin toplam alanına göre ortalaması alındı. Elde edilen sonuç flebin ortalama relatif perfüzyon ünite (RPU) değeri olarak parametrik (% olarak) değerde kaydedildi. Sol kulak için alınan görüntüde, flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (B alanı) dolaşımı referans alındı ve analiz aynı şekilde yapıldı (Resim 10).

İskeminin oluşmasından 4 saat sonra, floresans analizinden hemen sonra, sağ eksternal juguler vene 10 ml %0,9 sodyum klorür yine 26 gauge iğne yardımıyla infiltre edildi. Ardından cilt 5-0 keskin iğneli polipropilen sütür ile sütüre edildi.

100 mg sildenafil sitrat (Viagra 10 mg, Pfizer İlaçları Ltd. Şti.) toz haline getirildi. 10 ml enjektöre aktarıldı ve %0,9 sodyum klorür ile 10 ml'ye tamamlandı. Ardından karıştırılarak 1 ml'de 10 mg sildenafil sitrat bulunan süspansiyon elde edildi. İskemi uygulandıktan sonra 4. saatten başlamak üzere, floresans analizinden hemen sonra, 3,5 mg/kg olacak şekilde hazırlanmış süspansiyon deneklere orogastrik sonda

ile 24 saatte 1, 14 gün boyunca uygulandı (Resim 12). Böylece sağ kulaklarda “deney grubu 3E”, sol kulaklarda ise “deney grubu 3K” oluşturulmuş olundu.

Resim 12: Sildenafil sitratın hazırlanması ve uygulanması

3.6.4. Denek Grubu 4

Bu denek grubunda bulunan 7 adet tavşanın kulaklarına denek grubu 1’de yapıldığı gibi iskemi modelleri oluşturuldu ve flepler aynı sütür materyali ile aynı sayıda ve aynı yerden yerlerine sütüre edildi.

Deneklerin mandibula simfizis bölgesinden 4 cm inferiorundan, orta hatta, 3 cm uzunluğunda, vertikal seyirli insizyon yapıldı. Cilt ve ciltaltı panniculus carnosus dokusu geçildi ve eksternal juguler ven yapıları ortaya konuldu. İskemi modelleri oluşturulduktan 4 saat sonra sol eksternal juguler vene 26 gauge iğne yardımıyla 2 mg/kg indosiyanin yeşili uygulandı (Resim 9). Cihazın kamerası ölçüm yapılan fleplere 90° açı ile dik ve 30 cm uzaklıkta olacak şekilde ayarlandı. İndosiyanin yeşili uygulanmasından 20 saniye sonra SPY Elit System Görüntüleme Cihazı ile 10 saniye görüntü kaydedildi. Sağ kulaktaki flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (A alanı) dolaşımı referans alınarak Spy-Q Analysis Toolkit programı ile kaydedilen bu 10 saniyelik görüntü işlendi ve üst katman analizi yapıldı. Üst katman algoritması olarak ortalama seçildi. Relatif kantifikasyon modu kullanıldı. Elde edilen

görüntüler daha sonra Image J programında analiz edildi. Bu analizde flep görüntüden ayrılıp kanlanan yüzeyin alanı ve değeri flebin toplam alanına göre ortalaması alındı. Elde edilen sonuç flebin ortalama relatif perfüzyon ünite (RPU) değeri olarak parametrik (% olarak) değerde kaydedildi. Sol kulak için alınan görüntüde, flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (B alanı) dolaşımı referans alındı ve analiz aynı şekilde yapıldı (Resim 10).

Toz halindeki 1500 IU hyalüronidaz içeren flakon, toplamda 10 ml olacak şekilde %0,9 sodyum klorür ile sulandırıldı. İskeminin oluşmasından 4 saat sonra, floresans analizinden hemen sonra, sağ eksternal juguler vene 500 IU/kg olacak şekilde hazırlanmış hyalüronidaz yine 26 gauge iğne yardımıyla infiltre edildi. Ardından cilt 5-0 keskin iğneli polipropilen sütür ile sütüre edildi.

100 mg sildenafil sitrat toz haline getirildi. 10 ml enjektöre aktarıldı ve %0,9 sodyum klorür ile 10 ml'ye tamamlandı. Ardından karıştırılarak 1 ml' de 10 mg sildenafil sitrat bulunan süspansiyon elde edildi. İskemi uygulandıktan sonra 4. saatten başlamak üzere, floresans analizinden hemen sonra, 3,5 mg/kg olacak şekilde hazırlanmış süspansiyon deneklere orogastrik sonda ile 24 saatte 1, 14 gün boyunca uygulandı. Böylece sağ kulaklarda "deney grubu 4E", sol kulaklarda ise "deney grubu 4K" oluşturulmuş olundu.

3.7. Cerrahi Sonrası Analjezi

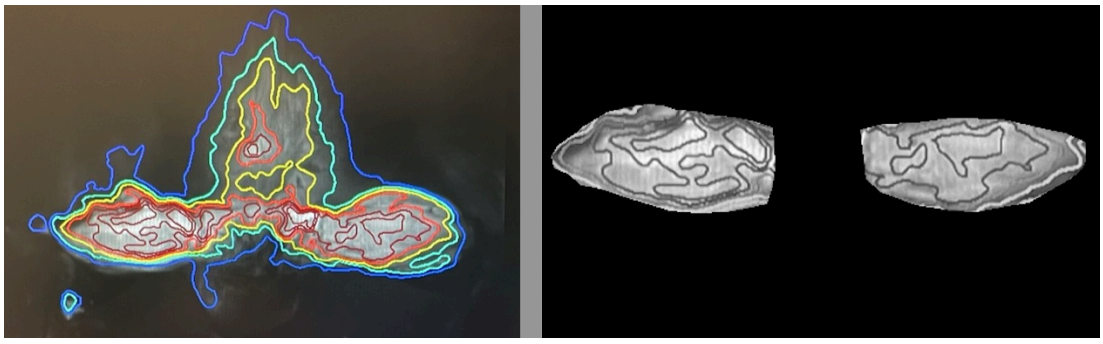
Operasyon sonrası ksilazin 5 mg/kg intramusküler olarak postoperatif analzeji için uygulandı. Daha sonrası ağrı açısından hayvanlar takip edildi. Gerekli hallerde morfin 0,1 mg/kg titre edilerek intravenöz olarak uygulandı.

3.8. Cerrahi Sonrası Takip ve Verilen Toplanması

Cerrahi sonrası insizyon hattı; hiperemi, ödem, enfeksiyon takibi açısından günlük olarak klorheksidin ve steril gazlı bez ile konvansiyonel pansuman yapılarak izlendi. Pansuman malzemelerinin korunmasının sağlamak ve otomutilasyonu engellemek için kumaştan yapılmış koruyucular giydirildi. Orogastrik sonda ile 24 saatte bir gruplara göre sildenafil sitratlı süspansiyon ya da %0,9 sodyum klorür deneklere uygulandı.

Çalışma öncesi, deney modeli oluşturma sonrası, tedavi uygulama öncesi, uygulama süresince ve sonrasında 24 saatte bir standart olarak fleplerin fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflarda flepler değerlendirildi.

Cerrahi sonrası 14. günde deneklere 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin klorür intramusküler olarak uygulanarak anestezi sağlandı. Gerekli anestezik etkinliğe ulaşıldıktan sonra boyun bölgesi %4 lük klorheksidinli antiseptik solüsyon ile silindikten sonra steril örtüler örtülerek steril saha oluşturuldu. Boyun bölgesindeki dikişler alınarak tekrar eksternal juguler venler ortaya konuldu. Sol eksternal juguler vene 26 gauge iğne yardımıyla 2 mg/kg indosiyanin yeşili uygulandı. Cihazın kamerası ölçüm yapılan fleplere 90° açı ile dik ve 30 cm uzaklıkta olacak şekilde ayarlandı. İndosiyanin yeşili uygulanmasından 20 saniye sonra SPY Elit System Görüntüleme Cihazı ile 10 saniye görüntü kaydedildi. Sağ kulaktaki flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (A alanı) dolaşımı referans alınarak Spy-Q Analysis Toolkit programı ile kaydedilen bu 10 saniyelik görüntü işlendi ve üst katman analizi yapıldı. Üst katman algoritması olarak ortalama seçildi. Relatif kantifikasyon modu kullanıldı. Elde edilen görüntüler daha sonra Image J programında analiz edildi. Bu analizde flep görüntüden ayrılıp kanlanan yüzeyin alanı ve değeri flebin toplam alanına göre ortalaması alındı. Elde edilen sonuç flebin ortalama relatif perfüzyon ünite (RPU) değeri olarak parametrik (% olarak) değerde kaydedildi. Sol kulak için alınan görüntüde, flebin hemen proksimalindeki işlem uygulanmamış derinin (B alanı) dolaşımı referans alındı ve analiz aynı şekilde yapıldı (Resim 13).



Resim 13: Sağda, iki haftanın sonunda tekrar SPY Elite System ve Spy-Q Analysis Toolkit ile yapılan analiz; solda, Image J programı ile yapılan analiz

3.9. Doku Biyopsisi Alınması

Cerrahi sonrası 14. günde görüntüleme sonrası denekler anestezi altında iken kulakları ampute edildi ve histopatolojik incelemeye alındı. Tüm aşamalar fotoğraflandı.

3.10. Ötenazi

Doku biyopsileri alındıktan sonra denekler anestezi altında iken 120 mg/kg pentotal (Ekipental 1gr Flakon, Tüm-Ekip İlaç A.Ş.) intravenöz verilerek ötenazi uygulandı.

3.11. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan doku örnekleri %10 tamponlu nötral formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edildikten sonra uygun örneklemeler alındı ve rutin parafin doku takip işlemine alındı. Doku takibi için otomatik doku takip sistemi kullanıldı. Elde edilen parafin blokların mikrotomda kesitlerinin alınmasının ardından kesitler otomatik boyama cihazında Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı.

Elde edilen H&E boyalı preparatlar DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı'nda dermatopatoloji konusunda deneyimli uzman patolog tarafından ışık mikroskobunda incelendi. Mikroskopik incelemede doku örneklerinde damar içi ya da damar çevresinde mukoid materyal birikimi, inflamasyon varlığı ve derecesi, fibroplazi varlığı ve derecesi, ödem varlığı ve derecesi semikantitaif olarak değerlendirildi.

Semikantitatif değerlendirme yöntemi:

- *İnflamasyon varlığı:* 0 (Yok), 1 (Hafif derecede), 2 (Orta derecede), 3 (Yoğun)
- *Fibroplazi varlığı:* 0 (Yok), 1 (Hafif derecede), 2 (Orta derecede), 3 (Yoğun)
- *Ödem varlığı:* 0 (Yok), 1 (Hafif derecede), 2 (Orta derecede), 3 (Yoğun)

3.12. İstatistiksel Değerlendirme

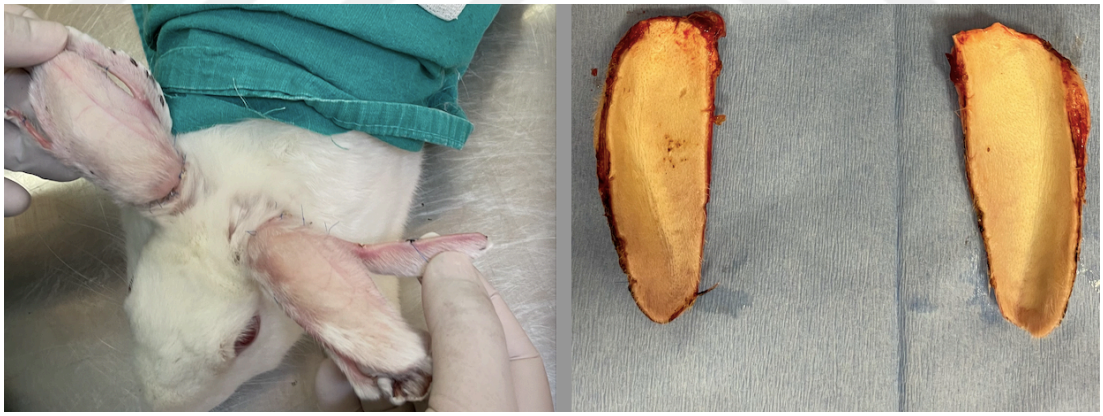
Çalışmanın istatistik analizleri için IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanıldı.

Nümerik değişkenlerin normal dağılım kontrolü varyans analizi sonrası elde edilen artık (residual) değerleri üzerinden Shapiro-Wilk Testi ile incelendi. Normal dağılıma uyum sorunu gözlenmediği için gruplar arası, modeller arası farklar ve etkileşim (interaction), Tekrarlayan Ölçümler İçin Varyans (parametrik yöntem) yöntemi ile değerlendirildi. Etkileşimin anlamlı bulunduğu durumlarda işlem öncesi değişkenler gruplar arsında Tek Yönlü Varyans Analizi ile karşılaştırılırken, ikili karşılaştırmalarda Post HOC yöntem olarak Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Gruplar arası işlem sonrası değerlendirmeler aynı yöntemler ile, hesaplanan fark (önce-sonra) değişkenleri üzerinden yapıldı. Varyans homojenlikleri Levene Testi ile kontrol edildi. Embolizasyon ile eksternal kompresyon modeli, tedavi öncesi ve sonrası değişimler grup içlerinde Eşleştirilmiş iki Örnek t-Testi ile değerlendirildi. Histopatolojik skorlar parametrik olmayan yöntemler ile değerlendirildi. Embolizasyon modeli ile eksternal kompresyon modeli kendi içindeki 4 grup arasında Kruskal-Wallis Testi ile karşılaştırıldı. Fark önemli çıkan değişkenler için iki karşılaştırmalarda Post HOC yöntem olarak Dunn (Bonferroni düzeltmesi ile) Testi kullanıldı. 4 grup kendi içinde modeller arası farklılığı bakımında Eşleştirilmiş iki Örnek Wilcoxon Testi ile incelendi. Tüm hipotez testleri 0,05 önem seviyesinde iki yönlü olarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Çalışma süresince denek kaybı yaşanmadı. Deneklerin hiçbirinde herhangi bir enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Her denek hemen deney öncesinde ve deney sonlandırılmadan hemen önce tartıldı. Ağırlık değişimleri kayıt altına alındı. Ağırlık miktarında azalma hiçbir denekte %10'un üzerine çıkmadı ve ağırlık kaybı nedeniyle deney dışı bırakılan denek olmadı. Tüm kulaklarının yüzey alanları hesaplandı.

Kulak fleplerinde, özellikle emboli modelinin uygulandığı sağ kulak fleplerinde, kısmi ya da tam nekroz beklenirken herhangi bir nekroz görülmedi. Kontrol gruplarında emboli modelinde ve eksternal kompresyon modelinde 2 hafta sonra flep distal kısımlarında kanlanmanın arttığı görüldü. Diğer gruplarda ise bu artışın kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu görüldü. Fleplerde nekroz görülmedi ancak deney sonunda kulak fleplerinde ebat olarak küçülme görüldü (Resim 14). Deneklerin bilateral kulaklarında ödematöz görünüm mevcuttu. Bazı deneklerin kulaklarında flep harici kalan çerçeve şeklindeki kulak dokusunda kopmalar görüldü.



Resim 14: Solda postoperatif 1. hafta görüntüsü, sağda sakrifikasyon sonrası alınan flebin görüntüsü

4.1. Deneklerin Fiziksel Özellikleri

Tüm denekler deney öncesinde ve deney sonlandırılmadan önce tartıldı. Veriler "kg" cinsinden kaydedildi. Hem gruplar arasında hem de zaman içinde anlamlı

fark olup olmadığına bakıldı. Deney öncesi yine tüm deneklerin toplam kulak alanları Image J programı ile ölçüldü. Veriler "cm^2" cinsinden kaydedildi. Gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığına bakıldı.

Tablo 5: Deney öncesi deneklerin ağırlıkları

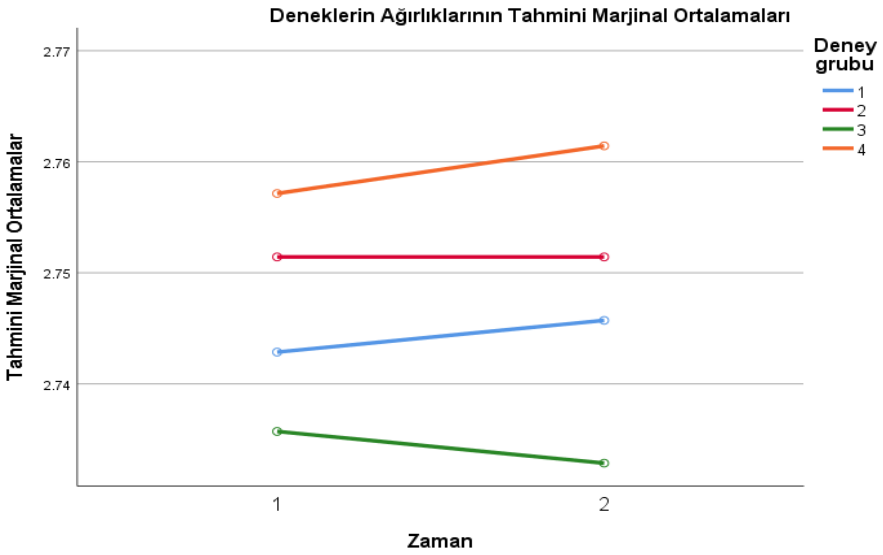
Denek Grubu	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
1	2,7429	7	0,12365	2,76	2,58	2,93
2	2,7514	7	0,13656	2,75	2,50	2,89
3	2,7357	7	0,17018	2,73	2,54	2,96
4	2,7571	7	0,15435	2,77	2,50	2,98
Toplam	2,746	28	0,13907	2,755	2,50	2,98

Deneklerin deney öncesi ağırlıkları istatiksel olarak analiz edildi. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 5). Deney öncesi gruplar standart olarak dağıtıldı. Deney öncesi ve sonrası deneklerin ağırlık değişimlerinde de istatiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 6) (Grafik 1).

Tablo 6: Deney sonrası deneklerin ağırlıkları

Denek Grubu	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
1	2,7457	7	0,14188	2,77	2,56	2,97
2	2,7514	7	0,14124	2,75	2,55	2,91
3	2,7329	7	0,15510	2,74	2,52	2,93
4	2,7614	7	0,14949	2,74	2,53	2,95
Toplam	2,7468	28	0,13903	2,745	2,52	2,97

Grafik 1: Deneklerin ortalama ağırlık değişimleri



Deneklerin, deney öncesi her iki kulaklarının da alanları ölçüldü. Elde edilen veriler istatiksel olarak analiz edildi. Gruplar arasında anlamlı fark olmadığı saptandı (Tablo 7).

Tablo 7: Deneklerin kulak alanları

Deney Grubu	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
1E	38,5443	7	0,29838	38,53	38,16	39,01
2E	38,6329	7	0,23436	38,60	38,34	38,94
3E	38,6757	7	0,28100	38,75	38,21	39,01
4E	38,6671	7	0,24703	38,73	38,33	38,97
1K	38,5457	7	0,29217	38,51	38,16	39,02
2K	38,6386	7	0,23801	38,62	38,31	38,98
3K	38,6771	7	0,28058	38,76	38,23	39,03
4K	38,6657	7	0,24778	38,73	38,31	38,99
Toplam	38,6309	56	0.256285	38,695	38,16	39,03

4.2. İndosiyanin Yeşili Floresans Görüntüleme Sonuçları

Deneklerin kulaklarında oluşturulan kompozit fleplere iki taraflı modeller oluşturulduktan sonra referans noktalar baz analınarak indosiyanin yeşili floresans

görüntüleme (İFG) analizler yapıldı (Tablo 8 ve Tablo 10). Kontrol grubuna bu süre zarfında herhangi bir ilaç tedavisi uygulanmazken, diğer gruplara planlanan ilaç tedavileri uygulandı. 2 hafta sonra ölçümler tekrarlandı (Tablo 9 ve Tablo 11). Aradaki fark istatistiksel analize tabi tutuldu. İlk önce embolizasyon modelleri kendi içinde değerlendirildi. Anlamlı fark var olup olmadığına bakıldı (Grafik 2).

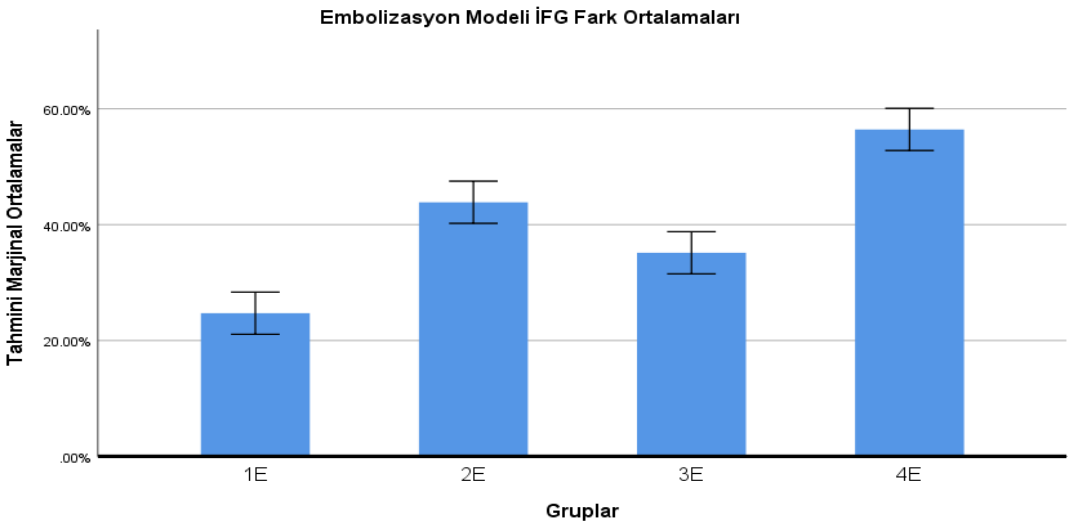
Tablo 8: Sağ kulaklarda embolizasyon modeli oluşturulduktan sonra İFG değerleri

Grup	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	Aralık
1E	0,0000%	7	0,00000%	0,0000%	0,00%	0,00%	0,00%
2E	0,0000%	7	0,00000%	0,0000%	0,00%	0,00%	0,00%
3E	0,0000%	7	0,00000%	0,0000%	0,00%	0,00%	0,00%
4E	0,0000%	7	0,00000%	0,0000%	0,00%	0,00%	0,00%
Toplam	0,0000%	28	0,00000%	0,0000%	0,00%	0,00%	0,00%

Tablo 9: Sağ kulaklarda embolizasyon modelinde 2. hafta sonundaki İFG değerleri

Grup	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	Aralık
1E	24,7143%	7	4,99047%	24,0000%	18,00%	32,00%	14,00%
2E	43,8571%	7	4,52506%	45,0000%	39,00%	50,00%	11,00%
3E	35,1429%	7	5,30498%	35,0000%	28,00%	42,00%	14,00%
4E	56,4286%	7	3,69040%	56,0000%	51,00%	61,00%	10,00%
Toplam	40,0357%	28	12,64467%	39,5000%	18,00%	61,00%	43,00%

Grafik 2: Embolizasyon modeli İFG fark ortalamaları ve %95 güven aralıkları



Emboli modelinde tüm gruplarda başlangıçta %0 değer ölçüldü. Bu tüm gruplarda başarılı bir embolizasyon modeli oluşturulduğunu gösterdi. Emboli modeli oluşturulan tüm gruplardaki fark istatiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). En az kanlanma artışı kontrol grubu olarak baz alınan 1E grubundaydı. Ancak bu artış ilk ölçüme göre istatiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Kanlanma artışının en fazla görüldüğü grup hyalüronidaz ve sildenafil sitratın ikili uygulandığı gruptaydı (4E). Tekli tedavide hyalüronidaz uygulaması (2E), sildenafil sitrat uygulamasına (3E) göre anlamlı olarak daha etkindi ($p<0,05$). Ama kontrol grubuna göre de sildenafil sitrat tedavisi anlamlı bir şekilde etkindi.

Eksternal kompresyon modelinde 1. ve 2. İFG ölçümlerine bakıldı (Tablo 10 ve Tablo 11). Birinci ölçümlerde istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu da oluşturulan modellerin tüm gruplarda standart olduğu göstermektedir. Daha sonra iki ölçüm arasındaki fark gruplar arasında analiz edildi (Tablo 12).

Tablo 10: Sol kulaklarda eksternal kompresyon modeli oluşturulduktan sonra İFG değerleri

Grup	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	Aralık
1K	33,7143%	7	4,49868%	32,0000%	30,00%	43,00%	13,00%
2K	33,0000%	7	3,55903%	32,0000%	30,00%	40,00%	10,00%
3K	33,4286%	7	4,31498%	32,0000%	29,00%	40,00%	11,00%
4K	33,8571%	7	3,02372%	33,0000%	29,00%	39,00%	10,00%
Toplam	33,5000%	28	3,68681%	32,5000%	29,00%	43,00%	14,00%

Tablo 11: Sol kulaklarda eksternal kompresyon modelinde 2. hafta sonundaki İFG değerleri

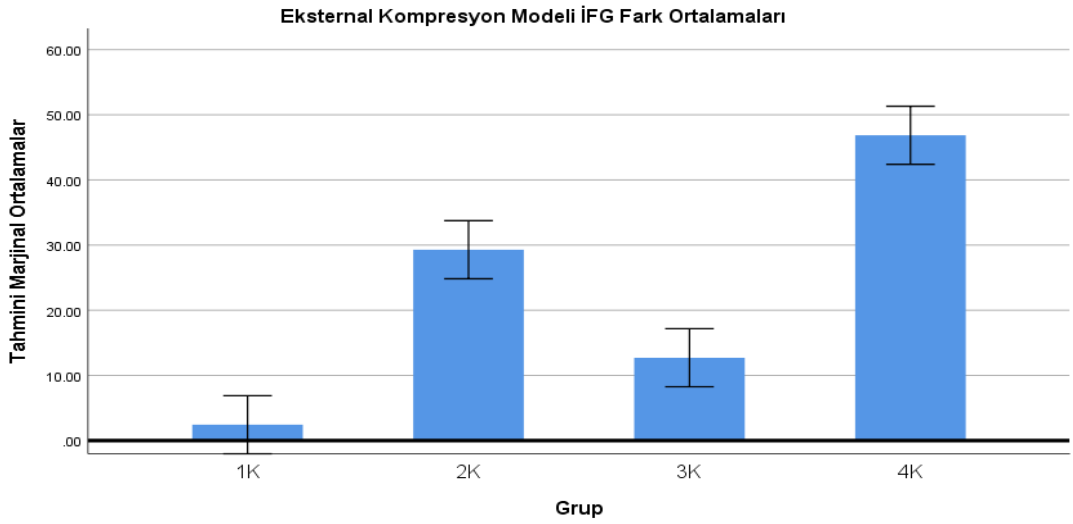
Grup	Ortalama	N	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	Aralık
1K	36,1429%	7	2,11570%	36,0000%	33,00%	40,00%	7,00%
2K	62,2857%	7	5,37631%	61,0000%	55,00%	70,00%	15,00%
3K	46,1429%	7	6,69399%	48,0000%	37,00%	55,00%	18,00%
4K	80,7143%	7	10,51529%	84,0000%	63,00%	94,00%	31,00%
Toplam	56,3214%	28	18,38085%	55,0000%	33,00%	94,00%	61,00%

Tablo 12: Eksternal kompresyon modelinde İFG ölçüm farkları

Gruplar	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Ortalama için %95 Güven Aralığı		Mini-mum	Maksi-mum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
1K	7	2,4286	2,76026	1,04328	-0,1242	4,9814	-3,00	6,00
2K	7	29,2857	6,34335	2,39756	23,4191	35,1523	21,00	38,00
3K	7	12,7143	4,27061	1,61414	8,7646	16,6639	7,00	18,00
4K	7	46,8571	8,02971	3,03494	39,4309	54,2834	34,00	55,00
Total	28	22,8214	17,99805	3,40131	15,8425	29,8003	-3,00	55,00

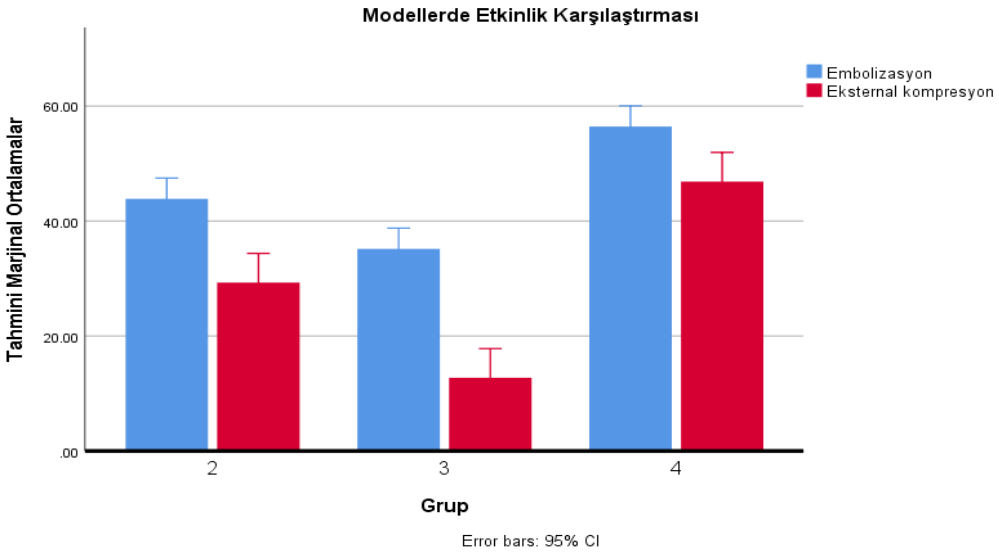
İFG ölçüm farkı açısından tüm gruplarda anlamlı fark mevcuttu (p<0,005). Yine en fazla kanlanma artışı ikili tedavinin uygulandığı grupta (4K) görüldü (p<0,005) (Grafik 3). Tekli tedavi bakımından hyalüronidaz (2K), sildenafil sitrata (3K) göre daha etkin bir kanlanma artışı sağladı (p<0,05). Sildenafil sitrat, kontrol grubuna (1K) göre daha anlamlı artış sağlasa da tek başına uygulandığında hyalüronidaza göre daha az etkinliğe sahipti (p<0,05).

Grafik 3: Eksternal kompresyon modeli İFG fark ortalamaları ve %95 güven aralıkları



İFG değerlerine göre modeller karşılaştırıldığında Tüm tedavilerin embolizasyon modelinde daha etkin olduğu görüldü (Grafik 4). Aralarındaki fark istatiksel olarak anlamlıydı (p<0,05). Sildenafil sitrat embolizasyon modelinde diğerlerine göre daha güçlü etki gösterdi (p<0,05).

Grafik 4: Modellerde ilaçların etkinlik karşılaştırması



4.3. Flep Alanları Karşılaştırması

Tüm kulaklardan standart ebatlarda (17,02 cm^2) flep oluşturulduktan sonra deney sonrası tekrar fleplerin alanları ölçüldü. Kontrol grubunda belirgin bir küçülme görüldü. Flep ebatları Image J programı ile ölçüldü (Tablo 13).

Tablo 13: Deney sonrası fleplerin ebatları

Grup		N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Yanılma ortalaması
Denek Grubu 1	1E	7	13,48857	0,442396	0,167210
	1K	7	15,19429	0,513513	0,194090
Denek Grubu 2	2E	7	15,90429	0,283423	0,107124
	2K	7	16,48000	0,360278	0,136172
Denek Grubu 3	3E	7	14,43857	0,475690	0,179794
	3K	7	15,40143	0,352109	0,133085
Denek Grubu 4	4E	7	16,10429	0,230641	0,087174
	4K	7	16,67143	0,324470	0,122638

Flep ebatlarındaki değişim istatiksel olarak analiz edildi. Tüm Gruplardaki ebat değişimi kendi içinde anlamlı olarak küçüktü (Tablo 14). Deneyimizde oluşturduğumuz flep modellerinde, 2 haftalık takip sonucu fleplerde belirgin küçülme görüldü.

Tablo 14: Flep Ebat değişimlerinin analizi

Grup		Test Değeri = 17.02				
		% Fark	Anlamlılık	Ortalama Fark	Farkın %95 Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Denek Grubu 1	1E	-21,120	0,000	-3,531429	-3,94058	-3,12228
	1K	-9,407	0,000	-1,825714	-2,30063	-1,35079
Denek Grubu 2	2E	-10,415	0,000	-1,115714	-1,37784	-0,85359
	2K	-3,966	0,007	-0,540000	-0,87320	-0,20680
Denek Grubu 3	3E	-14,358	0,000	-2,581429	-3,02137	-2,14149
	3K	-12,162	0,000	-1,618571	-1,94422	-1,29292
Denek Grubu 4	4E	-10,504	0,000	-0,915714	-1,12902	-0,70241
	4K	-2,842	0,029	-0,348571	-0,64866	-0,04849

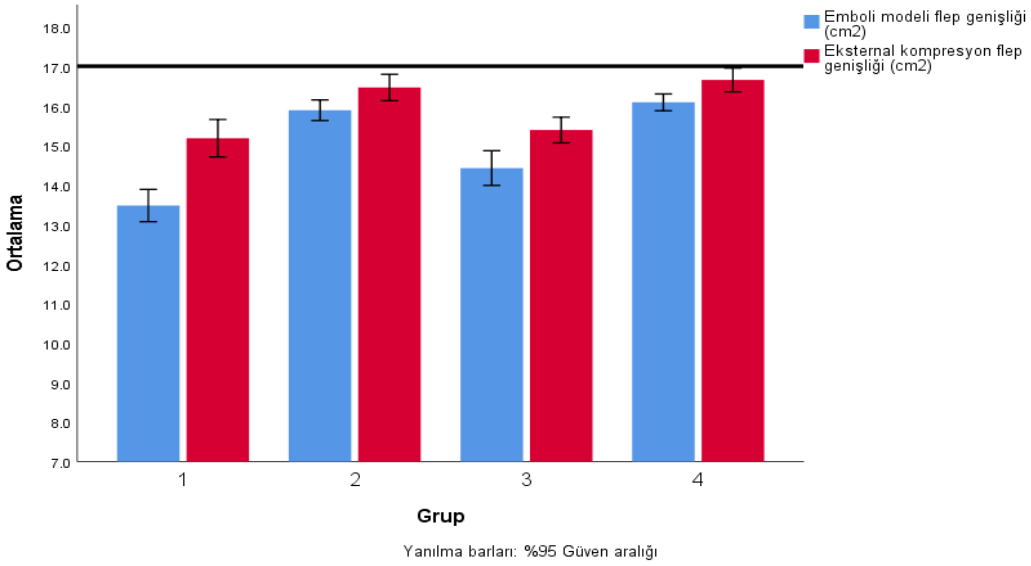
Flep ebatlarındaki küçülme ilk önce embolizasyon modeli gruplarında değerlendirildi. Kontrol grubundaki (1E) küçülme diğer gruplardakine göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0,05$). En az küçülme hyalüronidaz (2E) ve ikili tedavi uygulanan gruptaydı (4E) ($p<0,05$). Ancak hyalüronidaz ve ikili tedavinin uygulandığı gruplarda anlamlı olarak fark bulunmuyordu ($p=0,749$). Sildenafil sitrat uygulanan gruptaki (3E) küçülme ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak az olmakla birlikte, diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0,05$).

Flep ebatlarındaki küçülme daha sonrasında eksternal kompresyon grupları arasında değerlendirildi. Kontrol grubundaki (1K) küçülme, hyalüronidaz (2K) ve ikili tedavi uygulanan gruptaki (4K) küçülmelere göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0,05$). Sildenafil sitrat uygulanan grupla (3K) arasında anlamlı bir fark bulunmuyordu ($p=0,761$). Hyalüronidaz ve ikili tedavi uygulanan grupta anlamlı bir fark bulunmuyordu ($p=0,801$). Ancak hem hyalüronidaz hem de ikili tedavi uygulanan

gruplarda sildenafil sitratın uygulandığı gruba göre anlamlı fark bulunuyordu ($p<0,05$).

Tüm modelleri birbiri ile karşılaştırıldığında eksternal kompresyon modelinde flep küçülmesi tüm gruplarda istatiksel anlamlı olarak daha azdı ($p<0,05$).

Grafik 5: Grupların deney sonu flep ebat ortalamalarının deney öncesine göre karşılaştırması

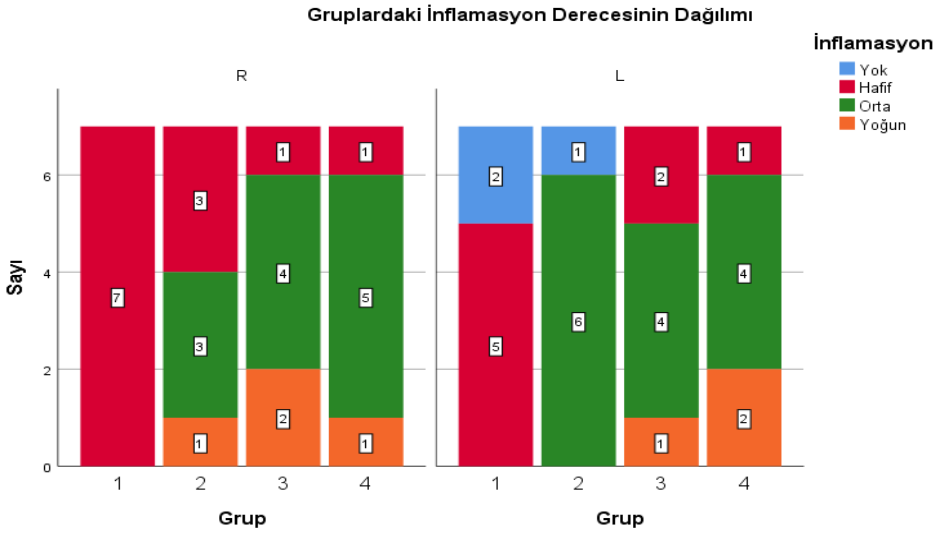


Tüm gruplar incelendiğinde emboli modellerinde uygulanan hem tekli tedaviler hem de ikili tedavi eksternal kompresyon modeline göre daha anlamlı olarak flep küçülmesini azalttı ($p<0,05$).

4.4. Histopatolojik İnceleme

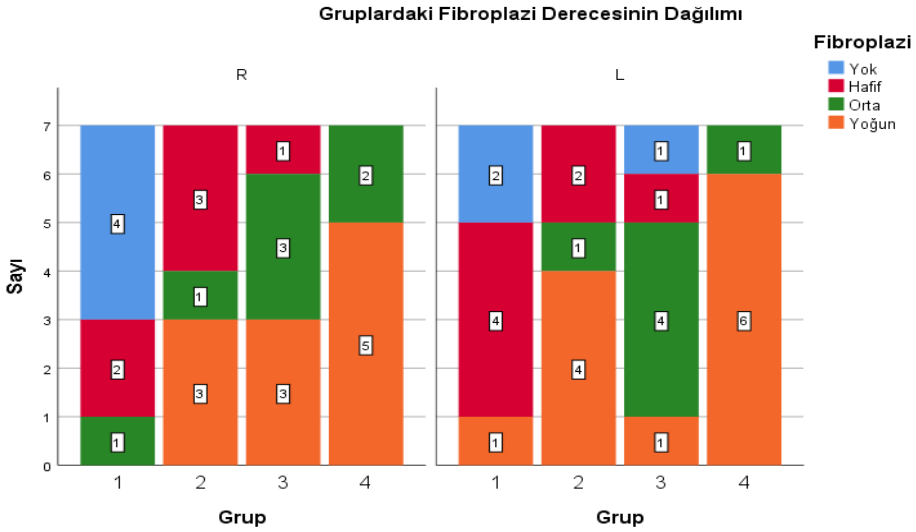
Tüm kulaklar deney sonrası ampute edildikten sonra histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Doku örneklerinde damar içi ya da damar çevresinde mukoid materyal (hyalüronik asit) birikimi, inflamasyon varlığı ve derecesi, fibroplazi varlığı ve derecesi, ödem varlığı ve derecesi semikantitaif olarak değerlendirildi. Sonuçlar istatiksel analize tabi tutuldu.

Grafik 6: Gruplardaki inflamasyon derecesinin dağılımı (sağ taraf embolizasyon grupları-sol taraf eksternal kompresyon grupları)



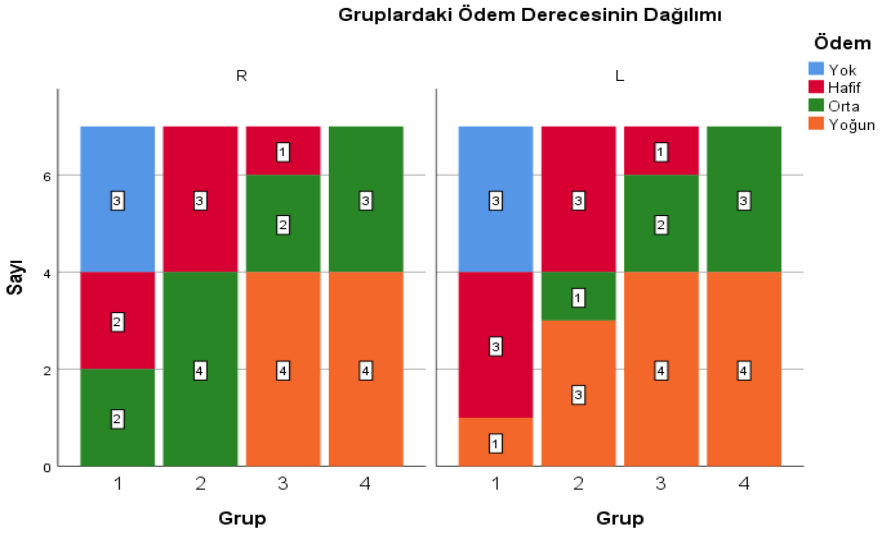
Embolizasyon modelinde, en az inflamasyon kontrol grubunda (1E) görüldü. Diğer gruplarda inflamasyon derecesi daha yüksekti (Grafik 6). Kontrol grubuna göre sildenafil sitrat tedavisinin (3E) ve ikili tedavinin (4E) uygulandığı grupta inflamasyon anlamlı olarak daha yüksek derecedeydi ($p<0,05$). Sadece hyalüronidaz uygulanan grupta (2E) da kontrol grubuna göre daha yüksek derece inflamasyon görülmüşse de fark istatiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,283$). Eksternal kompresyon modelinde ise yine en düşük dereceli inflamasyon kontrol grubunda (1K) görülürken diğer gruplarda daha yüksekti. Ancak bu yükseklik sadece ikili tedavinin uygulandığı grupta (4K) anlamlı derecedeydi ($p<0,05$).

Grafik 7: Gruplardaki fibroplazi derecesinin dağılımı (sağ taraf embolizasyon grupları-sol taraf eksternal kompresyon grupları)



Embolizasyon modelinde, fibroplazinin en düşük derecede görüldüğü grup yine kontrol grubuydu (1E) (Grafik 7). Sildenafil sitrat uygulanan grupta (3E) ve ikili tedavi uygulanan grupta (4E) fibroplazi anlamlı derecede daha yüksek yoğunluktaydı ($p<0,05$). Hyalüronidaz uygulanan grupta (2E) anlamlı fark bulunmuyordu ($p=0,142$). Eksternal kompresyon modelinde ise yine en düşük dereceli fibroplazi kontrol grubunda (1K) görülürken diğer gruplarda daha yüksekti. Ancak bu yükseklik sadece ikili tedavinin uygulandığı grupta (4K) anlamlı derecedeydi ($p<0,05$). Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı.

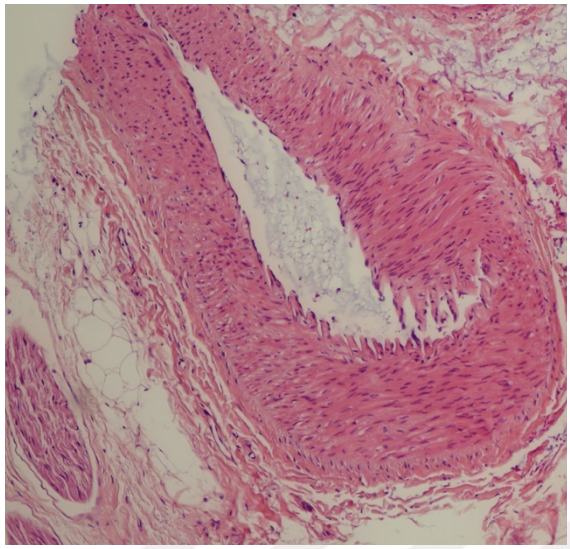
Grafik 8: Gruplardaki ödem derecesinin dağılımı (sağ taraf embolizasyon grupları-sol taraf eksternal kompresyon grupları)



Embolizasyon modelinde, ödemin en düşük derecede görüldüğü grup yine kontrol grubuydu (1E) (Grafik 7). Sildenafil sitrat uygulanan grupta (3E) ve ikili tedavi uygulanan grupta (4E) ödem anlamlı derecede daha yüksek derecedeydi ($p<0,05$). Hyalüronidaz uygulanan grupta (2E), kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmuyordu ($p=1,00$). Eksternal kompresyon modelinde ise yine en düşük dereceli fibroplazi kontrol grubunda (1K) görülürken diğer gruplarda daha yüksekti. Ancak bu yükseklik sadece ikili tedavinin uygulandığı grupta (4K) anlamlı derecedeydi ($p<0,05$). Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı.

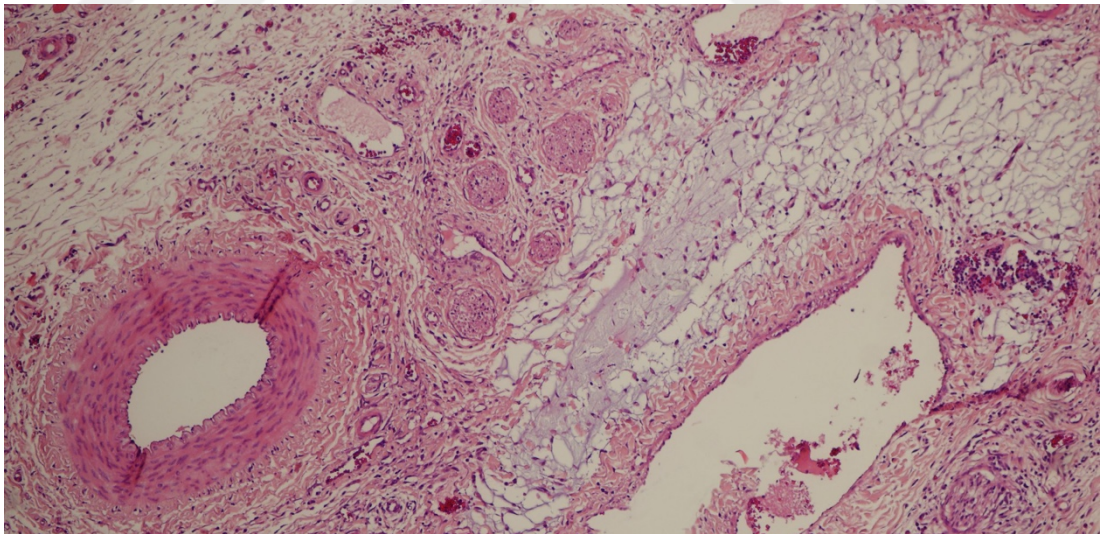
İnflamasyon, fibroplazi ve ödem açısından modeller karşılaştırıldığında embolizasyon modeliyle, eksternal kompresyon modeli arasında anlamlı fark bulunmadı.

Embolizasyon modelinde kontrol grubu olarak kullanılan deney grubu 1E'de damar içindeki hyalüronik asit embolisinin zaman içinde rekanalize olduğu görüldü. Ancak damar içinde hala yer kaplayan yabancı cisim olarak kaldığı görüldü. Distal kapiller damarlarda görülen hyalüronik asit artıkları; ilk uygulanan bölgeden kopan parçaların distalde daha küçük damarları tıkayarak mikroemboliler oluşturduğu görüldü (Resim 15). Makroskobik nekroz görülmemesi rekanalizasyona bağlı olduğu düşünüldü.



Resim 15: Distal damarlardaki mikroemboliler

Eksternal kompresyon modelinde uygulanan tedavilerle birlikte damar fasyasında hyalüronik asit dolgunun yayıldığı ve hacim kaybettiği görüldü.



Resim 16: Eksternal kompresyon modelinde yayılımı artan hyalüronik asit dolgusu

5. TARTIŞMA

İnsan güzelliğinin evrensel bir ideali varmış gibi görünse de, farklı ırklar ve kültürler arasında güzellik standartlarında küçük ama önemli farklılıklar da vardır [179]. Fasiyal güzelliğin evrensel nitelikleri ise cinsel dimorfizm ve ortalamalılığın yanı sıra genç ve simetrik bir yüzdür [180]. Cinsiyete göre toplum ortalamasında yüz hatlarında olmak ve takvim yaşına göre daha genç görünmek toplumda istenen estetik beklentidir. Son derece karmaşık fakat henüz tam olarak anlaşılmamış bir süreç olan cilt yaşlanması, sürekli artan yaşam beklentisi nedeniyle rejuvenasyon açısından hep ilgi alanı olmuştur [35]. Rejuvenasyon açısından bulunduğumuz dönemde insanlar günlük aktivitelerinde uzak kalmadan, minimal invaziv, hemen etki gösteren, sosyal hayatlarını kısıtlamayan, hızlı iyileşme süreci sağlayan, ucuz teknikler aramaktadırlar. Toplum invaziv estetik cerrahi işlemlerin getirdiği problemlerden kaçmakta; ağrısız, kolay yöntemlerle genç ve güzel görünebilmenin yollarını aramaktadır [181].

Yumuşak doku dolguları, kısa uygulama ve iyileşme süresiyle yüz gençleştirme arayan hastalar için ideal bir seçenektir. Ameliyat gerektirmeyen genç hastalar için bu malzemeler uygun bir seçenek sunar. Ciltte ve ciltaltı dokuda yumuşak doku hacmi artırmaya yönelik olarak parafin ilk olarak 1800'lerin başında kullanıldı, ancak önemli komplikasyonlarla karşılaşıldı [77]. Bu süreç boyunca birçok otolog, sentetik, biyolojik dolgu maddeleri denenmişse de ideal dolgu maddesine ulaşılamamıştır.

Günümüzde hyalüronik asit dolguları popülerliğini korumaktadır. Çünkü hyalüronik asit molekülü evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur. Türe özgü olmamakla birlikte yalnızca sınırlı bir immünolojik ret potansiyeli mevcuttur [81]. Hyalüronik asit, tüm türlerde aynıdır. Aynı zamanda düşük immünolojik ret, insanlarda yüksek kabul edilebilirlik demektir [182]. Orijinal yapısıyla hızlı yıkım süresine sahip olan hyalüronik asidin kalıcılığını arttırmak için çapraz bağ teknolojisi geliştirilmiş, çapraz bağ oluşturmak için BDDE ve divinil sulfon kullanılmıştır [83]. Divinil sulfon düşük dozlarda bile hyalüronik aside yeterli sertliği sağlayabilse de toksik madde olduğundan günümüzde çok nadir kullanılmaktadır [85]. Oluşturulan çapraz bağ sayısı ile kalıcılığı ve sertliği ayarlanarak daha etkili bir dermal dolgu

maddesi haline getirilmektedir. Aynı zamandan hyalüronik asit dolguların kollajen sentezini stimüle ettiği Wang ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur [183].

Doku uyumu ve ek etkiler açısından çok ciddi avantajlara bağlı olması yanında komplikasyon ihtimali yüzde sıfır değildir. Hyalüronik asit dolgularının komplikasyon insidansının düşük ve yan etkilerinin çoğunun hafif olmasına rağmen, işlem sayısındaki artış, komplikasyon sayısında eş zamanlı artışa neden olmuştur [92]. Komplikasyonlar hastayla ilişkili, üretime dayalı ve uygulanan prosedürle ilişkili nedenlere bağlı olarak gelişebilir, ancak çoğunlukla multifaktöriyeldir [93]. Dolgu maddeleri; şişme, morarma, yüzey deformitesi ve enfeksiyon gibi hafif ve geçici komplikasyonlarla ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte, dolgu maddelerinin artan kullanımı ile kutanöz vasküler komplikasyonlar ve görme kaybı gibi ciddi komplikasyonlar daha sık bildirilmektedir [77], [114], [116], [184]–[186]. Dolgu sonrası görme kaybı, hasta için nadir fakat katastrofik bir komplikasyondur. Genel olarak 3 farklı mekanizma ile gelişir. Bunlar eksternal vasküler kompresyon, vasküler spazm ve intravasküler embolizasyon mekanizması şeklindedir [105]. Vasküler bir olayın tanımak ve potansiyel olarak geri dönüşü olmayan komplikasyonlardan kaçınmak için hızlı ve agresif tedavi gereklidir [106], [107]. Artan sayıda dolgu prosedürlerinin uygulanmasına bağlı, gelecekte komplikasyonların artması da muhtemeldir [186]. Dolgu enjeksiyonu uygulayıcıları, yüz damar anatomisi ve damar tehlike bölgeleri hakkında anatomik ve pratik bilgiye sahip olmalıdır. Önleme ve yönetim stratejileri de dahil olmak üzere dolgu maddesiyle ilgili olası komplikasyonları anlamak zorunluluk haline gelmiştir.

Hyalüronik asidin, hyalüronidaz gibi bir çözücüye de sahip olması diğer birçok dolgu maddelerine karşı ön plana çıkmasına neden olmaktadır. Ancak her ne kadar spesifik bir çözücü olsa da vasküler komplikasyonların tedavisinde hyalüronidaz tek başına yetmemektedir. Uygulanan hyalüronidaz tedavisinin etkinliğini kanıtlayan çalışmalar mevcut ise de bu komplikasyonlara yönelik acil tedavi protokolü oluşturmaya, tedavi modalitelelerinin etkinliklerini göstermeye, birbiri ile karşılaştırmaya yönelik klinik ve deneysel çalışma literatürde bulunmamaktadır. Literatür incelendiğinde bu gibi iskemi durumlarında uygulanacak tedavi daha çok uzman görüşü niteliğindedir [93]. Bu görüşler içinde hyalüronidaz, sıcak kompres, masaj, nitrogliserin, asetilsalisilik asit, heparin, steroid, hiper barik oksijen tedavisi

uygulamaları ve sildenafil gibi vasodilatatörler ilaç uygulamaları bulunmaktadır [93]. Aynı zamanda intravasküler hyalüronik asidin koagülasyon ve agregasyon kaskadını aktive etmesinden dolayı antitrombotik tedavinin etkinliği gösteren ve hyalüronidaz ile trombolitik uygulanmasını öneren çalışmalar da mevcuttur [121].

Hyalüronik asit dolgunun vasküler komplikasyonlarını tedavi etmeye yönelik olarak yapılan çalışmalar genellikle tavşan kulağında çalışılmıştır. 2011 yılında Kim ve arkadaşları in vivo tavşan kulak modelinde, arterin hyalüronik asit dolgusuyla tıkanmasını takiben uygulanan erken veya geç subkutan hyalüronidaz enjeksiyonlarının, cilt nekrozunu önleyip önleyemeyeceğini değerlendirmiştir [187]. Bu çalışmada, kulağa hyalüronik asit dolgusu enjeksiyonundan 4 saat sonra ve 24 saat sonra salin kontrollü hyalüronidaz enjekte edilmiş ve sonuçta gelişen cilt nekrozu analiz edilmiştir. Her iki grupta da salin solüsyonu infiltre edilen kulaklarda yaygın cilt nekrozu gelişmiş. İlginç bir şekilde, hyalüronidaz enjekte edilen grupta, 24 saat sonra tedavi edilen kulaklarda da yaygın nekroz gelişirken, 4 saat sonra hyalüronidaz ile infiltre edilen kulaklarda herhangi bir nekroz gözlenmemiştir. Bu nedenle, hyalüronik asit dolgu enjeksiyonlarını takiben vasküler komplikasyon gelişen vakalarında, vasküler oklüzyondan sonraki ilk 4 saat içinde uygulanacak hyalüronidaz enjeksiyonunun başarı olasılığının daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Wang ve arkadaşları aynı tavşan kulağı modelini kullanarak, vasküler lümeni tıkayan hyalüronik asit dolgu maddesini dağıtmak için subkutan ya da intravenöz hyalüronidaz uygulamasından hangisinin daha etkin olduğu incelemiştir [188]. Bu çalışmada, ilk olarak hyalüronik asit dolgu maddesi tavşan kulağının ana arterlerine enjekte edilmiş. Bu şekilde oluşturulan emboliden hemen sonra bir gruba subkutan olarak hyalüronidaz, diğer gruba ise intravasküler hyalüronidaz verilmiş. İki hafta sonunda yapılan değerlendirmede, yazarlar, subkutan hyalüronidaz enjeksiyon yapılan grupta, intravasküler enjeksiyona yapılan gruba göre daha az nekroza geliştiğini bulmuşlardır. Bu nedenle vasküler tıkanıklık vakalarında, etkilenen alana subkutan olarak büyük hacimlerde hyalüronidaz infiltrasyonu önerilir.

Won Lee ve arkadaşlarının yaptığı başka bir tavşan çalışmasında hyalüronik asit dolgusu ile retinal arter oklüzyonu oluşturulmuş ve retrobulber hyalüronidaz enjeksiyonun etkisi incelenmiş [118]. Sonuçların elektroretinogram ile incelendiği bu çalışmada retrobulber enjeksiyonun etkili olduğu gösterilmiş. Klinik uygulamada

hyalüronik asidin retrograd olarak retinal arteri tıkadığı durumlarda, bir perivasküler uygulama çeşidi sayılabilecek bu retrobulber uygulama, dolgunun hızlı erimesine ve iskemi süresi son derece kısa olan retinanın tekrar revaskülerize olmasını sağlayabilir. Retinal arterin iskemisi; retinanın iskemiye dayanma süresinin kısa olması, uç-arter olması nedenli acil müdahale edilmesi gereken, müdahale için zamanın çok değerli olduğu bir komplikasyondur. Yine yüz cildini besleyen kaynak arterlerde gelişen bu bibi vasküler komplikasyonlarda ciltte ve burun bölgesi gibi kompozit dokularda nekroz gelişebilmektedir. Bu vasküler komplikasyonları önleme ve korumada, erken ve etkin tedavi çok önemlidir. Estetik amaçlarla uygulanan hyalüronik asit dolgusu enjeksiyonuna bağlı böyle bir vasküler komplikasyon gelişmesi oldukça katastrofiktir.

Sildenafil sitrat, fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) inhibitörleri ilaç sınıfına aittir. PDE5, penisin erektil dokusu olan korpus kavernozumda, retina ve vasküler endotelde bulunur [161]. Sildenafil sitratın endotel hücre fonksiyonu ve hücresel apoptoz üzerine doğrudan etkisi ile doku iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğu da bilinmektedir [165]. Ayrıca, ilaç vasküler düz kas gevşemesini indükleyerek vazodilatasyonu uyarır [166]. Kılcal damarlar damar düz kaslarına sahip olmamasına rağmen, arteriyolden gelen kan akışının miktarına bağlı olarak pasif olarak genişler ve böylece mikro dolaşım doku perfüzyonu artar. Sildenafil sitrat, trombosit agregasyonunu engelleyerek küçük damar tıkanıklığını önleyebilir [167]. Aynı zamanda neovaskülerizan özelliği de gösterilmiştir. Hyalüronik asit dolgu uygulamalarına bağlı gelişen vasküler komplikasyonlarda ve doku nekrozunda önerilen tedaviler arasında sildenafil sitrat uygulanması da bulunmaktadır [93]. Diğer birçok öneride olduğu gibi bu öneride uzman görüşü niteliğindedir.

Tüm iskemi durumlarında uygulanan tedavilerde ilaç plazmaya karışmakta ve plazmada belirli bir konsantrasyona ulşamaktadır [189], [190]. İntravenöz olarak hızlı bir etkin kontrasyona ulaşan ilaç uygulamalarına göre oral ilaç uygulamalarında belirli bir süre tekrarlayıcı uygulama gerekmektedir. Plazmada etkin kontrasyona ulaşan ilaç tüm vücuda eşit konsatrasyonda dağılmaktadır. İntravenöz uygulanan hyalüronidaz ve oral uygulanan sildenafil sitrat kanda belirli konsatrasyondayken iskemik yerde etki gösterecek etkinliğe ulaşır.

Literatür incelendiğinde hyalüronik asit dolgusuna bağlı gelişen vasküler komplikasyonların tedavisinde ana tedaviyi hyalüronidaz oluşturduğu açıktır. Ancak

hyalüronidaz ile sildenafil sitratın birlikte etkinliği gösteren ya da karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmamızı planlarken hyalüronidaz ile sildenafil sitratın birlikte etkisinin, tek başına hyalüronidaza göre etkinliğini karşılaştırmayı hedefledik. Aynı zamanda bu etkiyi incelerken embolizasyon mekanizmasına ek olarak, literatürde çalışması bulunmayan eksternal kompresyon mekanizmasına göre de değerlendirme yaptık.

Hyalüronik asit dolgu komplikasyonlarına ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda sıklıkla tavşan kullanılmaktadır [118], [121], [191]. Bizim de çalışmamızda denek olarak Yeni Zelanda tavşanı kullanmamızın nedeni, köken aldığı benzer bir çalışmada bu türün kullanılmasıdır [145]. Diğer nedenler ise tavşanın kulağını besleyen ana vasküler yapılar olması ve insan yüzündeki kıkırdak içeren kompozit (burun, kulak, göz kapağı vs.) yapılara benzerlik göstermesidir.

Li ve arkadaşlarının yaptığı deneyde oluşturulan kulak flebinde, intraarteriyel olarak uygulanan hyalüronik asit dolgusuna bağlı olarak, kontrol grubunda belirgin bir nekroz geliştiğini göstermiştir [145]. Çalışmanın sonucunda 4. saate kadar uygulanan hyalüronidazın istatistiksel olarak anlamlı şekilde nekrozlu alanı küçülttüğü gösterilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda denek grubu 2'ye (deney grubu 2E ve 2K) ve ikili tedavinin uygulandığı denek grubu 4'e (deney grubu 4E ve 4K) 500 IU/kg hyalüronidaz 4. saatte tek doz olacak şekilde intravenöz uygulandı. Hyalüronidaz uygulanmayan gruplara ise yine 4. saatte aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı. Vitor ve arkadaşlarının yaptığı çalışma baz alınarak, denek grubu 3 (deney grubu 3E ve 3K) ve denek grubu 4'e (deney grubu 4E ve 4K) sildenafil sitrat 3.5 mg/kg/gün dozunda serum fizyolojik ile hazırlanmış süspansiyon ile 14 gün boyunca orogastrik sonda ile olarak uygulandı [119]. Sildenafil sitrat tedavisi uygulanmayan deneklere ise standardizasyon için orogastrik sonda ile aynı miktarda serum fizyolojik uygulandı. Etki değerlendirmesi yapabilmek için iskemi modelleri oluşturduktan 4 saat sonra, tedavi uygulanmadan hemen önce indosiyanin yeşili floresans anjiografi ile ölçümler yapıldı. İkinci ölçümler ise 2 hafta sonra yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark incelendi. İkinci haftanın sonunda fleplerin alanları tekrar ölçüldü ve ilk flep ebatına göre değişim oranına bakıldı.

Çalışmamızın planında bir denekte iki farklı iskemi modeli oluşturuldu ve tedavi uygulamasının sistemik olması gözetildi. Bu şekilde çalışmada hem denek

sayısı azaltılmış olundu hem de çalışmada maliyet düşürülmesi hedeflendi. Deneklerdeki eksternal kompresyon mekanizmasıyla oluşturulan iskemi ile, literatürde ilk kez bu mekanizmayla tedavi etkinliği değerlendirilmiş olundu. Yine literatür incelendiğinde kulak modellerinde flep nekroz alanları karşılaştırıldığı görülmekteyken, bizim çalışmamızda floresans anjiografi kullanıldı. Böylece vasküler yatak etkilenmesini daha kantitatif ve etkin bir şekilde değerlendirmiş olundu.

Birinci indosiyanin yeşili floresans görüntüleme sonuçları tüm fleplerde başarılı bir şekilde iskemi modeli oluşturulduğunu gösterdi. Ancak çalışmamızın kontrol grubu olarak kullanılan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan denek grubu 1'deki fleplerde beklenenin aksine hiç nekroz görülmedi. Bu bulgu literatürdeki embolizasyon ile nekroz oluşturulan diğer çalışmalarla ters düşmektedir. İki hafta sonra yapılan anjiografi ölçümleri gösteriyor ki; bir süre sonra rekanalizasyon gelişmekte ancak referans noktaya göre kanlanma zayıf kaldı. Bu durum kullandığımız dolgunun fizikokimyasal özelliğine ve hayvanlarda görülen hızlı iyileşme özelliğine bağlanabilir. İkinci ölçümde referans noktaya göre daha az kanlanma olması ve histopatolojik incelemelerde daha distaldeki küçük damarlarda bulunan hyalüronik asit dolgu partikülleri, ilk uygulanan yerdeki hyalüronik asidin zaman içinde koparak daha distal emboliler oluşturduğunu gösterdi.

Embolizasyon modelinde, indosiyanin yeşili floresans görüntülemenin analiz sonuçları, fleplerde en fazla kanlanma artışa yapan tedavinin hyalüronidaz ve sildenafil sitrat ikili tedavisi olduğunu gösterdi. Daha sonra bunu tekli hyalüronidaz tedavisi, onu da tekli sildenafil sitrat tedavisi izledi. Sildenafil sitrat vazodilatör bir ilaç olmasına rağmen her iki iskemi modelinde de kontrol grubu göre anlamlı bir kanlanma artışı sağladı. Ancak bu etki hyalüronidaz kadar değildi. Hyalüronidaz ile sildenafil sitratın birlikte kullanımı anlamlı bir şekilde en etkin tedaviyi oluşturmaktadır.

Eksternal kompresyon modelinde, indosiyanin yeşili floresans görüntülemenin analiz sonuçları, embolizasyon modelindeki sonuçlar ile benzerlik gösterdi. En fazla kanlanma ikili tedavinin uygulandığı grupta görüldü. Yine bunu hyalüronidaz, daha sonrasında ise sildenafil sitrat uygulanan gruplar izledi. Sildenafil sitrat, eksternal kompresyon modelinde de hyalüronidaz kadar etkin bir kanlanma artışı sağlayamadı. Ancak sildenafil sitrat hyalüronidazla birlikte uygulandığında, tek başına

hyalüronidaza göre daha fazla kanlanma artışı sağladı. Eksternal kompresyon ile oluşturulan iskemi modelinde de hyalüronidaz ile sildenafil sitratın birlikte kullanımı anlamlı bir şekilde en etkin tedaviyi oluşturmaktadır.

İndosiyanin yeşili floresans görüntüle sonuçlarına göre, modeller bazında uygulanan tedaviler incelendiğinde hem hyalüronidaz, hem sildenafil sitrat, hem de ikili tedavi embolizasyon modelinde daha etkin bir tedavi uyguladığı görülmektedir.

İndosiyanin yeşili floresans görüntüleme sonuçları gösteriyor ki; sildenafil sitrat vasküler komplikasyonların tedavisinde hyalüronidaza ek olarak uygulanırsa hem vazodilatör etkisi hem de diğer etkileriyle birlikte yeniden sirkülasyonun sağlanmasına etkili şekilde katkı sağlayabilir.

Deney boyunca yapılan gözlemlerimizde fleplerde nekroz görülmemesine rağmen zaman içinde flep ebatlarında küçülme olduğunu görüldü. Deney öncesi standart ebatlarda oluşturulan flepler deney sonrası tekrar ölçüldü ve öncesine göre kıyaslama yapıldı. Yaptığımız kıyaslamalarda embolizasyon modelinde kontrol grubunda en fazla küçülme olduğu görüldü. Bu küçülme sildenafil sitrat uygulanan grupta, kontrol grubuna göre daha azdı. Hyalüronidaz ve ikili tedavi grubunda ise daha azdı. Hyalüronidaz ile ikili tedavi grubu arasında anlamlı fark bulunmuyordu.

Flep küçülmesi açısıdan eksternal kompresyon modelinde ise kontrol grubu ile sildenafil sitrat grubu arasında, hyalüronidaz ile ikili tedavi grubu arasında anlamlı fark bulunmuyordu. Ancak yine en fazla küçülmenin olduğu grup kontrol grubuydu.

Modeller bazında karşılaştırma yapıldığında en fazla flep küçülmesi tüm tedavi gruplarında embolizasyonla iskemi yapılan grupta bulunuyordu. Küçülmenin sebebi olarak iskemiye maruz kalma sonucu gelişen fibrozis ve atrofi olduğunu düşünmekteyiz. Uygun tedavi ile vasküler komplikasyona bağlı gelişen bu atrofi ve fibrozis de hyalüronidaz tedavisine eklenecek sildenafil sitrat tedavisi ile azaltılabileceğini düşünüyoruz.

İskemi sonrası gelişen reperfüzyon çok masum olmamaktadır. İskemi reperfüzyon hasarının inflamasyonu, ödemi arttırdığı bilinmektedir [192], [193]. Yaptığımız çalışmada inflamasyon ve inflamasyonun belirteci olan ödem ve fibroplazi derecelendirildi. Deney modellerimizdeki ana amaç iskemi oluşturulmasıdır. Bu embolizasyon ve esternal kompresyon mekanizmalarıyla gerçekleştirildi. Daha sonrasında kontrol grubuyla karşılaştırılarak bu iskemi tedavi edildi. Tedavi başarısı

yani reperfüzyon ne kadar yüksek ise inflamasyon ve belirteçlerinin daha yüksek olması beklendi. Hem embolizasyon hem de eksternal kompresyon modelinde iskemi sonrası vasküler kanlanmanın en çok arttığı grup olan hyalüronidaz ve sildenafil sitrat ikili tedavi grubunda inflamasyon ve belirteçleri daha yoğun görüldü.

6. SONUÇ

Literatür incelendiğinde hyalüronik asit dolgu komplikasyonlarına bağlı çalışmaların tek bir mekanizma (embolizasyon) üzerinden incelendiği görülmektedir. Biz bu çalışmamızda ilk kez farklı bir iskemi modeli olan eksternal kompresyon modeli oluşturduk ve bunun üzerinde çalıştık. Aynı zamanda, iskemi modelleri arasında karşılaştırmanın aynı çalışmada yapılabileceği şekilde bir deney planı tasarladık.

Sildenafil sitrat uzun zamandır piyasada klinik kullanımda olan, yan etki açısından güvenliliği ve etki mekanizması ortaya konmuş, oral yolla kullanıldığında biyoyararlanımı yüksek, her an ulaşılabilir olan bir ilaçtır. Bu sebeple klinik pratikte uygulama açısından kolaylığı bulunmaktadır. Her ne kadar dolgu komplikasyonunun tedavisinde kullanılması uzman görüşü niteliğinde önerilse de etkinliğini kanıtlayacak bir çalışma bugüne kadar yayınlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada komplikasyonun oluş mekanizmasına göre de etkinliğini değerlendirilmiştir. Sildenafil sitrat, hyalüronidazla birlikte kullanıldığında daha iyi bir kanlanma artışı sağladığı görülmektedir. Aynı zamanda trombolitik, neovaskülerizan, vazodilatör, mikrosirkülasyonu arttırıcı, perfüzyon basıncını düşürücü etki göstermesi nedeniyle ek faydalar sağlamaktadır. Retina ve orbital üzerinde ciddi bir kanlanma artışı yaptığı başka çalışmalarda ortaya konmuştur.

Vücudumuzdaki vasküler yatak kompleks bir mekanizmadır. Hyalüronidaz ile sildenafil sitratın birlikte kullanılmasında bile vasküler kanlanmada tam bir geri dönüş olmaması patofizyolojiyi etkileyen başka yolakların olduğunu göstermektedir. Bu yolakların ortaya konması ve tedavi açısından mücadele edilmesi için başka çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamız hyalüronidaz ve sildenafil sitratın etkinliğini göstermiş olsa da optimal etkinin görüldüğü doz çalışmalarına da ihtiyaç vardır. Çalışmamızın; vasküler komplikasyon gibi acil müdahale edilmesi gereken durumlar için tedavi protokolünün ve klavuzlarının oluşturulmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

[1] Çalık Kocatürk D. , Uysal A. , Oltulu F. , Özdil B. Deri ve deri eklerinin embriyolojik gelişimi. Güncel Dermatoloji Dergisi. 2016; 1(1): 1-10.

[2] Ivanova IA, D'Souza SJ, Dagnino L. Signalling in the epidermis: the E2F cell cycle regulatory pathway in epidermal morphogenesis, regeneration and transformation. Int J Biol Sci. 2005;1(2):87-95.

[3] Salavastru C, Dedee FM, James O. Skin and the Heart. Springer International Publishing, 2021.

[4] Forni MF, Trombetta-Lima M, Sogayar MC. Stem cells in embryonic skin development. Biol Res. 2012;45(3):215-222.

[5] M. G. T. Keith L. Moore, T. V. N. Persaud, The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. Saunders; 2015.

[6] Fuchs E. Scratching the surface of skin development. Nature. 2007;445(7130):834-842.

[7] P. F. McGrath JA, Eady RAJ. Anatomy and Organization of Human Skin. Burns T, Breathnach SM, Cox N, et al, eds. Rook's Textbook of Dermatology. Blackwell Publishing, Inc.; 2008. 45–128.

[8] Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. Nature. 2005;437(7056):275-280.

[9] De Falco M, Pisano MM, De Luca A. Embryology and Anatomy of the Skin. Baldi A, Pasquali P, Spugnini E, eds. Skin Cancer. Humana Press;2014. 1–15.

[10] Johnson CL, Holbrook KA. Development of human embryonic and fetal dermal vasculature. J Invest Dermatol. 1989;93(2 Suppl):10S-17S.

[11] Hu MS, Borrelli MR, Hong WX, Malhotra S, Cheung ATM, Ransom RC, et al. Embryonic skin development and repair. Organogenesis. 2018;14(1):46-63.

[12] Bilgen F. Meme anatomisi ve embriyolojisi. Savacı N, editör. Meme Küçültme. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. 1-4.

[13] Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. Clin Obstet Gynecol. 2011;54(1):91-95.

[14] Javed A, Lteif A. Development of the human breast. Semin Plast Surg. 2013;27(1):5-12.

[15] Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol. 2002;12(4):390-401.

[16] Anderson BE, ed. The netter collection of medical illustrations: integumentary system. Elsevier Health Sciences;2012.

[17] Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. Clin Dermatol. 2014;32(1):3-13.

[18] Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. J Tissue Eng. 2014;5:2041731414557112.

[19] Cenan RS, Ergin E, Ekici Y, Atac FB. Structural and functional properties of the extracellular matrix. J Lit Pharm Sci. 2018;7(3):251-260.

[20] Baumann L. Skin ageing and its treatment. J Pathol. 2007;211(2):241-251.

[21] Tanzer ML. Current concepts of extracellular matrix. J Orthop Sci. 2006;11(3):326-331.

[22] Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(1):a004978.

[23] Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. J Glaucoma. 2014;23(8 Suppl 1):S20-S23.

[24] Aziz J, Shezali H, Radzi Z, Yahya NA, Kassim NHA, Czernuszka J, et al. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. Skin Pharmacol Physiol. 2016;29(4):190-203.

[25] Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. Int J Cosmet Sci. 2017;39(3):241-247.

[26] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. Adv Drug Deliv Rev. 2016;97:4-27.

[27] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci. 2010;123(Pt 24):4195-4200.

[28] Weigel PH. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. Int J Cell Biol. 2015;2015:367579.

[29] Menon GK. Skin basics; structure and function. Pappas A, ed. Lipids and skin health. Springer;2015. 9-23.

[30] Sbarbati A, Accorsi D, Benati D, Marchetti L, Orsini G, Panettiere P. Subcutaneous adipose tissue classification. Eur J Histochem. 2010;54(4):e48.

[31] Braverman IM. Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states. J Invest Dermatol. 1989;93(2 Suppl):2S-9S.

[32] Petzelbauer P, Loewe R, Pober JS. Cutaneous Vasculature. Kang S, Amagaı M, Bruckner AL, Enk AH, Margolıs DJ, Mcmıchael AJ, et al, eds. Fitzpatrick's Dermatology, 9th Edition. McGraw-Hill Education; 2019.116–129.

[33] Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. Nat Rev Immunol. 2014;14(4):232-246.

[34] Morris SF, Taylor GI. Vascular territories. Gurtner GC, Neligan PC, Liu DZ, Eds. Plastic Surgery Volume One: Principles, 4th Edition. Elsevier;2018. 340–365.

[35] Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011;25(8):873-884.

[36] Harman D. Aging: overview. Ann N Y Acad Sci. 2001;928:1-21.

[37] Makrantonaki E, Zouboulis CC. William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. Dermatology. 2007;214(4):352-360.

[38] Fisher GJ, Kang S, Varani J, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 2002;138(11):1462-1470.

[39] Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science. 1996;273(5271):59-63.

[40] Chung JH, Kang S, Varani J, Lin J, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. J Invest Dermatol. 2000;115(2):177-182.

[41] Quan T, Shao Y, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. J Invest Dermatol. 2010;130(2):415-424.

[42] Makrantonaki E, Adjaye J, Herwig R, et al. Age-specific hormonal decline is accompanied by transcriptional changes in human sebocytes in vitro. Aging Cell. 2006;5(4):331-344.

[43] Makrantonaki E, Zouboulis CC. Androgens and ageing of the skin. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2009;16(3):240-245.

[44] Uitto J. Understanding premature skin aging. N Engl J Med. 1997;337(20):1463-1465.

[45] Klotz LO, Holbrook NJ, Sies H. UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. Curr Probl Dermatol. 2001;29:95-113.

[46] Wallace DC. 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. Am J Hum Genet. 1995;57(2):201-223.

[47] Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, et al. Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. Photochem Photobiol. 1997;66(2):271-275.

[48] Birch-Machin MA, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees JL. Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. J Invest Dermatol. 1998;110(2):149-152.

[49] Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Aoyagi Y, Fujiwara M, et al. Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium. J Invest Dermatol. 2002;119(5):1014-1019.

[50] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature. 1990;345(6274):458-460.

[51] Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Experimental cell research, 1965, 37.3: 614-636.

[52] Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. Cell. 2005;120(4):497-512.

[53] Buckingham EM, Klingelhutz AJ. The role of telomeres in the ageing of human skin. Exp Dermatol. 2011;20(4):297-302.

[54] Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66(3):407-425.

[55] Gilchrest BA, Eller MS, Yaar M. Telomere-mediated effects on melanogenesis and skin aging. J Investig Dermatol Symp Proc. 2009;14(1):25-31.

[56] Kosmadaki MG, Gilchrest BA. The role of telomeres in skin aging/photoaging. Micron. 2004;35(3):155-159.

[57] Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. Biochemistry. 2001;40(15):4763-4768.

[58] Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol. 2000;18(5):1135-1149.

[59] Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. Nature. 1996;379(6563):335-339.

[60] Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. J Biol Chem. 2005;280(9):8079-8085.

[61] Fisher GJ, Quan T, Purohit T, et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. Am J Pathol. 2009;174(1):101-114.

[62] Imokawa G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibrobrast-derived elastase. Arch Dermatol Res. 2008;300 Suppl 1:S7-S20.

[63] Chung JH, Eun HC. Angiogenesis in skin aging and photoaging. J Dermatol. 2007;34(9):593-600.

[64] Piotrowska A, Bartnik E. The role of reactive oxygen species and mitochondria in aging. Postepy Biochem. 2014;60(2):240-247.

[65] Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. Biomolecules. 2015;5(2):545-589.

[66] Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. J Signal Transduct. 2011;2011:792639.

[67] Hipkiss AR. Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. Exp Gerontol. 2006;41(5):464-473.

[68] Widmer R, Ziaja I, Grune T. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. Free Radic Res. 2006;40(12):1259-1268.

[69] Sander CS, Chang H, Salzmann S, Müller CSL, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. J Invest Dermatol. 2002;118(4):618-625.

[70] Fitzpatrick TB. Soleil et peau' [Sun and skin]. J Médecine Esthétique. 1975;2:33–34.

[71] Lavker RM. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. J Invest Dermatol. 1979;73(1):59-66.

[72] Gilchrest BA, Blog FB, Szabo G. Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. J Invest Dermatol. 1979;73(2):141-143.

[73] Braverman IM, Fonferko E. Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. J Invest Dermatol. 1982;78(5):434-443.

[74] Bhawan J, Andersen W, Lee J, Labadie R, Solares G. Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. J Cutan Pathol. 1995;22(2):154-159.

[75] Sellheyer K. Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? [published correction appears in J Cutan Pathol. 2003 Jul;30(6):412]. J Cutan Pathol. 2003;30(2):123-127.

[76] Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. Dermatoendocrinol. 2012;4(3):308-319.

[77] Murthy R, Roos JCP, Goldberg RA. Periocular hyaluronic acid fillers: applications, implications, complications. Curr Opin Ophthalmol. 2019;30(5):395-400.

[78] Kontis TC. Contemporary review of injectable facial fillers. JAMA Facial Plast Surg. 2013;15(1):58-64.

[79] Lee WK, Yang DY. Classification of soft tissue filler. Park NC, Kim SW, Moon DG, eds. Penile Augmentation. Springer;2016. 71–82.

[80] Bohaumilitzky L, Huber AK, Stork EM, Wengert S, Woelfl F, Boehm H. A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix. Front Oncol. 2017;7:242.

[81] Dayan SH, Bassichis BA. Facial dermal fillers: selection of appropriate products and techniques. Aesthet Surg J. 2008;28(3):335-347.

[82] Monheit GD, Coleman KM. Hyaluronic acid fillers. Dermatol Ther. 2006;19(3):141-150.

[83] Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers [published correction appears in J Cosmet Laser Ther. 2014 Jan;16(1):45]. J Cosmet Laser Ther. 2008;10(1):35-42.

[84] De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Raca-Martinez JX, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. Dermatol Surg. 2013;39(12):1758-1766.

[85] Koh IS, Lee W. Filler Complications. Springer;2019.

[86] Choi SC, Yoo MA, Lee SY, Lee HJ, Son DH,Jung J, et al. Modulation of biomechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking agents. J Biomed Mater Res A. 2015;103(9):3072-3080.

[87] Clark JB, Hastie JW, Kihlborg LHE, Metselaar R, Thackeray MM. Definitions of terms relating to phase transitions of the solid state. Int. Pure Appl. Chem, 1994, 66: 577-594.

[88] Öhrlund JÅ, Edsman KL. The Myth of the "Biphasic" Hyaluronic Acid Filler. Dermatol Surg. 2015;41 Suppl 1:S358-S364.

[89] Faivre J, Gallet M, Tremblais E, Trévidic P, Bourdon F. Advanced Concepts in Rheology for the Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Soft Tissue Fillers. Dermatol Surg. 2021;47(5):e159-e167.

[90] Mewis J, Wagner NJ. Thixotropy. Adv Colloid Interface Sci. 2009;147-148:214-227.

[91] Pierre S, Liew S, Bernardin A. Basics of dermal filler rheology. Dermatol Surg. 2015;41 Suppl 1:S120-S126.

[92] De Boulle K, Heydenrych I. Patient factors influencing dermal filler complications: prevention, assessment, and treatment. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2015;8:205-214.

[93] Urdiales-Gálvez F, Delgado NE, Figueiredo V, Lajo-Plaza JV, Mira M, Moreno A, et al. Treatment of Soft Tissue Filler Complications: Expert Consensus Recommendations. Aesthetic Plast Surg. 2018;42(2):498-510.

[94] Wagner RD, Fakhro A, Cox JA, Izaddoost SA. Etiology, Prevention, and Management of Infectious Complications of Dermal Fillers. Semin Plast Surg. 2016;30(2):83-86.

[95] Rohrich RJ, Nguyen AT, Kenkel JM. Lexicon for soft tissue implants. Dermatol Surg. 2009;35 Suppl 2:1605-1611.

[96] Funt D, Pavicic T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. Plast Surg Nurs. 2015;35(1):13-32.

[97] Fitzgerald R, Bertucci V, Sykes JM, Duplechain JK. Adverse Reactions to Injectable Fillers. Facial Plast Surg. 2016;32(5):532-555.

[98] Signorini M, Liew S, Sundaram H, De Boulle K, Goodman GJ, Monheit G, et al. Global Aesthetics Consensus: Avoidance and Management of Complications from Hyaluronic Acid Fillers-Evidence- and Opinion-Based Review and Consensus Recommendations. Plast Reconstr Surg. 2016;137(6):961e-971e.

[99] Leonhardt JM, Lawrence N, Narins RS. Angioedema acute hypersensitivity reaction to injectable hyaluronic acid. Dermatol Surg. 2005;31(5):577-579.

[100] Van Dyke S, Hays GP, Caglia AE, Caglia M. Severe Acute Local Reactions to a Hyaluronic Acid-derived Dermal Filler. J Clin Aesthet Dermatol. 2010;3(5):32-35.

[101] Cohen JL, Bhatia AC. The role of topical vitamin K oxide gel in the resolution of postprocedural purpura. J Drugs Dermatol. 2009;8(11):1020-1024.

[102] Christensen LH. Host tissue interaction, fate, and risks of degradable and nondegradable gel fillers. Dermatol Surg. 2009;35 Suppl 2:1612-1619.

[103] Glass GE, Tzafetta K. Optimising treatment of Bell's Palsy in primary care: the need for early appropriate referral. Br J Gen Pract. 2014;64(629):e807-e809.

[104] Sclafani AP, Fagien S. Treatment of injectable soft tissue filler complications. Dermatol Surg. 2009;35 Suppl 2:1672-1680.

[105] DeLorenzi C. New High Dose Pulsed Hyaluronidase Protocol for Hyaluronic Acid Filler Vascular Adverse Events. Aesthet Surg J. 2017;37(7):814-825.

[106] Goodman GJ, Roberts S, Callan P. Experience and Management of Intravascular Injection with Facial Fillers: Results of a Multinational Survey of Experienced Injectors. Aesthetic Plast Surg. 2016;40(4):549-555.

[107] Kim SN, Byun DS, Park JH, Han SW, Baik JS, Kim JY, et al. Panophthalmoplegia and vision loss after cosmetic nasal dorsum injection. J Clin Neurosci. 2014;21(4):678-680.

[108] Rzany B, DeLorenzi C. Understanding, Avoiding, and Managing Severe Filler Complications. Plast Reconstr Surg. 2015;136(5 Suppl):196S-203S.

[109] Cohen JL, Biesman BS, Dayan SH, DeLorenzi C, Lambros VS, Nestor MS, et al. Treatment of Hyaluronic Acid Filler-Induced Impending Necrosis With Hyaluronidase: Consensus Recommendations. Aesthet Surg J. 2015;35(7):844-849.

[110] Bailey SH, Cohen JL, Kenkel JM. Etiology, prevention, and treatment of dermal filler complications. Aesthet Surg J. 2011;31(1):110-121.

[111] Kleydman K, Cohen JL, Marmur E. Nitroglycerin: a review of its use in the treatment of vascular occlusion after soft tissue augmentation. Dermatol Surg. 2012;38(12):1889-1897.

[112] Park SW, Woo SJ, Park KH, Huh JW, Jung C, Kwon OK. Iatrogenic retinal artery occlusion caused by cosmetic facial filler injections. Am J Ophthalmol. 2012;154(4):653-662.e1.

[113] Hwang CJ, Chon BH, Perry JD. Blindness After Filler Injection: Mechanism and Treatment. Facial Plast Surg Clin North Am. 2021;29(2):359-367.

[114] Beleznay K, Carruthers JD, Humphrey S, Jones D. Avoiding and Treating Blindness From Fillers: A Review of the World Literature. Dermatol Surg. 2015;41(10):1097-1117.

[115] Wu S, Pan L, Wu H, et al. Anatomic Study of Ophthalmic Artery Embolism Following Cosmetic Injection. J Craniofac Surg. 2017;28(6):1578-1581.

[116] Yang HK, Lee Y, Woo SJ, Park KH, Kim JS, Hwang JM. Natural Course of Ophthalmoplegia after Iatrogenic Ophthalmic Artery Occlusion Caused by Cosmetic Filler Injections. Plast Reconstr Surg. 2019;144(1):28e-34e.

[117] Cho KH, Dalla Pozza E, Toth G, Bassiri Gharb B, Zins JE. Pathophysiology Study of Filler-Induced Blindness. Aesthet Surg J. 2019;39(1):96-106.

[118] Lee W, Oh W, Ko HS, Lee SY, Kim KW, Yang EJ. Effectiveness of Retrobulbar Hyaluronidase Injection in an Iatrogenic Blindness Rabbit Model Using Hyaluronic Acid Filler Injection [published correction appears in Plast Reconstr Surg. 2020 Jan;145(1):289]. Plast Reconstr Surg. 2019;144(1):137-143.

[119] Amaral AVC, Silva GA, Costa APA, Coelho CMM, Renzo R, Laus JL. Sildenafil citrate on retrobulbar and retinal circulation of rabbits. Ciência Rural, 2014, 44: 1431-1436.

[120] Roustit M, Hellmann M, Cracowski C, Blaise S, Cracowski JL. Sildenafil increases digital skin blood flow during all phases of local cooling in primary Raynaud's phenomenon. Clin Pharmacol Ther. 2012;91(5):813-819.

[121] Chiang C, Zhou S, Chen C, Ho DS, Zhang H, Liu K. Intravenous Hyaluronidase with Urokinase as Treatment for Rabbit Retinal Artery Hyaluronic Acid Embolism. Plast Reconstr Surg. 2016;138(6):1221-1229.

[122] Arron ST, Neuhaus IM. Persistent delayed-type hypersensitivity reaction to injectable non-animal-stabilized hyaluronic acid. J Cosmet Dermatol. 2007;6(3):167-171.

[123] Cassuto D, Marangoni O, De Santis G, Christensen L. Advanced laser techniques for filler-induced complications. Dermatol Surg. 2009;35 Suppl 2:1689-1695.

[124] Funt DK. Avoiding malar edema during midface/cheek augmentation with dermal fillers. J Clin Aesthet Dermatol. 2011;4(12):32-36.

[125] Taylor SC, Burgess CM, Callender VD. Safety of nonanimal stabilized hyaluronic acid dermal fillers in patients with skin of color: a randomized, evaluator-blinded comparative trial. Dermatol Surg. 2009;35 Suppl 2:1653-1660.

[126] Heath CR, Taylor SC. Fillers in the skin of color population. J Drugs Dermatol. 2011;10(5):494-498.

[127] DeLorenzi C. Complications of injectable fillers, part I. Aesthet Surg J. 2013;33(4):561-575.

[128] Douse-Dean T, Jacob CI. Fast and easy treatment for reduction of the Tyndall effect secondary to cosmetic use of hyaluronic acid. J Drugs Dermatol. 2008;7(3):281-283.

[129] Hirsch RJ, Narurkar V, Carruthers J. Management of injected hyaluronic acid induced Tyndall effects. Lasers Surg Med. 2006;38(3):202-204.

[130] Dayan SH, Arkins JP, Brindise R. Soft tissue fillers and biofilms. Facial Plast Surg. 2011;27(1):23-28.

[131] Ledon JA, Savas JA, Yang S, Franca K, Camacho I, Nouri K. Inflammatory nodules following soft tissue filler use: a review of causative agents, pathology and treatment options. Am J Clin Dermatol. 2013;14(5):401-411.

[132] Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Janssen M, Christensen LH. Detection of bacteria by fluorescence in situ hybridization in culture-negative soft tissue filler lesions. Dermatol Surg. 2009;35 Suppl 2:1620-1624.

[133] Attila C, Ueda A, Wood TK. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in Escherichia coli K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;82(3):525-533.

[134] Tohidnezhad M, Varoga D, Wruck CJ, Podschun R, Sachweh HB, Bornemann J, et al. Platelets display potent antimicrobial activity and release human beta-defensin 2. Platelets. 2012;23(3):217-223.

[135] Różalski MI, Micota B, Sadowska B, Paszkiewicz M, Więckowska-Szakiel M, Różalska B. Antimicrobial/anti-biofilm activity of expired blood platelets and their released products. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2013;67:321-325.

[136] Lemperle G, Gauthier-Hazan N, Wolters M, Eisemann-Klein M, Zimmermann U, Duffy DM. Foreign body granulomas after all injectable dermal fillers: part 1. Possible causes. Plast Reconstr Surg. 2009;123(6):1842-1863.

[137] Lemperle G, Gauthier-Hazan N. Foreign body granulomas after all injectable dermal fillers: part 2. Treatment options. Plast Reconstr Surg. 2009;123(6):1864-1873.

[138] Duran-Reynals F. The effect of extracts of certain organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus. J Exp Med. 1929;50(3):327-340.

[139] Duran-Reynals F. Tissue permeability and the spreading factors in infection : A contribution to the host:Parasite problem. Bacteriol Rev. 1942;6(4):197-252.

[140] Meyer K. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. Physiol Rev. 1947;27(3):335-359.

[141] Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. Cancer Lett. 1998;131(1):3-11.

[142] Martin-Deleon PA. Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function. Int J Androl. 2011;34(5 Pt 2):e306-e318.

[143] Cavallini M, Gazzola R, Metalla M, Vaienti L. The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers. Aesthet Surg J. 2013;33(8):1167-1174.

[144] Ciancio F, Tarico MS, Giudice G, Perrotta RE. Early hyaluronidase use in preventing skin necrosis after treatment with dermal fillers: Report of two cases. F1000Res. 2018;7:1388.

[145] Li J, Xu Y, Wang Y, Hsu Y, Wang P, Li J. The Role of Hyaluronidase for the Skin Necrosis Caused by Hyaluronic Acid Injection-Induced Embolism: A Rabbit Auricular Model Study. Aesthetic Plast Surg. 2019;43(5):1362-1370.

[146] Meyer K, Rapport M M. Hyaluronidases. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.1952;13:199-236.

[147] Hovingh P, Linker A. Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1999;124(3):319-326.

[148] Bertolami CN, Donoff RB. Identification, characterization, and partial purification of mammalian skin wound hyaluronidase. J Invest Dermatol. 1982;79(6):417-421.

[149] Kreil G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. Protein Sci. 1995;4(9):1666-1669.

[150] Weber GC, Buhren BA, Schrumpf H, Wohlrab J, Gerber PA. Clinical Applications of Hyaluronidase. Adv Exp Med Biol. 2019;1148:255-277.

[151] Kaul A, Short WD, Wang X, Keswani SG. Hyaluronidases in Human Diseases. Int J Mol Sci. 2021;22(6):3204.

[152] Lewis-Smith PA. Adjunctive use of hyaluronidase in local anaesthesia. Br J Plast Surg. 1986;39(4):554-558.

[153] Gul A, Can E, Niyaz L, Yucel OE, Duran M, Ariturk N. Hyaluronidase in ophthalmic evisceration surgery. Trop Doct. 2015;45(2):100-104.

[154] Narayanan R, Kuppermann BD. Hyaluronidase for pharmacologic vitreolysis. Dev Ophthalmol. 2009;44:20-25.

[155] Smith KJ, Skelton HG, Turiansky G, Wagner KF. Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's sarcoma. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research (MMCARR). J Am Acad Dermatol. 1997;36(2 Pt 1):239-242.

[156] Landau M. Hyaluronidase Caveats in Treating Filler Complications. Dermatol Surg. 2015;41 Suppl 1:S347-S353.

[157] Wohlrab J, Wohlrab D, Wohlrab L, Wohlrab C, Wohlrab A. Use of hyaluronidase for pharmacokinetic increase in bioavailability of intracutaneously applied substances. Skin Pharmacol Physiol. 2014;27(5):276-282.

[158] Kind LS, Roffler S. Allergic reactions to hyaluronidase. Proc Soc Exp Biol Med. 1961;106:734-735.

[159] Spandorfer PR, Mace SE, Okada PJ, et al. A randomized clinical trial of recombinant human hyaluronidase-facilitated subcutaneous versus intravenous rehydration in mild to moderately dehydrated children in the emergency department. Clin Ther. 2012;34(11):2232-2245.

[160] Johnson JM, Kellogg DL Jr. Local thermal control of the human cutaneous circulation. J Appl Physiol (1985). 2010;109(4):1229-1238.

[161] Jackson G, Gillies H, Osterloh I. Past, present, and future: a 7-year update of Viagra (sildenafil citrate). Int J Clin Pract. 2005;59(6):680-691.

[162] Turko IV, Ballard SA, Francis SH, Corbin JD. Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. Mol Pharmacol. 1999;56(1):124-130.

[163] Langtry HD, Markham A. Sildenafil: a review of its use in erectile dysfunction. Drugs. 1999;57(6):967-989.

[164] Abrams D, Schulze-Neick I, Magee AG. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. Heart. 2000;84(2):E4.

[165] Philip KM, Sudha M, Venkateswaramurthy N. Sildenafil: a review on the clinical and non-clinical effects. Int J Pharm Sci Heal. 2018;4(8):13-22.

[166] Ellabban MA, Fattah IOA, Kader GA, Eldeen OS, Mehana AE, Khodeer AE, et al. The Effects of Sildenafil and/or Nitroglycerin on Random-pattern Skin Flaps After Nicotine Application in Rats. Sci Rep. 2020;10(1):3212.

[167] Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, et al. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. Int J Surg. 2009;7(1):39-43.

[168] Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. New England Journal of Medicine. 2006;355(19):2003-2011.

[169] Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(16):7583-7587.

[170] Jaffrey SR, Snyder SH. Nitric oxide: a neural messenger. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995;11:417-440.

[171] Buechler WA, Ivanova K, Wolfram G, Drummer C, Heim JM, Gerzer R. Soluble guanylyl cyclase and platelet function. Ann N Y Acad Sci. 1994;714:151-157.

[172] Sildenafil - ClinicalKey. https://www.clinicalkey.com/#!/content/drug_monograph/6-s2.0-801. accessed Sep. 02, 2022.

[173] Ala M, Mohammad Jafari R, Dehpour AR. Sildenafil beyond erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension: Thinking about new indications. Fundam Clin Pharmacol. 2021;35(2):235-259.

[174] Özçetin B, Baykara M. Göz Hastalıklarında görüntüleme. Zeiss;2013.

[175] Spy flourescence imaging system, Operator’s manuel. Canada, 2013.

[176] Lavazza M, Liu X, Wu C, Anuwong A, Kim HY, Liu R, et al. Indocyanine green-enhanced fluorescence for assessing parathyroid perfusion during thyroidectomy. Gland Surg. 2016;5(5):512-521.

[177] Griffiths M, Chae MP, Rozen WM. Indocyanine green-based fluorescent angiography in breast reconstruction. Gland Surg. 2016;5(2):133-149.

[178] Hirche C, Murawa D, Mohr Z, Kneif S, Hünerbein M. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2010;121(2):373-378.

[179] Samizadeh S, Wu W. Ideals of Facial Beauty Amongst the Chinese Population: Results from a Large National Survey. Aesthetic Plast Surg. 2020;44(4):1173-1183.

[180] Bueller H. Ideal Facial Relationships and Goals. Facial Plast Surg. 2018;34(5):458-465.

[181] Bowler PJ. Impact on facial rejuvenation with dermatological preparations. Clin Interv Aging. 2009;4:81-89.

[182] Barbucci R, Lamponi S, Magnani A, Renier D. The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. Biomaterials. 1998;19(7-9):801-806.

[183] Wang F, Garza LA, Kang S, et al. In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. Arch Dermatol. 2007;143(2):155-163.

[184] Fang M, Rahman E, Kapoor KM. Managing Complications of Submental Artery Involvement after Hyaluronic Acid Filler Injection in Chin Region. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2018;6(5):e1789.

[185] Lee SH, Ha TJ, Lee JS, Koh KS, Song WC. Topography of the Central Retinal Artery Relevant to Retrobulbar Reperfusion in Filler Complications. Plast Reconstr Surg. 2019;144(6):1295-1300.

[186] Kapoor KM, Kapoor P, Heydenrych I, Bertossi D. Vision Loss Associated with Hyaluronic Acid Fillers: A Systematic Review of Literature. Aesthetic Plast Surg. 2020;44(3):929-944.

[187] Kim DW, Yoon ES, Ji YH, Park SH, Lee BI, Dhong ES. Vascular complications of hyaluronic acid fillers and the role of hyaluronidase in management. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2011;64(12):1590-1595.

[188] Wang M, Li W, Zhang Y, Tian W, Wang H. Comparison of Intra-arterial and Subcutaneous Testicular Hyaluronidase Injection Treatments and the Vascular Complications of Hyaluronic Acid Filler. Dermatol Surg. 2017;43(2):246-254.

[189] Larsen LA, Ito S, Koren G. Prediction of milk/plasma concentration ratio of drugs. Annals of Pharmacotherapy. 2003;37(9):1299-1306.

[190] Regenthal R, Krueger M, Koeppel C, Preiss R. Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. Journal of clinical monitoring and computing. 1999;15(7):529-544.

[191] Chen Y, Zhang YL, Luo SK. Experimentally Induced Arterial Embolism by Hyaluronic Acid Injection: Clinicopathologic Observations and Treatment. Plast Reconstr Surg. 2019;143(4):1088-1097.

[192] Wu L, Xiong X, Wu X, Ye Y, Jian Z, Zhi Z, Gu L. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2020;13:28.

[193] Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion injury and its consequences on immunity and inflammation. Current transplantation reports. 2014;1(3):147-154.