



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ-BOYUN CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

SIÇAN FARİNGOKUTANOZ FİSTÜL MODELİNDE
RECOMBİNANT HUMAN GROWTH HORMONUN
FİSTÜL KAPANMASINDA ETKİNLİĞİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. NURTEN KÜÇÜK

Danışman Doç. Dr. MURAT SARI

İstanbul, 2012

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	
1. ÖZET.....	
2. ABSTRACT.....	
3. GİRİŞ	
4. GENEL BİLGİLER.....	
4.1 LARENKS MALİGN NEOPLAZİLERİ	
4.2 TOTAL LARENJEKTOMİ	
4.3 TOTAL LARENJEKTOMİ KOMPLİKASYONLARI	
4.4 GROWTH HORMON	
4.5 YARA İYİLEŞMESİ FİZYOLOJİSİ	
5. MATERYAL ve METOD.....	
5.1 Deney hayvanları.....	
5.2 Hayvanların hazırlanması ve Deneysel işlem.....	
6. BULGULAR	
7. TARTIŞMA	
8. SONUÇLAR.....	
9. KAYNAKLAR.....	

1. ÖZET

Sigara ve alkol içme oranlarının artmasıyla birlikte baş boyun kanseri oranlarında da artış gözlenmektedir. Baş boyun kanserlerinin %25'ini oluşturan larinks kanserlerinde organ koruyucu tedaviye eğilimin artmasıyla birlikte kemoradyoterapi ön plana çıkmaktadır. Larinks kanserlerinde primer tedavide kemoradyoterapi kullanılmasıyla beraber nüks sonrası kurtarma cerrahisi oranında da artış gözlenmektedir. Bunun sonucu faringokutanoz fistül (FKF) komplikasyonunda da artış izlenmektedir. FKF etiolojisinde bilinen birçok risk faktörü olmasına rağmen en sık izlenen risk faktörü daha önce boyun bölgesine alınan kemoradyoterapidir. FKF tedavisinde primer olarak oral beslenmenin kesilmesi, intravenöz antibiyotik kullanımı ve yara debridmanı başlıca yaklaşım olmasıyla birlikte kapanmayan fistüllerin onarımında kullanılan ve hala çalışması yapılan birçok yöntem mevcuttur.

Recombinant human growth hormon (rHGH) amino asid alınımını ve protein sentezini arttırıp, mitogenezi arttırarak kollejen oluşumunu arttırır, kas ve diğer organlarda yara iyileşmesinin daha hızlı olmasını sağlar. rHGH'un bu etkilerinden yararlanılarak yara iyileşmesinde ve kırık tedavisinde GH 'un kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır.

Çalışmamızda, 40 tane Sprague Dawley sıçanda ağız tabanı ile üst özofagus arasında insizyon yapıldıktan sonra FKF oluşturulması, rHGH 'un FKF kapanmasında etkisinin araştırılması amaçlandı. Kontrol grubunda FKF primer kapanmaya bırakılırken, çalışma grubundaki deneklere hergün subkutan rHGH verilip 14 gün sonunda iki grup arasında FKF kapanmasında makroskopik ve histopatolojik fark olup olmadığı araştırıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde oran-frekans değerleri kullanılıp, değişkenlerin analizinde ki-kare test, ki-kare koşulları sağlanmadığında fischer test kullanıldı.

İstatistiksel analizler sonucu rHGH verilen grupta makroskopik olarak FKF'ü kapanan denek sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterildi. FKF alanında kollojen

yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu da gösterildi. rHGH verilen grupta kollojen oluşumu ve granülasyonun daha fazla olmasıyla birlikte fibroblast yoğunluğu ve anjiogenezis açısından iki grup arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

Bu çalışmada, rHGH'un FKF kapanmasında ve kollojen oluşumunda olumlu etkileri olduğu gösterildi. rHGH'un FKF kapanması üzerine etkilerinin daha iyi değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: FKF, rHGH, growth hormon(GH), larenjektomi, larenks kanserleri, larenjektomi komplikasyonları

2. ABSTRACT

With an increase in the rate of smoking and alcohol drinking, an increase in the rates of head and neck cancer is being observed. In the last years, the organ-preserving chemoradiation therapy has been arisen in the larynx cancer treatment that constitutes 25% of head and neck cancer. After chemoradiation therapy has been used as a primary therapy in larynx cancer, the rate of salvage laryngectomy after cancer recurrence also is being increased. As a result, a rise in pharyngocutaneous fistula (PCF) complication after salvage laryngectomy is seen. There are well known risk factors for PCF complication, but the most common risk factor is the chemoradiotherapy given to the neck. When PCF is seen, firstly oral feeding is stopped. The intravenous antibiotic plus wound debridement are the main procedures in PCF treatment. There are different application for reparing of pharynx and closure of PCF if the fistula is not closed primarily.

Recombinant human growth hormone (rHGH) increases amino acid uptake and protein synthesis, enhance collagen formation by increasing mitogenesis. It makes wound healing more quickly in muscle and other organs. Due to the effects of GH, there are a lot of studies which rHGH is used in wound healing and fracture treatment.

In this study, we aim to research the effects of rHGH on PCF healing in rats with PCF. After an incision between floor of mouth and upper esophageus is made, the PCF on neck area is formed. As the rats in the control group is only observed neutrally, in second group GH is given subcutaneously. The closure of PCF and the scar tissue are examined histopathologically. Descriptive statistics of the data rate and frequency values are used. Variables analyzed by chi-square test, fischer test are used for conditions chi-square not provided.

As a result of statistical analysis, the collagen density in the group treated with GH was shown to be significantly greater than the control group. In contrast, as the collagen formation and

granulation tissue formation is significantly higher in group treated with GH, there isn't any differences in fibroblast density and angiogenesis between two groups.

In this study, GH was shown to have beneficial effects in the formation of collagen in the closure of PCF. However, for better evaluation of the effects of GH on the closure of PCF, more researchs should be performed.

3. GİRİŞ

Larenks kanserleri baş boyun kanserlerinin yaklaşık % 25'ini, tüm kanserlerin ise %1' ini oluşturmaktadır.¹ Hastaların çoğu yaşamlarının altıncı-yedinci dekadında olan erkek hastalardır. Larenks kanserlerinin % 75'i glottik kanserlerdir, ardından supraglottik kanserler sık görülür, en az görüleni ise subglottik kanserlerdir. Larenks kanserleri için birçok tedavi seçeneği bulunmaktadır. Klinik bulgular, hastanın genel sağlık durumu ve radyolojik bulgulara göre tedavi seçeneği; radyoterapi, endolarengeal kordektomi, laringofissür kordektomi, parsiyel larenjektomi veya total larenjektomi şeklinde olabilir.¹ Total larenjektomi ileri evre larenks kanserlerinde veya daha önce radyoterapi almış veya parsiyel larenjektomi yapılmış nüks kanserlerde kurtarma cerrahisi olarak yapılmaktadır.^{1,2} Total larenjektomi sonrası oluşabilecek komplikasyonlar; FKF, flep nekrozu, bunların sonrasında gelişebilecek karotis rüptürü, faringeal stenoz, stomal rekürrenstir.^{1,3,4,5}

FKF solunum ve sindirim sistemi cerrahilerinden sonra oluşabilecek ciddi ve sık görülen bir komplikasyondur. Total larenjektomilerden sonra FKF görülme insidansı %3-15'tir ve en sık görülen komplikasyondur.^{1,5,6,7} FKF sıklıkla 4. ve 10 günler arasında görülmektedir.^{8,9} FKF gelişmesinde önemli risk faktörlerinin; tümörün büyüklüğü, diabet, karaciğer hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, anemi, preoperatif kemoradyoterapi, kötü cerrahi teknik ile aşırı hemostaz, postoperatif hipovolemi, kötü yara bakımı ve positif cerrahi sınırlar, preoperatif trakeotomi, boyun diseksiyonu olduğu bildirilmiştir.^{3,5,10} Önceden boyun bölgesine alınan radyoterapi FKF oluşumu için en büyük risk faktörüdür. Daha önce radyoterapi alanlarda total larenjektomi sonrası FKF görülme sıklığı radyoterapi almayanlara göre 2.6 kat daha fazladır.¹¹ Ayrıca Ganly ve ark. yaptıkları çalışmada radyoterapi ile birlikte kemoterapi alan hastalarda sinerjistik etki sonucu FKF oluşma oranının sadece radyoterapi alan hastalara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir.³ Postop oluşan fistül hem hastanın hastanede kalış süresini uzatmakta hem de hastanın oral alımını etkileyerek hastanın çok hızlı kilo kaybetmesine, aynı zamanda psikolojik ve sosyal açıdan kötü etkilenmesine neden olmaktadır. FKF'nin kapanma süreci 2-3 ayı geçebilmekte, hastayı fiziksel ve psikolojik olarak kötü

etkileyebilmektedir. Uzayan iyileşme süreci, hastanın postoperatif radyoterapiye başlama zamanını da geciktirmektedir. En önemlisi, iyileşmeyen FKF sonrası karotis arter kanaması olabilir ve ölümlerle sonuçlanabilir.¹ Larenjektomi sonrası oluşan FKF tedavisinde, hastanın oral alımının kesilip nazogastrik veya parenteral beslenmeye geçilmesi, tükrüğün yara yerine geçişini engellemek için salivary by pass tüp yerleştirilmesi, her gün yapılan yara debridmanı uygulamaları kullanılmaktadır. Uzun dönemde kapanmayan ve geniş defekt olan fistüllerde alternatif olarak deltopektoral flep ve pektoralis majör kaslı-cilt flepleri kullanılarak kapatmak mümkündür.

GH, uzun zamandır GH eksikliği olan hastalarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır. GH'la ilgili yapılan birçok çalışmada, GH'un sadece GH eksikliği olan hastalarda değil birçok yara iyileşmesinde ve birçok dokunun rejenerasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Osteoporoz tedavisinde kemik ve kırıkta rejenerasyonunda, yanık tedavisinde, sinir rejenerasyonunda GH'un kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır.^{57,61} GH amino asid alımını ve protein sentezini artırır, mitogenezi artırarak kollejen oluşumunu artırır, kas ve diğer organlarda yara iyileşmesinin daha hızlı olmasını sağlar. GH'la ilgili birçok alanda çalışma yapılmasına rağmen FKF iyileşmesinde GH etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

FKF ile ilgili yapılmış çalışmalar genellikle insan çalışmaları olup, risk faktörleri üzerinde durulmuştur. Son zamanlarda sıkça kullanılan kas-cilt flepleriyle ilgilide yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Ama FKF modeli oluşturulmuş ve oluşturulan fistül modelinde fistül kapatılmasına yönelik yapılmış çok az hayvan çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmada sıçanların farinks ve özofagus üst 1/3'üne yapılan insizyon sonrası oluşturulan FKF sonrası, sıçanlara verilen rHGH'un fistül kapanmasındaki etkinliği, iyileşme dokusundaki histopatolojik değişikliklerin araştırılması amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 LARENKS MALİGN NEOPLAZİLERİ

Larenks kanserleri tüm kanserlerin %1.2 'ini oluşturur ve kanserden ölümlerin %0.73'ünü kapsamaktadır. Baş boyun kanserlerinin %25'ini ise larenks kanserleri oluşturmaktadır. Daha çok 7. dekatta peak yapıp orta yaş erkeklerde daha sık görülür. Erkek/kadın oranı 5/1'dir. Larenks kanserlerinde 5 yıllık survive %68'dir.

Glottik kanserler larenks kanserlerinin %50-75'ini oluştururlar. %57- 80'i erken evre tümörlerdir. %90'ı iyi differansiye skuamoz hücreli kanserlerdir. Glottik tümörlerde ön planda şikâyetler ses kısıklığı ve yutma güçlüğüdür. Glottiste damarsal ve lenfatik yapılar az olduğu için bölgesel metastaz diğer larenks kanserlerine göre daha az görülür. Larenks kanserlerinin %30-40'mı supraglottik kanserler oluşturur. Larenks kanserlerinin %4'ünü oluşturan subglottik tümörler ise uzun süre sessiz devam edip dispne ve disfoniyle kendini gösterir. Tanı anında yarısında kirikoid kıkırdak infiltrate, 3/4'ünde ise krikotiroid membran infiltrasyonu görülür. Subglottik tümörlerde tek cerrahi tedavi total larenjektomidir.

Etiyoloji

- Sigara
- Alkol
- Radyasyon
- Meslek (boyacı, asbestoz, nikel maruziyeti, metal sanayinde çalışanlar, benzin buharına maruz kalanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlarla temas halinde olanlar)¹⁸
- Gastroözofajial reflü
- İmmünolojik etkenler: İmmün mekanizmaların bozulması kesin olmamakla birlikte kanser gelişmesinde rol oynadığı bazı çalışmalarda ileri sürülmüş. Kanserli hastalarda kötü prognoz

bulgusu olarak metastaz varlığında Ig A düzeyi yükselir. İmmün yetmezlikli olanlarda ve immünespresif tedavi alanlarda malignensi görülme sıklığı artar.¹⁹

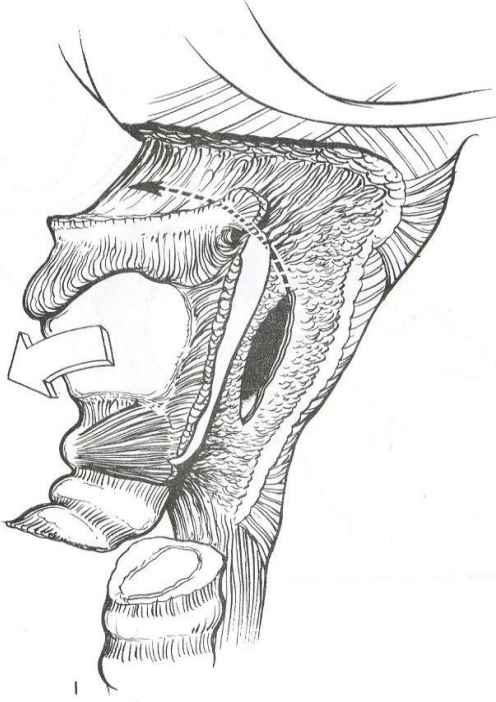
- Viral risk faktörleri: Larengeal skuamöz hücreli karsinomlarda HPV 16 varlığının %3 ile %85 arasında değiştiği bildirilmiştir. Ancak, klinik ve histolojik olarak normal olan larenkslerin %12-25'inde HPV DNA saptanmıştır. Bu yüzden, HPV 16'nın larengeal karsinogenezdeki rolü tartışmalıdır.^{20,21}

4.2 TOTAL LARENJEKTOMİ

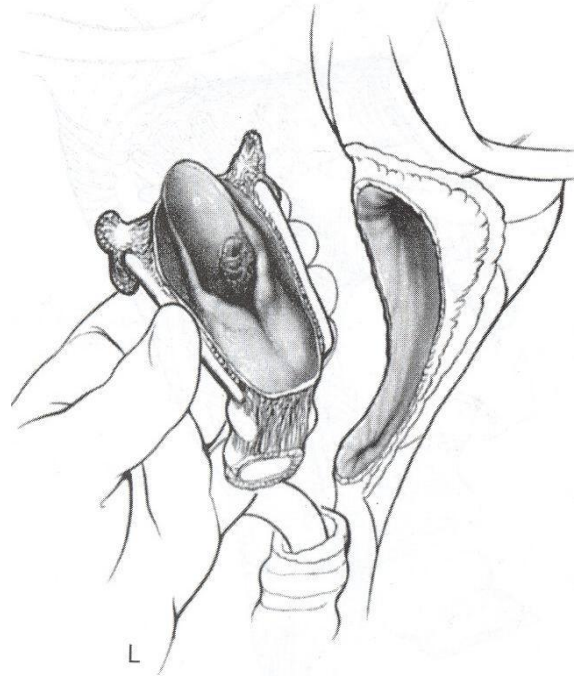
Total larenjektomide; hyoid kemik, anterior yüzeydeki strap kaslar, tüm supraglottik, glottik ve subglottik alanlar, tiroid ve krikoid kartilajlar ve 1 ve 2. trakea halkaları çıkartılır (şekil 1,2). Özofagus dil köküne dikilirken trakea cilde ağızlaştırılıp trakeostoma oluşturulur (şekil 3,4). Total larenjektomi ileri evre larenks kanserlerinde veya parsiyel larenjektomi ve radyoterapi sonrası nüks olan hastalarda yapılmaktadır.

Total larenjektomi endikasyonları şunlardır:

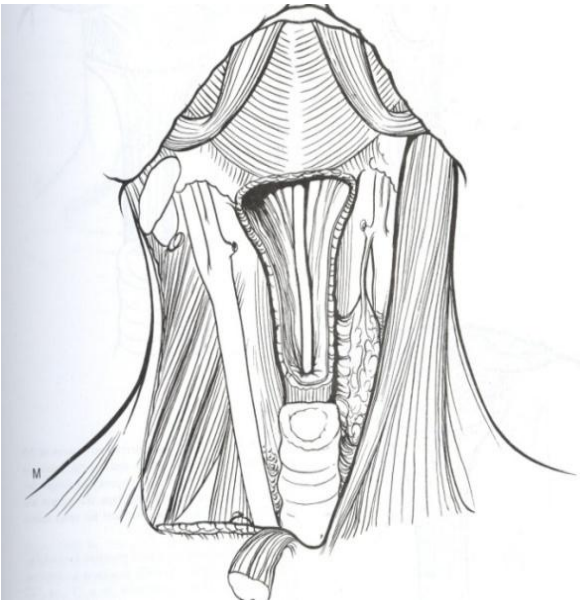
- Bilateral vokal kord fiksasyonu olan tümörler.
- Kartilaj destrüksiyonu yapan ve ekstralarengeal yayılımı olan ileri evre tümörler.
- Longitudinal ya da annuler tarzda subglottik yayılım (önde>10mm, arkada >5mm)
- Subglottik tümörler.
- Postkrikoid tutulumu olan tümörler.
- İnteraritenoid bölgeyi geçen tümörler.
- Parsiyel larenjektomi ya da radyoterapi sonrası nüks.
- Uygun antibiyotik ve hiperbarik oksijen tedavisine yanıt vermeyen radyonekroz.
- Önlenebilen aspirasyon.
- Akciğer fonksiyonlarının parsiyel larenjektomi için yetersiz oluşu.



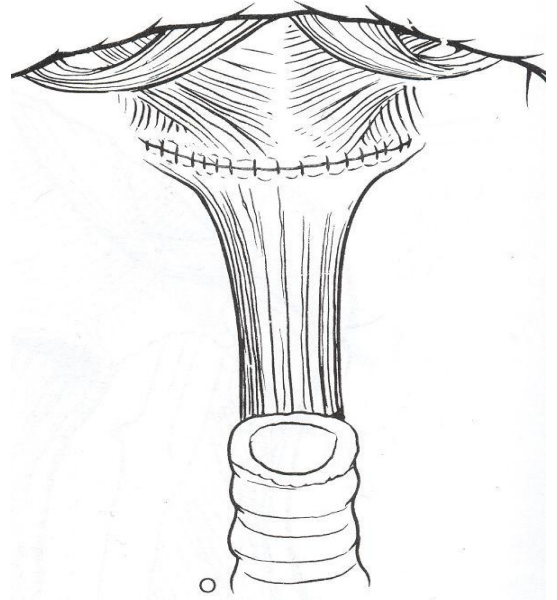
Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3



Şekil 4

4.3 TOTAL LARENJEKTOMİ KOMPLİKASYONLARI

Erken ve geç komplikasyonlar olarak sınıflandırılır.

A-Erken dönem komplikasyonlar

1. Hemoraji
2. Trakeada krut oluşumu
3. Trakeit
4. Yara enfeksiyonu
5. Farengokutanöz fistül oluşumu

B- Geç dönem komplikasyonlar

1. Farenks stenozu
2. Trakeostoma stenozu
3. Yutma güçlüğü
4. Tiroid yetmezliği
5. Karotis rüptürü
6. Psikolojik bozukluklar

4.3.1 Hemoraji

Sıklıkla deri fleblerindeki venlerden veya tiroid bezi çevresinden kaynaklanır. Cilt flebleri açılıp ligasyon yapılmalıdır.

4.3.2 Trakeada krut oluşumu

İnspire edilen havanın burun ve boğazın nemlendirici etkisinden yoksun olması sonucu sekresyonun aşırı kurumasına bağlıdır. Krutlar temizlenip ortamın nem oranı ayarlanmalıdır.

4.3.3 Trakeit

Trakea mukozasının enfeksiyonu sonucu oluşur. Oluşan pürülan salgılar sonucu ortaya çıkan krutlar bronşlar, kanülü, trakeayı tıkayabilir. Antibiyoterapi, buhar inhalasyonu, sık aspirasyon gereklidir.

4.3.4 Yara enfeksiyonu

Total larenjektomi yapılacak olan hastalara ameliyattan 8-12 saat önce profilaktik antibiotik verilmesi önerilmektedir.

4.3.5 Hipofarenks stenozu

Stenoz sonucu disfaji oluşur. Hasta rahat yutamaz. Faringoözofageal segmentte yutma sırasında negatif basınç oluşamaz ve lokma dilin kuvveti ile geriye itilir. Normalde dilin bu itme gücü 18 mmHg iken larenjektomide 32 mmHg kadar yükselir. Farenksten lokmanın özofagusa geçiş süresi uzar. Farenks lümeni stenozu, özofagus plastiği tekniğine bağlıdır veya yeterli genişlikte mukoza bırakılmadığı durumlarda olur. Eğer stenoz meydana gelirse dilatasyon yapılmalı, normal beslenme diyeti verilmelidir. T şeklinde özofagus plasti yapılanlarda darlık daha çok görülür.

4.3.6 Trakestoma stenozu

Postoperatif üç hafta ile bir yıl arasında gözlenir. Stenoz oluşumunda yara enfeksiyonu, radyoterapi, cerrahi teknik hatalar, postoperatif bakım kusurları rol oynar. Hafif ve orta derecedeki stenozlarda dilatasyon, gittikçe artan boyutta kanül kullanımı, steroid enjeksiyonu önerilir. İleri derecedeki stenozlarda tedavi skar eksizyonu ve lokal deri flepleri kullanılarak cerrahi yapılmasıdır.

4.3.7 Tiroid yetmezliği

Tiroidin rezeke edildiği, enfeksiyona bağlı nekroz gelişen veya radyoterapi sonrası tiroid yetmezliği gelişen olgularda hipotiroidi bulguları ortaya çıkar. Tedavi için hormon replasman yapılır.

4.3.8 Karotis rüptürü

Farengokütanöz fistül, cilt nekrozu, preoperatif radyoterapi uygulanması hazırlayıcı faktörlerdir. Beraberinde boyun diseksiyonu da yapılmışsa risk daha da yüksektir.

4.3.9 Psikolojik bozukluklar

Hastalarda çeşitli derecelerde depresyon ortaya çıkabilir. Psikiyatri konsültasyonu istenmelidir.

4.3.10 Faringokutanöz fistül

FKF sindirim sistemiyle boyun cildi arasındaki doku bütünlüğünün bozulup tükürük salgısının cilde gelmesiyle bir yol oluşması sonucu gözlenmektedir. FKF solunum ve sindirim sistemi cerrahilerinden sonra oluşabilecek ciddi bir komplikasyondur. Total larenjektomilerden sonra FKF görülme insidansı %3-15'tir ve total larenjektomi sonrası görülen en sık komplikasyondur.^{1,5,6,7} Yara yerinde eritem, ödem, açılma, pürülan materyal ve tükürük gelişi ile başlar. FKF sıklıkla 4. ve 10 günler arasında görülmektedir.^{8,9} Dokunun daha önce radyoterapi almış olması, yetersiz beslenme durumu, larenjektomiye boyun diseksiyonunun eklenmesi, preoperatif trakeotomi, farengeal mukozanın kapatma biçimi, enfeksiyonlar, cerrahi sınırdaki tümör kalması, diyabet, anemi gibi faktörler fistül oluşumunda rol oynamaktadır.^{3,5,10} En büyük risk faktörü boyun bölgesine daha önce alınan radyoterapi iken, radyoterapi ile birlikte kemoterapi alınması FKF riskini daha çok arttırmaktadır. Daha önce radyoterapi alanlarda total larenjektomi sonrası FKF görülme sıklığı RT almayanlara göre 2.6 kat daha fazladır.¹¹ Fistül oluşumunu önlemek için uygun protein, mineral ve nitrojen desteğinin sağlanması, diyabet, anemi gibi altta yatan etmenlere karşı önlem alınması, intraoperatif olarak farenks kapatılırken teknik hatalardan kaçınılması gerekmektedir. FKF oluştuğu zaman başlangıç tedavisi oral alımın kesilmesi, antiseptik gazlarla fistül traktının tamponajı, uygun antibiyotik tedavisi ve granülasyon dokusunun arttırılmaya çalışılmasıdır. Bütün bu önlemlere rağmen, % 30 hastada FKF primer olarak kapanmamakta ve cerrahi müdahale gerekmektedir.^{48,49} Primer kapatma sağlanamıyorsa, farenksle cilt defekti arasının pediküllü kas flebiyle doldurulması, kanlanmayı arttırıp avasküler ölü dokulara antibakteriyel faydayı arttırmaktadır.

4.4 GROWTH HORMON

GH (somatotropin hormon) pitüitar bez tarafından salınan, 191 aminoasid içeren küçük bir protein molekülüdür. Salınımı pulsatil olup, en büyük salınım pulsaları gece olur. Vücutta GH'un 24

saat içinde maksimum salınım olduğu dönem puberte dönemi olmakta, hem erkekler hem de kadınlarda bu dönemden sonra yavaşça azalır. GH seviyesinde yaşlılıkta adolesan döneme göre %25 azalma olur. Hipotalamik GHRH (growth hormone releasing hormone) hipotalamiko-hipofizer portal yolla ön hipofize gidip GH sekresyonunu arttırırken, hipotalamustan salınan growth hormone inhibitory hormone (somatostatin) aynı yolla inhibitor etki yapar. GH salınımı azaltan veya arttıran birçok faktör vardır. Otonomik sistem stimülasyonu, digoksin, ACTH, melanosit stimulan hormon, dopamin, serotonin, glukagon ve seks hormonları GH salınımını etkiler. Egzersiz, uyku, stres, hipovolemi, açlık, travma, kanda serbest yağ asidi azalması da GH sekresyonunu stimule eder. Hiperglisemi, hipertrigliseridemi, somatostatin, kortizol, obesite, eksojen GH verilmesi ise kısmen GH salınımını inhibe eder.²² Akut dönemde GH sekresyonunu hipoglisemi daha fazla etkilerken, kronik durumlarda hücrel protein deposunun azalması GH salınımını daha fazla stimule etmektedir.

Erişkin bir insanda plazma GH seviyesi 1.6- 3 ng/ml iken çocuk veya adolesan dönemde plazma seviyesi 6 ng/ml'dir. Uzun süren açlıklardan sonra GH plazma düzeyi 50 ng/ml'e ulaşabilmektedir.^{22,61}

Growth hormonun protein metabolizmasına etkisi^{22,60}

- GH protein sentezini arttıran anabolik bir hormondur (Doku büyümesi).
- Hücre membranlarından aminoasit transportunu hızlandırır.
- Ribozomlarda protein sentezini arttırır.
- DNA'dan RNA yapımını arttırır.
- Protein ve aminoasit katabolizmasını azaltır.

Growth hormonunun yağ metabolizmasına etkisi²²

- Yağ doku hücrelerindeki trigliseridlerin parçalanma ve oksidasyonunu uyararak yağların kullanımını artırır (ketojenik etki).

Growth hormonunun karbonhidrat metabolizmasına etkisi²²

- Glikozun enerji kaynağı olarak kullanımını azaltır.
- Hücrede glikojen depolanmasını arttırır.
- Glikozun hücelere alınmasını azaltarak kan glikoz düzeyini yükseltir.
- Glikojen ve protein depolarını korur. Yağ depolarından kana geçirdiği yağ asitlerinden karaciğer ve kasta glikoz sentezini arttırır. Enerjinin glikojen ve aminoasitlerden sağlanmasını azaltır.
- GH diabetojeniktir, karaciğerde glikoz yapımını arttırır.
- Kasların glikoz kullanımını azaltır.
- Hipofizer diyabet sonrası da pankreatik diyabet gelişimine yol açabilir.

Growth hormonunun kemik ve kıkırdaklar üzerine etkisi²²

- Osteogenik ve kondrositik hücrelerde protein depolanmasını sağlayarak kemik büyümesini arttırır.
- Osteogenik ve kondrositik hücrelerin çoğalmasını sağlar.
- Konrositlerin osteogenetik hücelere dönüşümünü stümüle eder.

Somatemedin Teorisi

- Büyüme hormonu kemik, kıkırdak ve iskelet kası gibi dokulara doğrudan etkimeyip, SOMATOMEDİN adı verilen bir grup peptit tarafından bu etkisini gösterir.
- Somatemedinler GH etkisiyle karaciğer ve diğer dokulardan salınır ve kanda proteinlere bağlı olarak bulunur.
- Bunlara büyüme faktorleri de denilmektedir ki etkileri insulinin büyüme üzerindeki etkisine benzediğinden **IGF I, IGF II (insulin benzeri büyüme faktörü)** olarak isimlendirilirler.
- Her ikisi de büyüme ile ilgili hücre zarındaki reseptörlere bağlanır, büyüme ve hücre sel başkalaşımı arttırırlar.

Travma, hemoroji, ameliyat ve analjeziyi takiben GH değerlerinin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.²³ GH bu durumlarda protein kaybını önlemekte ve nitrojen dengesini düzenler.²⁴ Artmış GH, protein sentezini arttırırken yağ depolarını da mobilize eder. Ayrıca GH insülin salınımını da inhibe eder ve hiperglisemiye yol açabilir. GH insülin benzeri hormon (IGF-1, somatomedin) salgılatarak protein sentezini etkiler. IGF-1 karaciğerde yapılır ve travmanın katabolik etkilerini azaltır. Karaciğerde, kaslarda protein sentezini arttırıp proteolizi azaltır. IGF-1 karaciğerde glukogenez de yapar. Yaşlı dokulara glukoz alımını ve lipogenezi arttırır. Kasta da glukoz alımını ve protein sentezini arttırır. IGF-1 kemik gelişiminde de etkilidir.

GH'un travma, cerrahi, stres gibi durumlarda akut faz reaktanlarını düzenleyici rolü de bulunmaktadır. Normalde travma sürecinde, karaciğer akut faz reaktanlarının üretildiği ve kontrol edildiği major organdır. Karaciğerdeki protein üretimi albumin gibi esas proteinlerden yara iyileşmesi, immünite ve koagülasyonun sağlanması için akut faz reaktanlarına (AFR) doğru kayar; böylece kandaki ve yara yerindeki AFR artarken albumin azalır ve hipoalbuminemi görülür.^{25,26,27,28} GH vücudun strese karşı cevabını module edip akut faz reaktanlarının oluşumunu sınırlayıcı etki gösterir; böylece protein sentezi artarken, AFR' da normal stres durumuna göre daha düşük olur. Jarrar ve ark. yaptığı çalışmada yanık oluşturdukları sıçanlarda, 2.5 mg / kg/ gün GH tedavisi sonrası plesebo grubuna göre fark edilir derecede AFR 'da azalma görülürken, serum albumin ve albumin mRNA değerlerinde azalma gözlenmemiştir.^{26,27,28}

GH tedavisi yetişkinlerde, normal vücut yapısının sağlanması, kas ve kardiyak fonksiyonların iyileştirilmesi, serum lipid konsantrasyonlarının normale dönmesi, katabolik hastalıklarda (yanık tedavisi gibi), yara iyileşmesi ve hayat kalitesinin iyileştirilmesi için kullanılırken, çocuklardaki tedavi hedefleri, lineer büyüme ve gelişmenin sağlanmasıdır.²⁹

Katabolik durumlarda (cerrahi, travma, malnutrisyon, yanıklar.) artmış oksijen tüketimi, negatif nitrojen dengesi ve kilo kaybı ile karakterize bir hipermetabolizma durumu görülür. Organizmanın enerji ihtiyaı glukozdan sağlanır. Hipermetabolizma sonucu glukoz tükenmekte,

organizma kendi vücut proteinini yıkarak enerji açığını kapatmaya çalışmaktadır (glukoneogenez). Protein yıkım ürünü olan nitrojen idrarda artmakta, vücudun yapısal ve fonksiyonel komponenti olan protein yıkımı, yara iyileşmesinde gecikme, immün sistemde baskılanma gibi pek çok olaya zemin hazırlamaktadır.^{30,31}

Çeşitli deneysel çalışmalarda GH 'un yara iyileşmesinde, özellikle dermal, enterik yaralarda; normal, malnütrisyonlu, yanıklı, steroid tedavisi altında veya tümör taşıyan hayvanlarda hidroksprolin etkileşimini ve doku gerginliğini arttırarak iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir.^{32,33,34} IGF-1'in osteoblast proliferasyonunu ve kemik yapımını stimüle ederek volümetrik kemik yoğunluğunda artma ve IGF-1'in kemik mineralizasyonu ve aynı şekilde boylamsal kemik büyümesine etkiye bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.³⁵ rHGH'un major cerrahi, travma, sepsis veya termal hasar durumlarında yara iyileşmesini ve immün fonksiyonları hızlandırdığı, hipermetabolik cevabı azalttığı gösterilmiştir.³⁶

4.5 YARA İYİLEŞMESİ

Yara, fiziksel olarak doku bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi hücresel ve biyokimyasal olaylardan oluşan 3 aşamalı bir süreçten oluşur :³⁷

- Hemostaz ve inflamasyon,
- Proliferasyon (Granülasyon dokusunun formasyonu, anjiogenez),
- Maturasyon (Skar formasyonu, remodeling).

4.5.1 Hemostaz ve İnflamasyon

Yaralanma anı ile başlayan bu aşamada, 3- 4'üncü güne kadar yara yerinde fibroblastlar görülür. İlk olarak yara bölgesindeki damarlarda vazokonstriksiyon oluşmasıyla koagülasyon başlamış olur. Travma sonucu damarların rüptüre olması ile subendoteliyal kollajen trombositler ile karşılaşır ve trombosit agregasyonu oluşur ve koagülasyon kaskadının aktivasyonu başlamış olur. Bu

aktivasyonla beraber trombositlerden bazı sitokinler, serotonin, kallikrein ve büyüme faktörlerinin salınımı gerçekleşir. Salgılanan bu mediyatörlerin etkisi ile bir taraftan yara bölgesindeki kapillerlerde vazodilatasyon ve permeabilite artışı olurken diğer taraftan da yukarıda sayılan faktörlerin kemotaksis etkisi ile nötrofiller, fagositler ve diğer inflamatuvar hücreler yara bölgesine göç ederler (Migrasyon). Hücre göçü ile birlikte artmış vasküler permeabilite sonucu yarada proteinden zengin serum birikir. Hasarlı doku ile serum arasındaki ilişki sonucu kompleman sistemi aktive olur (C3) ve bu da kemik iliğinden yeni nötrofil yapımını uyarır. Aynı zamanda çok kısa bir sürede (1-2 dakika) yara etrafındaki lökositlerin endotele yapışması sonucu lokal sitokinlerin (C5, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör (PAF)) salınımı gerçekleşir. Ardından nötrofiller yara alanına gelir. Tüm bu gelişmeler yaralanmadan sonraki ilk 2 gün içinde gerçekleşir. Bundan sonraki aşamada nötrofillerden ziyade makrofajlar ve lenfositler kritik rol oynar.

Makrofajlar debritleme, matriks sentezi ve anjiogeneziste (neovaskülarizasyon) rol alır. Makrofajlar laktat üretimi de yaparak anjiogenetik faktörlerin yapımı için uygun ortam sağlarlar. Yaradaki makrofajların aktivasyonu sonucu sitokinlerin salınımı daha da artar ve anjiogenezis uyarılır. Makrofajlar nitrik oksit salarak antimikrobiyal etki de gösterirler. Endotel hücreleri, trombositler, fibroblastlar ve monositler de nitrik oksit salgılayarak yarada sürekli nitrik oksit mevcudiyetini sağlarlar. Makrofaj kaynaklı sitokinler (özellikle Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)) ikinci günden itibaren yaradaki fibroblastlarda fenotipik değişikliğe ve sayıca artmaya yol açarak esas olarak kollajen sentezini ve yara kontraksiyonunu sağlarlar. Lenfositler de makrofajlar gibi değişik hücre tipleri için kemotaktik faktörler üreterek iyileşmede süreklilik sağlarlar.

Makrofaj sayısı 3-6'ncı günde pik yaparken lenfosit sayısı 8-14'üncü günlerde daha fazladır. Matüre yaralarda henüz bilinmeyen bir mekanizma sonucunda makrofaj ve lenfositlere pek rastlanmaz. Yara iyileşmesinin bu erken fazında yaradaki oksijen basıncı iyileşmeyi etkileyen en önemli faktördür. Yaradaki oksijen basıncı 30 mmHg'in altına düşerse makrofajlar inaktive olur.^{37,38}

4.5.2 Epitelizasyon

Kısmi kalınlıklı yaralarda epitel hücreleri, yara ve kenarlardan karşılıklı hareketle epitelizasyonu sağlarlar. Tam kalınlıklı yaralarda epitel hücreleri kolaylıkla yara kenarlarından karşılıklı göç işlemini gerçekleştirirken alttaki dermal oluşumlarda iyileşme, çok daha uzun süre alabilir. Epitel iyileşmesi sağlıklı kişilerde 24-48 saatte tamamlanabilir. Daha sonra epidermin bazal tabakası mitotik aktivite göstererek kalınlaşır. Ardından keratin üreterek normal deri rengini alır. Keratin üreten ve epitelium hücrelerinin atası olan keratinositler epitelizasyonun yanında koloni stimulan faktör (CSF), interlökin-1,3,6 ve büyüme faktörü de salgılayarak yara iyileşmesine ek katkıda bulunurlar. Bu tip iyileşmede epitel altındaki bağ dokusu pek oluşmaz ve yara, minimal skar dokusu ile iyileşir.³⁷

4.5.3 Proliferasyon Fazı Granülasyon Dokusunun Oluşması

Bu faz yaralanmadan sonraki dördüncü günden başlar ve yaklaşık 21. günde tamamlanır. Bu fazın esas aktör hücreleri fibroblastlardır. Bu dönemin diğer bir önemli hücresi de endotel hücreleridir. Fibroblastlar çevredeki perivasküler bağ dokusundan yaraya doğru hücum ederler, endotel hücreleri ise yara etrafındaki sağlam venüllerden proliferer olurlar ve yeni kapillerlerin yapımını sağlarlar. Önceden salgılanmış olan büyüme faktörleri ve sitokinler bu hücrelerin aktivasyonundan sorumludurlar. Her ne kadar yara iyileşmesinin 1. gününde yarada az miktarda fibroblast bulunsa da esas olarak 4. günde aktive olurlar ve yüksek miktarda fibronektin ve daha sonra da kollajen, elastin ve glukozaminoglikan üretirler. Kontraksiyon yara iyileşmesinin normal bir safhası olup 8-10. günlerde gelişmeye başlar ve yaranın kapanmasına yardımcı olur. Yaralanma sonucu yara alanında oluşan rölatif hipoksemi, neovaskularizasyon için bir uyarandır. Fibroblast proliferasyonu ile birlikte anjiogenezis, granülasyon dokusunun ana bulgularıdır. Yara çevresindeki kapillerlerden başlayan neovaskularizasyon 6-7. günlerde tamamlanır.³⁷

4.5.4 Matürasyon Fazı

Bu dönemde esas olan kollajen sentezidir. Kollajen sentezinin yeni başladığı proliferasyon fazının son aşamasından, skar formasyonunun tamamlandığı zamana kadar devam eder (10'uncu gün - 6'ncı ay). Bu fazda sentezlenen kollajenin yanında, oluşan kollajenin yıkımı da söz konusudur. Yara iyileşmesinin en önemli safhasıdır. Çünkü bu fazın hızı, kalitesi ve oluşan matriksin miktarı skar oluşumunu direkt olarak etkilemektedir. Kollajen sentezi 14-21'inci günlerde maksimaldir.³⁷

4.5.5 Matriks Formasyonu

Matriks yara içindeki hücre dışı yapıdır ve çoğunlukla protein yapısında moleküllerden oluşur. Tip 1 ve tip 3 kollajen, intersitisyel kollajen olup cildin major kollajenidir ve gerilme kuvvetinin oluşmasından sorumludur. Yaranın matürasyonu için kollajen sentezinin yanında, yıkım ve bu iki olay arasındaki denge de önemlidir.³⁷

4.5.6 Skar Gelişmesi

Yara iyileşmesinin son aşamasıdır.

4.5.7 Yara Kontraksiyonu

Yara uçlarının birbirine yaklaşmasıdır. Sonunda skar dokusunun küçülmesi sağlanır. Miyofibroblastların yara kontraksiyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir.

5. MATERYAL VE METOD

5.1 Deney hayvanları

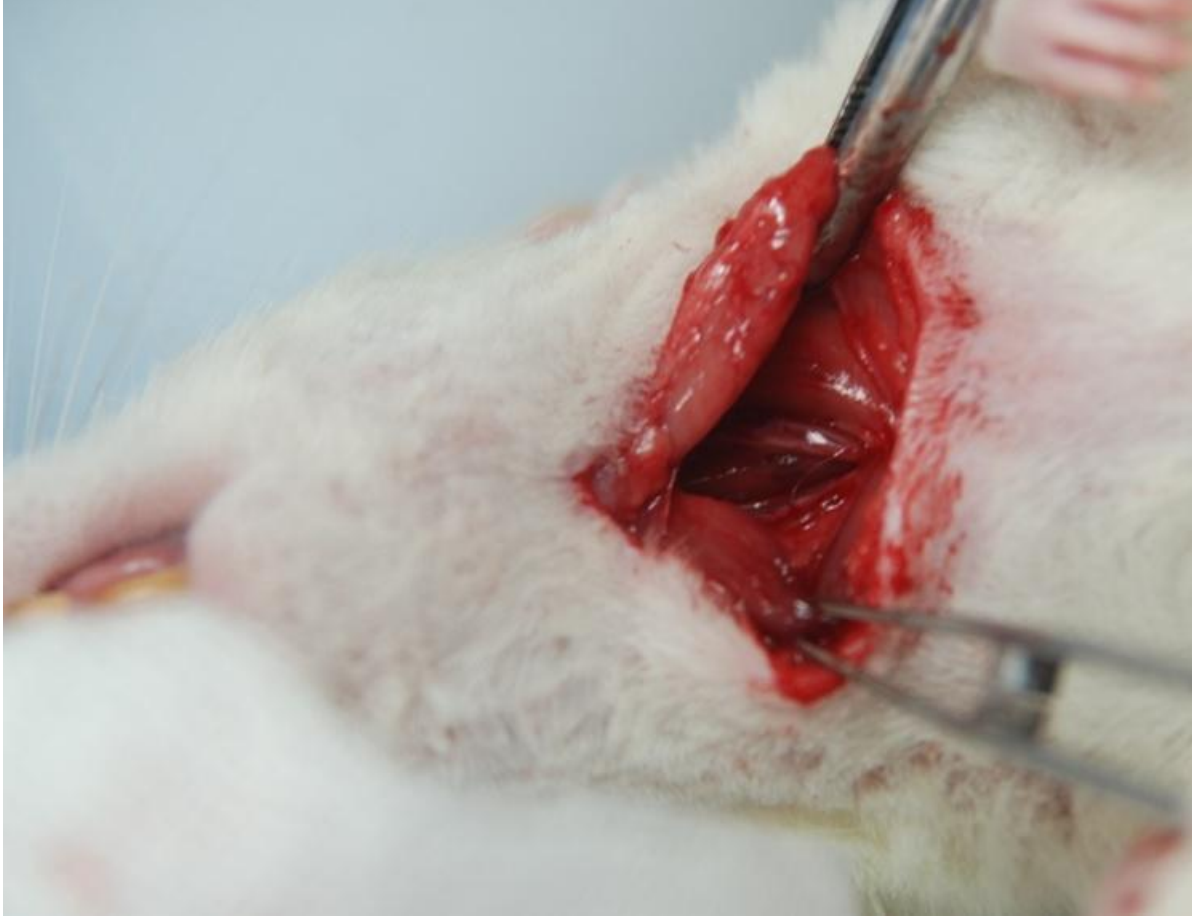
Çalışma Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 11.04.2011 tarihli ve '23.2012.mar' numaralı onayı alındıktan sonra Marmara Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'ndan temin edilen 250-350 gram ağırlığındaki 40 Sprague Dowley sıçan (30'u erkek,

10'u dişi) üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanları Marmara Üniversitesi Deney Hayvanı Laboratuvarında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusuna uyarak, sıcaklığın 23 derecede sabitlendiği bir ortamda, her biri ayrı çelik kafesler içinde barındırılarak, herhangi bir besin kısıtlaması içermeyen kuru yemle beslendi. Ayrıca sıçanlara her gün sabah akşam 5 cc subkutan %5'lik dekstroz (poliflex %5 dekstroz, Polifarma ilaç San, Türkiye) enjeksiyonu yapıldı. Çalışma sırasında 40 sıçandan 5'i (2'si kontrol grubu, 3'ü Growth hormon verilen gruptan) çalışma süresini tamamlayamadan öldü ve çalışmadan çıkartıldı.

5.2 Hayvanların hazırlanması ve Deneysel işlem

40 sıçan, her grupta 15 erkek ve 5 dişi olmak üzere, iki gruba ayrıldı. Çalışmanın başında 40 denek hayvana faringoözofagotomi yapıldı. 1. gruba herhangi bir tedavi uygulanmadan boyunda fistül oluşumu ve sonrasında kapanma özellikleri takip edilirken, 2. gruptaki sıçanlara cerrahi sonrası her gün subkutan rHGH (Saizen click easy, Merc Serono S.p.A., İtalya) enjeksiyonu yapılarak takip edildi.

12 saat aç bırakılan hayvanlar 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, Almanya) kombinasyonu ile sedatize edilip boyun bölgesi traş edildi. Cerrahi masaya sırt üstü pozisyonda baş ekstansiyonda yatırılan sıçanlara boyun orta hatta 3 cm vertikal insizyon yapıldı. Cilt, cilt altı geçildi. Künt diseksiyonla sternohiyoid kasa kadar açılıp sternohiyoid kas laterale çekilince trakeanın altında özofagus bulundu. Üst özofagus ve farinks lateral sınırı arasında ağız tabanı ve üst özofagus arasında 1,5 cm'lik uzunlamasına insizyon yapıldı. Kanama kontrolü monopolar koter ile sağlandı. İçteki 1.5 cm'lik faringoözafagotomi insizyonu 8.0 vikril ile 3 dikiş atılarak gevşek şekilde kapatıldı (resim 1). En son cilt 4.0 ipek dikiş ile sıkıca kapatıldı (resim 2).



Resim 1: Boyun orta hatta 3 cm vertikal insizyon yapıldıktan sonra cilt altı kaslar ekarte edildi, stenohipoid kas lateralize edildikten sonra trakea altında özofagus bulunup ağız tabanından özofagus üst 1/3'ü arasına 1.5 cm insizyon yapıp 8.0 vikril ile sütüre edildi.



Resim 2: Cilt 4.0 ipek ile kapatıldı.

Kontrol grubuna 14 gün boyunca sadece sabah akşam 5 cc %5'lik dekstroz subkutan enjekte edildi. 2. gruptaki 20 sıçana postop ilk günden itibaren 14 gün boyunca 2 mg/kg/gün rHGH ve 5 cc %5'lik dekstroz subkutan olarak enjekte edildi. Sıçanların oral alımları sıkıntılı olduğu ve kilo kaybetmeye başladıkları için deneklere hergün sabah akşam subkutan 5 cc %5'lik dekstroz verildi. Her gün sıçanların boyunlarındaki değişiklikler, akıntı olup olmadığı, yara açılması olup olmadığı kaydedildi. Sıçanların kiloları 1. hafta sonunda ve sakrafikasyon sırasında tartıldı. Ortalama 3. veya 4. günde hem 1. grup hem de 2. grup sıçanlarda boyunda akıntı ve yara yerlerinde açılma izlendi. Çalışma sırasında kontrol grubunda 2, GH verilen grupta 3 sıçan bir haftayı tamamlayamadan öldü ve çalışmadan çıkartıldı.

Deneklerden 14 gün sonra 15 cc intrakardiak kan alınıp boyunları kesilerek sakrafiye edildi. Bütün gruplarda sıçanların larenksleri farinks ve üst özofagus ile cilt bütünlüğü bozulmadan eksize edildi. Çıkarılan spesmenler 24 saat formaldehitte fikse edildikten sonra kesitlere bölünerek farinks ve özofagus ile cilt arasında fistül oluşumu makroskopik olarak değerlendirilip skorlandı. Sıçanlarda fistül olan kısımlar etraflarındaki sağlam dokulardan eksize edildi. Fistülün cilt, cilt altı ve özofagusa

uzanımı makroskopik olarak gözlemlendi ve ortasından geçen bir kesit alınarak bloklandı. Cilt altı ve özofagusta fistül oluşumu izlenmeyen olgularda, olgular insizyon hattından geçen kesit alınarak bloklandı. Bu işlem patolog ile birlikte yapıldı. Kasetlenen dokularda daha sonra otomatik doku takip cihazında (Shanden exelsior ES) 13 saat süre ile takip işlemi yapıldı. Bu işlemde dokulara sırasıyla (2 kez 30'ar dakika formaldehit, 6 kez 60'ar dakika alkol, 3 kez 60 dakika xylene, bir kez 60 dakika ve iki kez 80 dakika parafin) uygulandı.

Takip işleminden sonra parafine gömülen dokulardan 2 mikron kalınlıkta kesitler alınarak Hematoksilen&Eosin ile boyandı. Boyalı kesitler ışık mikroskopisi ile incelendi (Olympus Bx-50, Olympus Optical). Her örnek patolojiye numaralandırılarak gönderildiği ve örneğin hangi gruba dahil olduğu bilinmediği için patologun kör değerlendirme yapması sağlandı.

Fibroblast yoğunluğu mikroskopta bir büyük büyütmede fibroblast hücre sayısı <5 minimal fibroblast yoğunluğu, 5-15 arası orta derecede fibroblast yoğunluğu, 15-50 yoğun , >50 çok yoğun fibroblast oluşumu şeklinde değerlendirilip sınıflandırıldı. Aktif iltihabi hücre yoğunluğunda nötrofil sayısı, kronik iltihabi hücre yoğunluğunda makrofaj ve lenfositler sayıldı; sınıflandırma iki parametre için mikroskopta bir büyük büyütmede hücre sayısı <5 az, 5-15 arası orta, 15-50 arası yoğun ve >50 çok yoğun iltihabi hücre birikimi şeklinde değerlendirilip yapıldı. Anjiogenesisizde bir büyük büyütmede kapiller sayısına bakıldı; 1. grup anjiogenesisiz yok, 2. grupta orta yoğunlukta anjiogenesisiz olup 1-5 arası kapiller sayısı mevcut, 3. grup 5-10 arası kapiller sayısı olup yoğun anjiogenesisiz, 4. grup 10 < kapiller sayısı olup çok yoğun anjiogenesisiz oluşumu şeklinde değerlendirildi. Ülserasyon ve epitelizasyon değerlendirilirken squamoz epitelium hücrelere bakılıp epitelize alanlar ve ülsere alanlar gösterilip ülserasyon ve epitelizasyon şeklinde iki gruba ayrıldı.

Çalışmada kullanılan parametreler:

- a. Makroskopik FKF kapanması değerlendirilmesi
- b. Fibroblast yoğunluğu
- c. Kollojen oluşumu
- d. Kronik iltihabi hücre infiltrasyonu
- e. Aktif iltihabi hücre infiltrasyonu
- f. Anjiogenezis
- g. Yüzey epitelizasyonu

İstatistiksel yöntem: Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde oran, frekans değerleri kullanıldı.

Değişkenlerin analizinde ki-kare test, ki-kare koşulları sağlanmadığında fischer test kullanıldı.

Analizlerde SPSS 20.0 programı kullanıldı.

6. BULGULAR

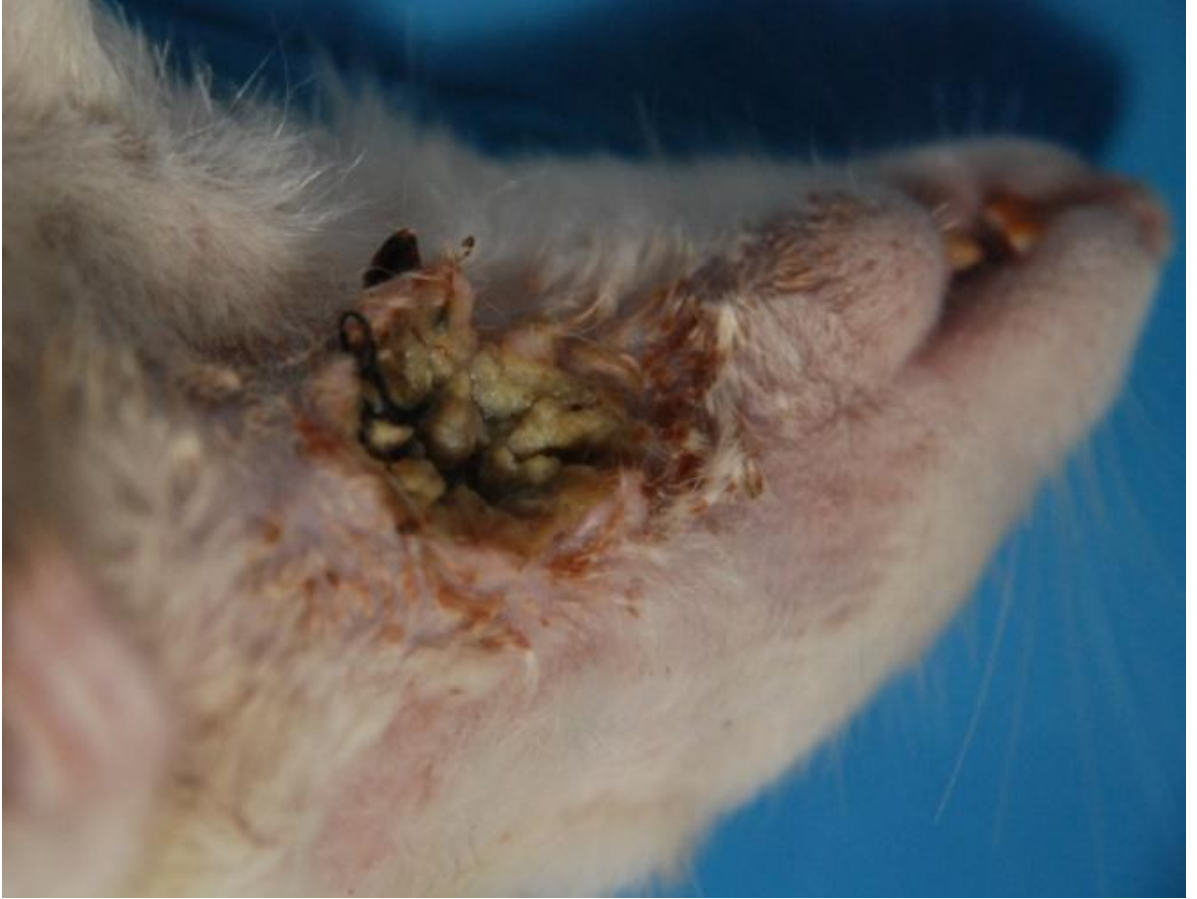
Bu çalışmada iki grup arasında 7 parametre karşılaştırıldı. 1. grup (kontrol grubu) denek hayvanlarda faringoözefagotomi yapıldıktan 14 gün sonra boyun insizyon yerinin kapanmasına bakıldı. 2. grupta ise (GH verilen grup) faringoözafagotomi yapıldıktan sonra 14 gün boyunca her gün GH subkutan verilip 14 gün sonunda boyunda kapanmaya bakıldı. İstatistiksel analizlerde, makroskopik FKF kapanması, normalde yara iyileşmesi için gerekli olan fibroblast yoğunluğu, akut ve kronik iltihabi hücre yoğunluğu, kollojen oluşumu, anjiogenezis ve epitelizasyonda kontrol grubuyla GH verilen grup arasında FKF kapanmasında immünohistokimyasal fark olup olmadığına bakıldı.

Makroskopik FKF kapanması değerlendirilmesi: Hayvanlar sakrafiye edildikten sonra spesmenler parafin bloklara koyulmadan önce boyun bölgesinde açıklık olup olmadığı, tükrük veya yemek artığı olup olmadığına göre makroskopik olarak değerlendirme yapıldı. rHGH verilen grupta

17 sıçandan sadece 1 tanesinde boyunda açıklık varken, kontrol grubunda 18 sıçandan 10 tanesinin boynu açık izlendi, boyunda ülserasyon ve yemek artığı birikimi izlendi (resim 3, resim 4). İstatistiksel analiz ki kare test kullanılarak yapıldı. GH verilen grupta FKF kapanması kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p = 0.002 < 0.05$) daha fazlaydı (tablo 1, grafik 1).



Resim 3: Makroskopik görüntü- boyunda fistül kapanmış



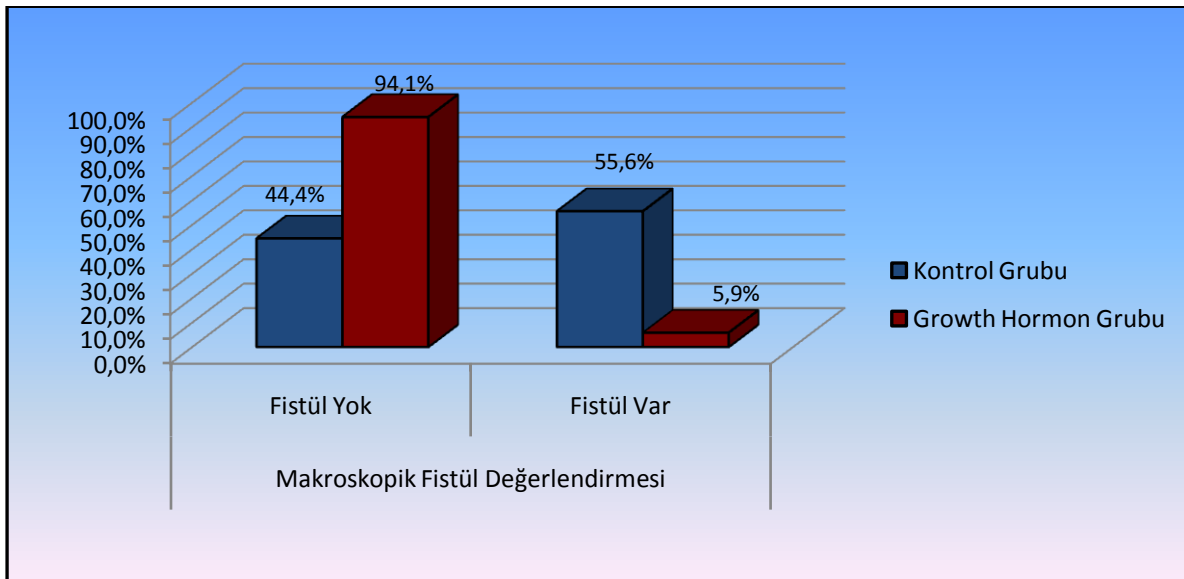
Resim 4: Makroskopik görüntü – boyunda apse oluşmuş

Tablo 1

		Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p
		n	%	n	%	
Makroskopik	Fistül Yok	8	44,4%	16	94,1%	<i>0,002</i>
	Fistül Var	10	55,6%	1	5,9%	

Ki-kare test

Grafik 1



Fibroblast yoğunluğu: Mikroskopik incelemelerde fistül iyileşmesinde kontrol grubu ve GH verilen çalışma grubu arasında fibroblast yoğunluğu açısından fark olup olmadığına bakıldı. 4 grup olarak değerlendirildi. 1. grupta fibroblast oluşumu çok az; 2. grupta orta derecede; 3. grupta yoğun; 4. grupta ise çok yoğun fibroblast oluşumu şeklinde değerlendirildi. Analizler, istatistiksel koşullara uyması için fibroblast yoğunluğu çok az ve orta derecede bir grup, yoğun ve çok fazla fibroblast yoğunluğu bir grup olarak değerlendirilerek yapıldı (resim 5).

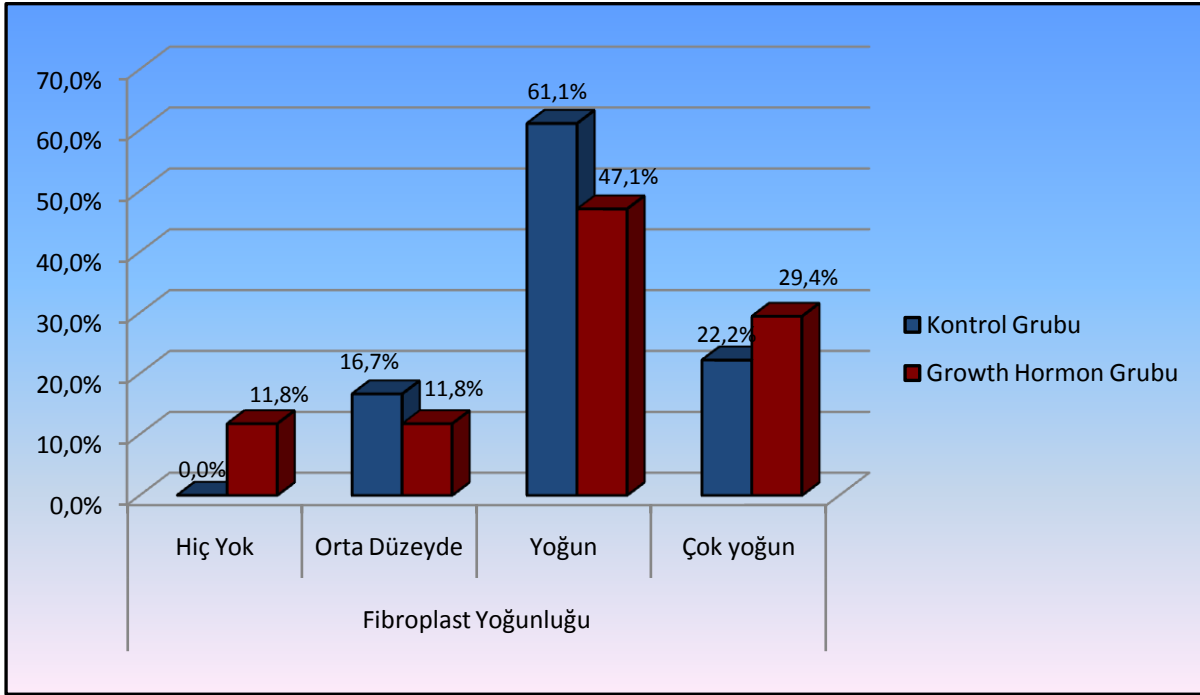
İstatistikler Fischer testi ile yapıldı. Kontrol grubu ve GH verilen grupta yoğun fibroblast oluşumu izlenip, iki grup arasında fibroblast yoğunluk oranları anlamlı ($p = 0,691 > 0,05$) farklılık gösterilmedi (Tablo 2, grafik 2).

Tablo 2

		Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p
		n	%	n	%	
Fibroblast Yoğunluğu	Hiç Yok	0	0,0%	2	11,8%	0,691
	Orta Düzeyde	3	16,7%	2	11,8%	
	Yoğun	11	61,1%	8	47,1%	
	Çok yoğun	4	22,2%	5	29,4%	

Ki-kare test (Fischer test)

Grafik 2



Resim 5; Kontrol grubunda epitelize fistül traktı, etrafında iltihabi hücre yoğunluğu azalmış, yoğun fibroblast izleniyor

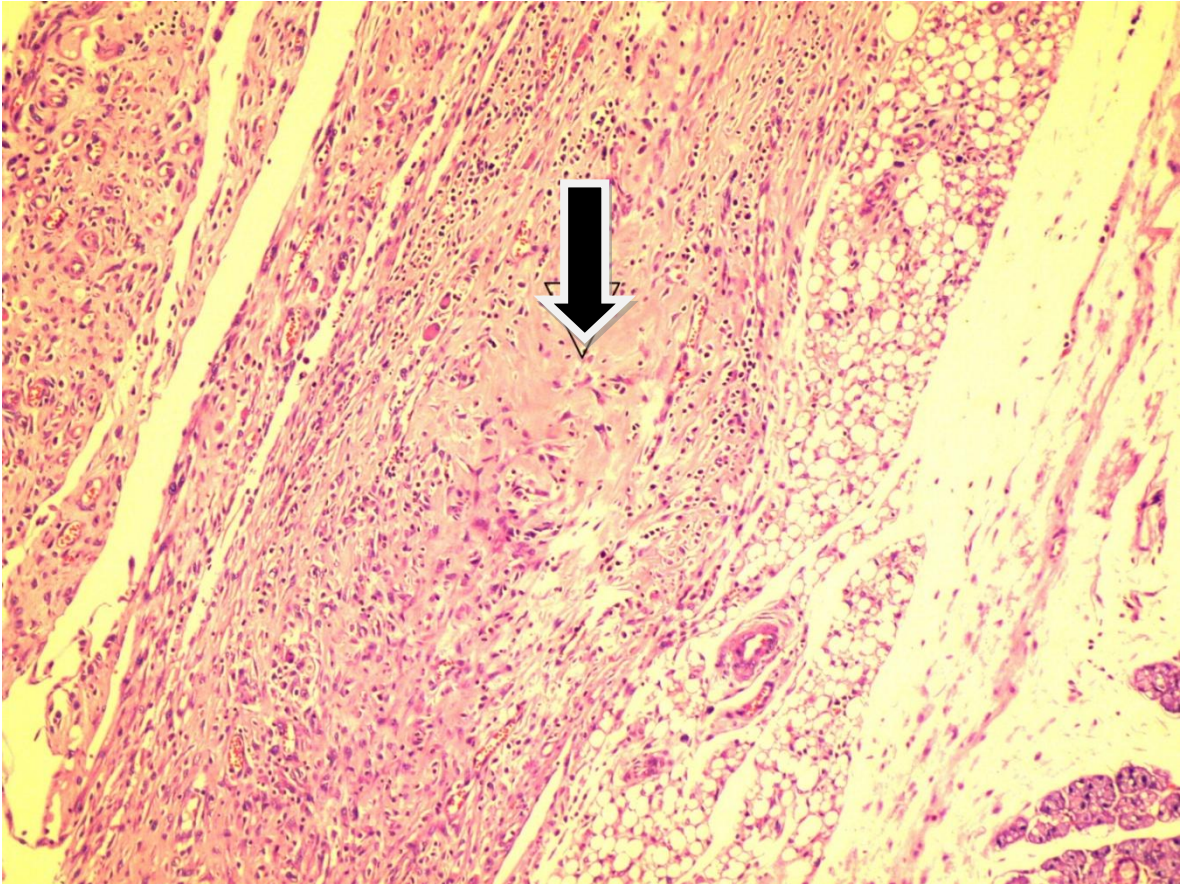
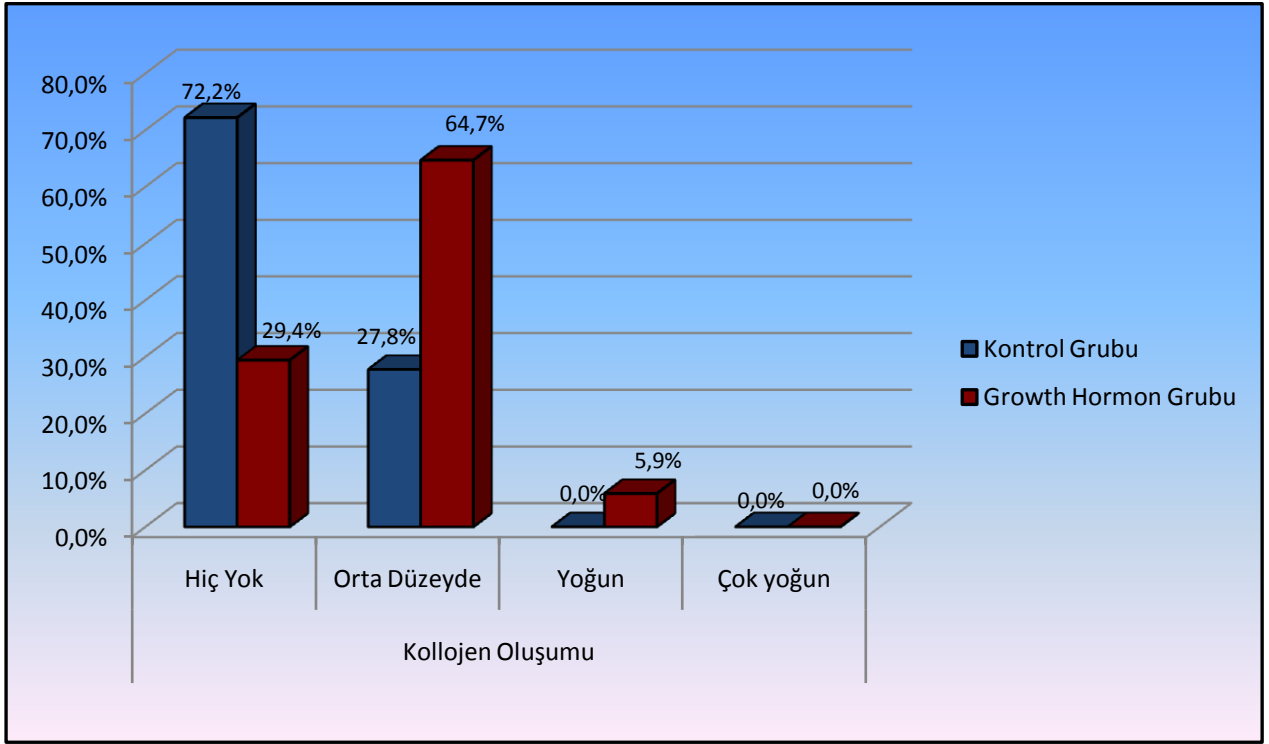
Kollojen oluşumu: Histopatolojik incelemelerde fistül iyileşmesinde kontrol grubu ve GH verilen çalışma grubu arasında kollojen oluşumu açısından fark olup olmadığına bakıldı. 4 grup olarak değerlendirildi. 1. grup kollojen oluşumu çok az; 2. grup orta derecede; 3. grup yoğun; 4. grup ise çok yoğun kollojen oluşumu şeklinde değerlendirildi. Analizler kollojen oluşumu çok az bir grup, kollojen oluşumu orta, yoğun ve çok yoğun bir grup olarak değerlendirilip yapıldı. 1. gruptaki 18 denekten 13 tanesinde kollojen oluşumu çok az izlenirken, GH verilen 16 denekten 11 tanesinde orta derece kollojen oluşumu izlendi (resim 6). GH verilen grupta kollojen oluşumu kontrol grubundan anlamlı ($p=0,011 < 0,05$) olarak daha yüksek çıktı (Tablo 3, grafik 3) .

Tablo 3

		Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p
		n	%	n	%	
Kollojen Oluşumu	Hiç Yok	13	72,2%	5	29,4%	0,011
	Orta Düzeyde	5	27,8%	11	64,7%	
	Yoğun	0	0,0%	1	5,9%	
	Çok yoğun	0	0,0%	0	0,0%	

Ki-kare test

Grafik 3



Resim 6; GH alan grupta, okla gösterilmiş alanda fibroblastlar belirgin olarak azalmış ve kollajen doku birikimi mevcut

Akut ve kronik iltihabi hücre: Mikroskopik incelemelerde fistül iyileşmesinde kontrol grubu ve GH verilen çalışma grubu arasında akut iltihabi hücre ve kronik iltihabi hücre yoğunluğu açısından fark olup olmadığına bakıldı. 4 grup olarak değerlendirildi. 1. grupta kronik veya aktif iltihabi hücre yoğunluğu çok az; 2. grupta orta derecede; 3. grupta yoğun; 4. grupta ise çok yoğun şeklinde değerlendirildi. Analizler 1. ve 2. grup bir grup, 3. ve 4. grup bir grup olarak değerlendirilip yapıldı.

Kontrol grubu ve GH verilen grupta aktif iltihabi hücre oranları ($p = 0,380 > 0,05$; tablo 4, grafik 4) ve kronik iltihabi hücre oranları ($p = 0,121 > 0,05$; tablo 5, grafik 5) anlamlı farklılık göstermemiştir. İki grupta da ortalama orta düzeyde akut iltihabi hücre izlenirken, kronik iltihabi hücre iki grupta da yoğun olarak izlenmiştir.

Tablo 4

		Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p
		n	%	n	%	
Akut İltihabi Hücre	Hiç Yok	0	0,0%	3	17,6%	0,380
	Orta Düzeyde	9	50,0%	8	47,1%	
	Yoğun	3	16,7%	2	11,8%	
	Çok yoğun	6	33,3%	4	23,5%	

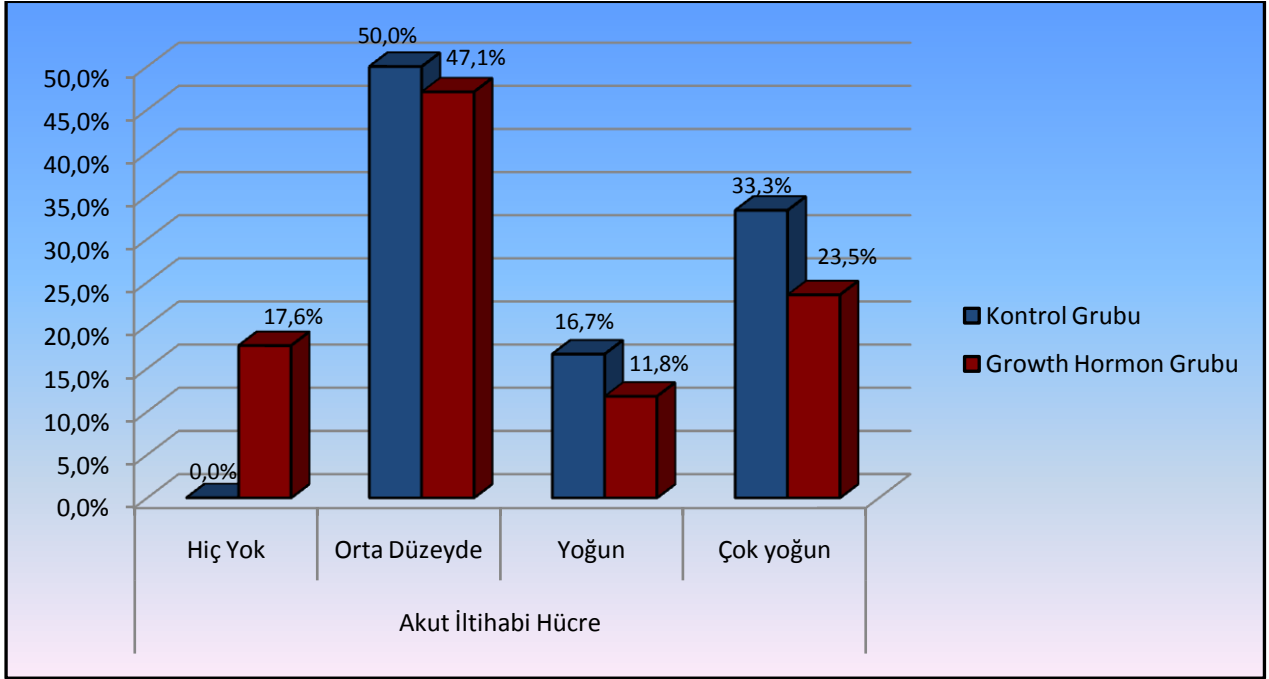
Ki-kare test

Tablo 5

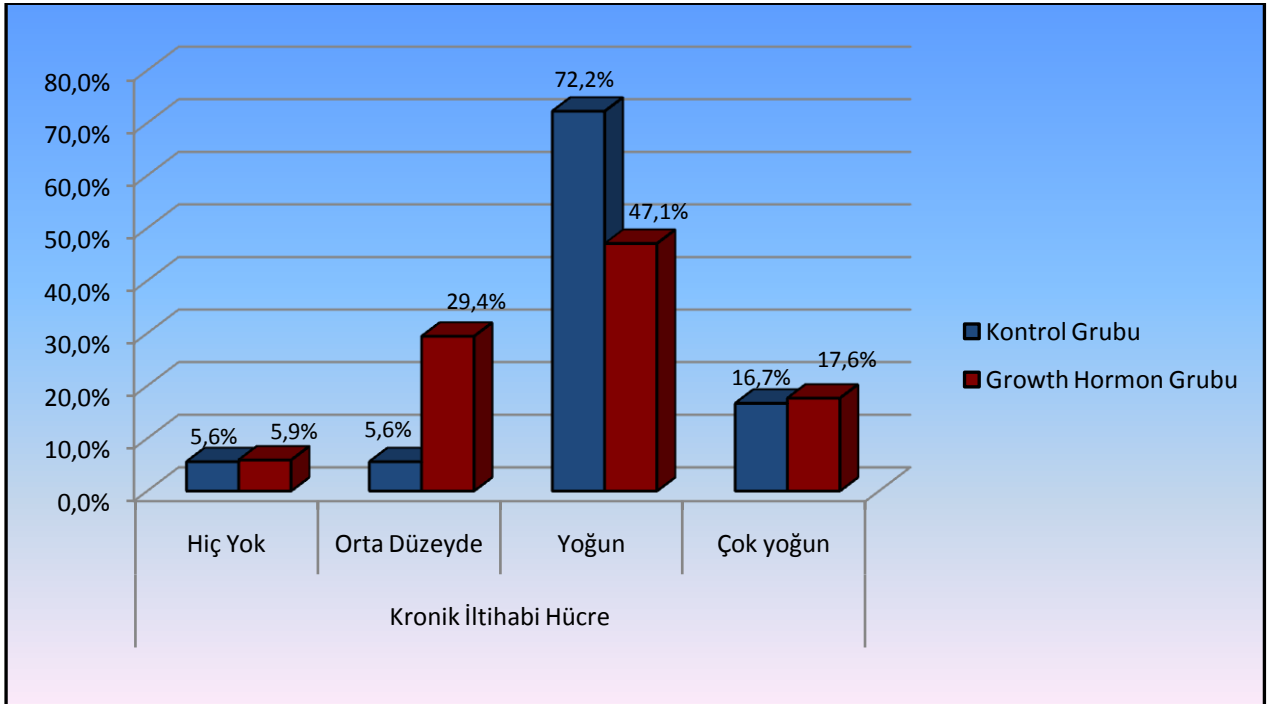
		Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p
		n	%	n	%	
Kronik İltihabi Hücre	Hiç Yok	1	5,6%	1	5,9%	0,121
	Orta Düzeyde	1	5,6%	5	29,4%	
	Yoğun	13	72,2%	8	47,1%	
	Çok yoğun	3	16,7%	3	17,6%	

Ki-kare test (Fischer test)

Grafik 4



Grafik 5



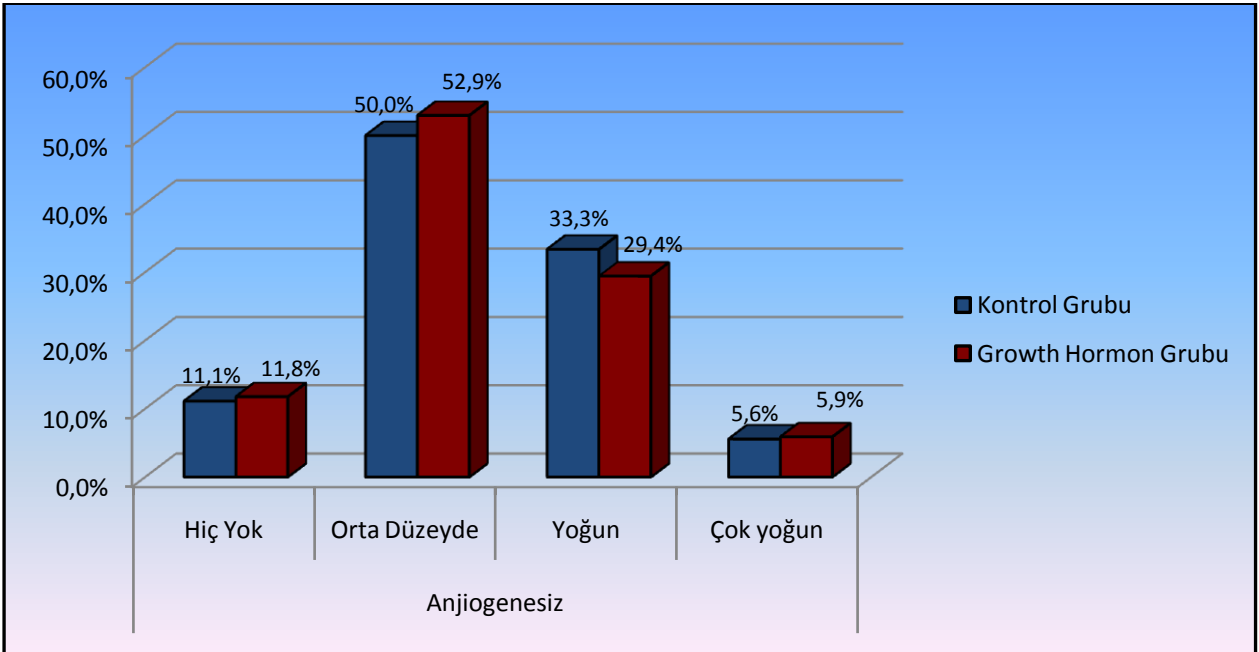
Anjiogenesisiz: Histopatolojik incelemede kontrol grubu ve GH verilen grup arasında yara iyileşmesinde anjiogenesisiz oluşumuna bakıldı. 1.grup çok az; 2 grup orta; 3 grup yoğun; 4. grup ise çok yoğun anjiogenesisiz oluşumu şeklinde değerlendirildi. 1. ve 2. grup bir grup, 3. ve 4. grup 2. grup olarak sınıflandırılıp analiz 2 grup arasında ki kare testi ile yapıldı. Hem kontrol grubunda hemde GH verilen grupta orta düzeyde anjiogenesisiz izlenip ki kare testinde kontrol grubu ve GH verilen grupta anjiogenesisiz oranları arasında anlamlı ($p = 0,826 > 0,05$) farklılık gözlenmedi (Tablo 6, grafik 6).

Tablo 6

	Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p	
	n	%	n	%		
	Anjiogenesisiz					
	Hiç Yok	2	11,1%	2	11,8%	
	Orta Düzeyde	9	50,0%	9	52,9%	
	Yoğun	6	33,3%	5	29,4%	
	Çok yoğun	1	5,6%	1	5,9%	

Ki-kare test

Grafik 6



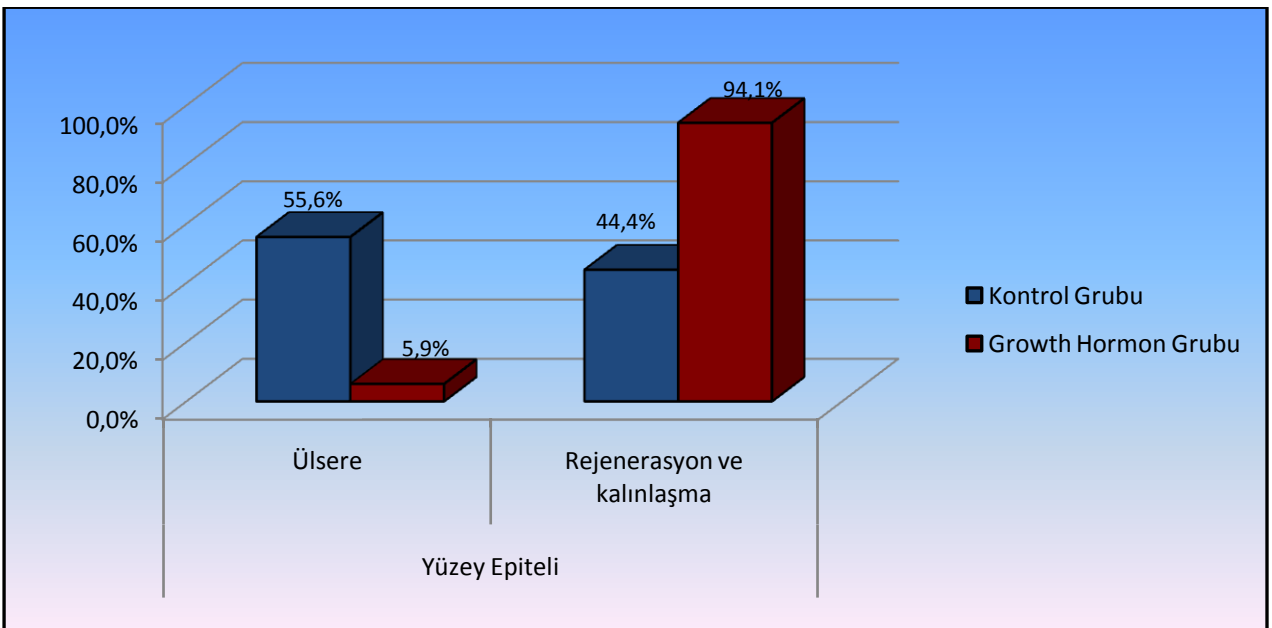
Yüzey epiteli: Makroskopik olarak yüzey epiteli değerlendirilen kontrol grubu ve GH verilen gruplarda yüzey epiteli ülserasyon ve rejenerasyon açısından histopatolojik olarak değerlendirilip analiz edildi. 1.grup ülserasyon; 2. grup ise rejenerasyon ve mukozal kalınlaşma izlenen grup olarak değerlendirilip iki grup arasında ki kare testi yapıldı. Growth hormon verilen grupta yüzeyel epitelde rejenerasyon ve kalınlaşma oranı kontrol grubundan anlamlı ($p=0,002 < 0,05$) olarak daha yüksek izlendi (Tablo 7, grafik 7, resim 7) .

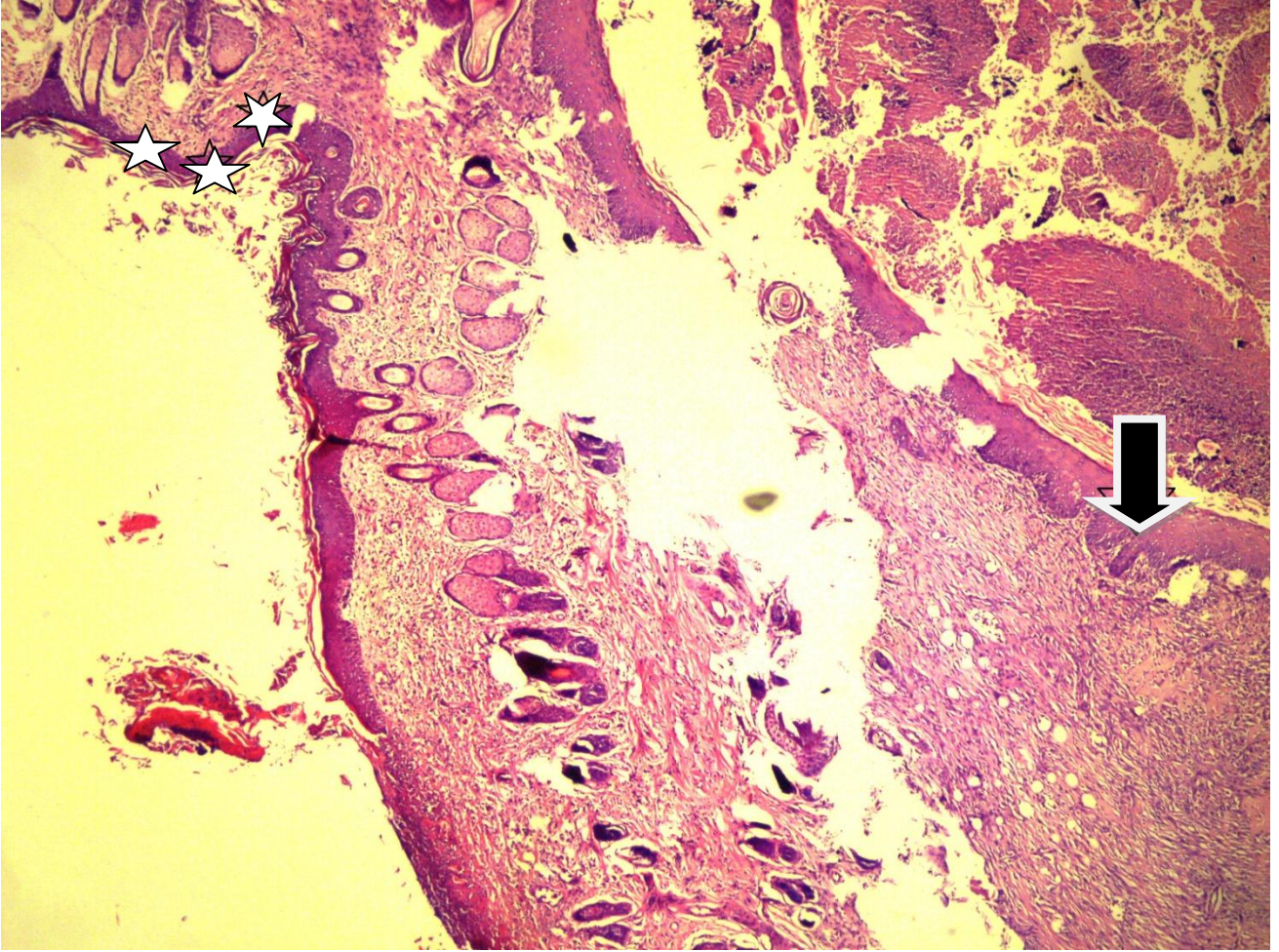
Tablo 7

		Kontrol Grubu		Growth Hormon Grubu		p
		n	%	n	%	
Yüzey Epiteli	Ülsere	10	55,6%	1	5,9%	0,002
	Rejenerasyon ve kalınlaşma	8	44,4%	16	94,1%	

Ki-kare test

Grafik 7





Resim 7; GH verilen grupta yıldızla gösterilmiş normal ince epitel ve okla gösterilmiş rejeneratif özellikte tomurcuklanma göstermiş

7. TARTIŞMA

Son yıllarda larenks ve hipofarinks skuamoz hücreli kanserlerinde organ koruyucu tedaviye yönelik uygulamaların gelişmesiyle birlikte kemoradyoterapi daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Bundan dolayı, kemoradyoterapi alan hastalarda nüks sonrası kurtarma cerrahisinin artmasıyla birlikte larenjektomi komplikasyonlarında, özellikle yara iyileşmesi ve sonrasında gelişen FKF

oranlarında artış gözlenmektedir.³⁹ Yara iyileşmesi ve FKF oluşumunda rol alan birçok faktör bulunmaktadır; Kemoradyoterapi, diyabet, anemi, postoperatif hipovolemi, kötü yara bakımı ve positif cerrahi sınırlar, preoperatif trakeotomi, boyun diseksiyonu olduğu bildirilmiştir.³⁹ Ayrıca Jeannon ve ark. yaptığı bir çalışmada total larenjektomi sonrası oluşan FKF oluşumu ile hastanede kazanılan metisilin resistant stafilokok aerous infeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.⁴⁰ Total larenjektomi sonrası FKF oluşumunu engellemek için birçok yazar oral beslenmeye 7 ile 10. gün arasında başlamayı tercih etmektedir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda ve 2007'de yapılan National Otolaryngology sempozyomunda 2 veya 3. gün oral beslenmeye başlanması ile 7. gün oral beslenmeye başlanması arasında FKF oluşumu açısından hiçbir fark olmadığı gösterilmiştir.⁴¹ Literatürde faringokutanoz fistülle ilgili yapılan çalışmalar öncelikle risk faktörleri ve önlemleriyle ilgili olup, tedaviyle ilgili ise ön planda free flep veya pektoralis major ve deltopektoral flep gibi kaslı cilt flepleri ile fistülün kapatılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.^{42,43,44,45} FKF tedavisinde kabul edilmiş kesin bir strateji olmamasına rağmen, genellikle intravenöz antibiyotik kullanımı ile birlikte oral alımın kesilmesi ve yara bakımı başlıca yapılan uygulamalardır. Bazı yazarlar salivary by pass tüp kullanılmasını önerirken, botolium toksin enjeksiyon yaparak tükürük salgısını azaltmaya yönelik çalışmalarda bulunmaktadır.^{46,47} Bütün bu önlemlere rağmen, % 30 hastada FKF kapanmamakta ve cerrahi müdahale gerekmektedir.^{48,49}

Bir çok klinikte metilen mavisi içirilerek ve videofloroskopik görüntüleme yapılarak faringokutanoz fistül varlığını gösterilirken, Galli ve ark. yaptıkları bir çalışmada oral-faringokutanoz sintigrafinin de FKF görüntülemesinde objektif ve non-invasiv bir yöntem olarak efektif bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.⁵⁰

FKF'ün kapatılmasına yönelik yapılan sınırlı çalışmalardan bir tanesinde, Wiseman ve ark. FKF'ü olan bir hastada mukozayı primer kapatıp üzerine fibrin glue sıkırmış ve hastanın takiplerinde FKF 'ün kapanmış olduğu izlenmiştir.⁴⁸ Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalardan farklı olarak, FKF kapanmasında risk faktörü ve flep ile rekonstruksiyon yerine, FKF'ün primer kapanması ve

yara iyileşmesinde, kollojen yapımını ve granülasyon dokusunu arttırarak etki eden rHGH'un etkisi araştırıldı.

rHGH direkt veya başka hormonlar aracılığı ile büyüme ve metabolizma üzerine etki eder. GH karaciğerde IGF- 1 sentezini stimüle eder. IGF-1 kondrosit ve osteoblast proliferasyonunu arttırır. GH ayrıca kas ve diğer dokularda amino asit alınımını ve protein sentezini arttırarak yara iyileşmesinde etkilidir. rHGH hücrelerin glikoz kullanımını azaltıp hücrelerde protein ve glikoz depolarını korur, aynı zamanda karaciğerde glikoz yapımını da arttırır. Travma, stres, cerrahi gibi durumlarda akut faz reaktanlarını da azaltarak protein yıkımını azaltır. Yapılan birçok çalışmada, rHGH'un pratikte rutin olarak GH eksikliği olan özellikle çocuklarda kullanılırken, son zamanlarda kırık iyileşmesinden yanık ve yara iyileşmesine kadar birçok çalışmada rHGH denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Osteoporoz tedavisinde kemik ve kırık rejenerasyonunda, yanık tedavisinde, sinir rejenerasyonunda GH'un kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır.^{27,46,54,55,56,57,58,59} GH'la ilgili birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda GH'un yara iyileşmesinde olumlu sonuçlar vermiş olduğu görülmüşse de, literatürde larenjektomiler sonrası oluşabilen FKF kapanmasında GH'un kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma hem FKF tedavisinde, hem de genel olarak kulak burun boğaz ve baş boyun cerrahisinde rHGH 'un kullanıldığı ilk çalışmadır.

Bu çalışmaya en yakın yapılan çalışmada, Guo Sheng Gu, enterokutanöz fistülü olan 8 hastaya 7 gün subkutan rHGH enjekte etmiştir. 7 gün sonrasında hastalardan alınan endoskopik biyopsilerin immunohistokimyasal incelemeleri sonucunda, GH'un intestinal mukozada epitelyum proliferasyonunu ve protein sentezini, kollojen oluşumunu arttırdığını göstermiştir.⁵¹ Bu çalışmada, hastaların bağırsak mukozalarında villus boylarında tedaviden öncekine göre belirgin uzama gözlenmiştir. Villuslardaki uzama, epitelyum hücrelerindeki proliferasyon artışına bakılıp değerlendirilmiştir. Ayrıca, enterokutanöz fistülü olan hastalarda 7 günlük GH tedavisi sonunda serum proteinlerinde, albumin, fibronektin, prealbumin, transferin seviyelerinde anlamlı olarak artış gözlenmiştir. Bunlar (-) akut faz reaktanlardır. Stres anında serumdaki albumin, prealbumin gibi

esansiyel proteinler kullanılıp miktarları azalırken, diğer akut faz reaktanlarında artma görülmektedir. GH, stres durumunda AFR oluşumunu azaltarak serum albumin, prealbumin seviyelerinin normale yakın tutulmasını sağlar. Bizim çalışmamızda da bu çalışmanın histopatolojik bulgularına benzer istatistikler elde edilmiştir. Çalışmamızda, histopatolojik incelemede, FKF iyileşmesinde GH verilen grupta kollojen oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde ($p=0,011 < 0,05$) daha yüksek olduğu gösterildi. Kontrol grubunun %72.2'sinde (18 sıçandan 13 tanesinde) çok az kollojen oluşumu izlenirken, GH verilen grupta 17 sıçandan 11'inde (%67.2) orta derecede kollojen oluşumu izlendi. Kollojen oluşumu yara iyileşmesinde beklenen bir sonuç olup, kontrol grubunda FKF iyileşmesinin iyi olmadığını göstermektedir.

Çalışmada FKF kapanmasının makroskopik değerlendirmesinde sıçanlar sakrefiye edildikten sonra boyunda tükrük ve yemek artığı birikimi var mı, yara yerinde açıklık olup olmadığı değerlendirilip skorlandı. GH verilen grupta 17 sıçandan sadece 1 tanesinde boyunda apse ile karşılaşıldı, 16 tanesinde boyun bölgesi tamamen kapanmış izlendi. Kontrol grubunda ise 18 sıçandan 8 tanesinde boyunda ülserasyon ve apse oluşumu izlenirken 10 sıçanda boyundaki insizyon yeri kapanmış izlendi. İstatistiksel analiz sonucu, GH verilen grupta FKF kapanmasının kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p = 0.002 < 0.05$) daha iyi olduğu gösterildi.

Sheng ve ark. yaptığı çalışmada⁵¹ olduğu gibi fistül yerinde mukozal kalınlaşmaya ve epitelizasyona bakıldı. GH verilen grupta anlamlı olarak kontrol grubundan daha fazla epitelizasyon izlenirken, kontrol grubunda ön planda ülserasyon (%55.6- 18 sıçandan 10 tanesinde) dikkati çekmektedir. FKF kapanmasında GH'un literatürdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi rejenerasyon ve epitelizasyonu arttırdığı gösterildi.^{53,54,55,56,58}

Yara iyileşmesinde 4. günden sonra hücre proliferasyonu ile beraber granülasyon fazı başlar. Ortamda aktif iltihabi hücreler azalırken, kronik iltihabi hücre sayısı artar.²² Granülasyonun başlamasıyla birlikte ortamda fibroblast yoğunluğu ve fibronektin miktarında artış olurken endotel

hücrelerde ve anjiogenezisde de artma olur.^{22,59} Çalışmamızda, 14 gün sonunda beklendiği gibi akut iltihabi hücre sayısı azalırken, kronik iltihabi hücre sayısında artma gözlemlendi. Fibroblast yoğunluğunda granülasyon dokusu oluşumuna bağlı olarak artmış izlendi. Fakat, akut iltihabi hücre ($p = 0,380 > 0,05$), kronik iltihabi hücre ($p = 0,121 > 0,05$) ve fibroblast yoğunluğu ($p = 0,691 > 0,05$) açısından GH verilen çalışma grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gösterilemedi. Kollojen oluşumuyla birlikte fibroblast ve fibronektin yoğunluğunda da artış beklenmektedir.^{22,59} Çalışmada GH verilen grupta kollojen oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gözlenmesine rağmen, iki grup arasında fibroblast yoğunluğu açısından fark gösterilemedi. GH'un yara iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda kollojen oluşumuyla birlikte GH verilen grupta fibroblast yoğunluğunda da artma gösterilmiştir.⁵⁹ Bu çalışmada, iki grupta yoğun fibroblast oluşumuna rağmen, kontrol grubunda kollojen oluşumunun belirgin az olduğu izlendi. Bu GH'un fibroblast oluşumundan sonra farklı bir şekilde etki gösterip kollojen oluşumunu ve hücre proliferasyonunu arttırabileceğini düşündürmektedir. Ya da, GH'un ortamda bulunan tükrüğün fibroblast üzerine olumsuz etkisini inhibe ederek kollojen oluşumunu arttırıyor olabileceğini göstermektedir. Bunun açıklanabilmesi için tükrük analizinin ve fibroblast üzerine etkisinin araştırıldığı, bu aşamadan sonrada GH 'un tükrük ve fibroblast üzerine etkilerinin araştırıldığı farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, literatürdeki GH'la ilgili yapılan çalışmalardan farklı olarak oluşan granülasyon dokusunda ve fistül alanında anjiogenezise bakıldı. Her ne kadar literatürde yara iyileşmesi, yanık tedavisi, kırık tedavisinde GH 'un kullanıldığı birçok çalışma yapılmış olsa da, FKF'le ilgili yapılan çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmalarda genel olarak kollojen oluşumu, fibroblast yoğunluğu, akut faz reaktanları albumin, fibronektin değerleri, hücre proliferasyonları, serum GH ve serum IGF-1 değerleri bakılmıştır; GH'un anjiogenezis üzerine etkisi araştırılmamıştır.

^{27,46,54,55,56,57,58,59} Çalışmamızda, FKF kapanmasında ve granülasyon dokusu oluşumunda, GH verilen grupla kontrol grubu arasında anjiogenezis açısından fark olup olmadığına bakıldı. Yapılan analizler

sonucu iki grup arasında anjiogenezis açısından anlamlı fark ($p = 0,826 > 0,05$) gösterilemedi. Normalde granülasyon dokusu oluşumunda kollojen artışı ile birlikte anjiogenezisde artış beklenen bir sonuç olmasına rağmen çalışmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilemedi. GH'un yara iyileşmesinde anjiogenezis üzerinde etkisi olup olmadığını söyleyebilmek daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada rHGH'un FKF kapanmasında olumlu etkileri olduğu gösterilmesine rağmen, düşünülmesi gereken bir diğer konu geride tümör dokusu kalmışsa GH'un kalan tümör dokusu üzerine etkisidir. GH normal dokuda hücreye amino asit alımını ve protein sentezini artırır. Ayrıca mitogenezi ve hücre proliferasyonunu artırma özelliği de vardır. GH'un metabolizma üzerine bu etkileri göz önüne alındığında, geride tümör dokusu kalmış ise GH'un tümör dokusunda mitogenezi ve hücre proliferasyonunu arttırarak tümör büyümesine neden olabileceği akla gelmektedir. Bunun için GH'un tümör dokusu üzerinde etkilerinin araştırıldığı farklı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, seçilen Sprague Dawley sıçan grubu FKF oluşturmak için ideal bir grup değildi. Sprague sıçanların özefagusları çok dar ve duvarları çok ince olduğu için cerrahi sırasında zorluk yaşandı. Mümkün olduğunca ince, özefagusu tam obstrükte etmeden insizyon yeri dikildi. Sonraki takibinde sıçanların beslenmesi ve yaşatılmasında sıkıntı oldu. Takiplerinde, ilk 2-3 gün içinde sıçanların kilo kaybettiği, genel durumlarının bozulduğu izlendi. Sabah akşam subkutan %5'lik dekstroz enjeksiyonu yapılarak sıçanların yaşatılması sağlandı. FKF modeli oluşturmak için tavşan gibi daha büyük bir hayvan kullanılması hem cerrahi açıdan, hem de sonrasında deneklerin beslenmesi, oral alımı açısından daha uygun olabilirdi. Çalışmanın sonunda sıçanların özefagusu incelendiğinde bazılarında özofagusun tamamen yırtıldığı, altta devamlılığının bozulduğu, sıçanların oral aldığı katı gıda parçalarının özofagusta birikip burayı tıkadığı izlendi. Bu yüzden faringoözafagotomi yapılan sıçanların katı gıda yerine sıvı gıdalarla beslenmesi daha uygun olabilirdi. Literatürde FKF'le ilgili yapılan çok fazla hayvan çalışması olmamasına rağmen bir çalışmada Shih An Liu , farengoözafagotomi yaptığı 1. grup farelerde sütür materyali olarak vikril,

2. grupta prolen, 3. grupta ise sütür materyali olarak vikril kullanıp bu gruba eş zamanlı fibrin glu enjekte etmiştir. 7 gün sonra yapılan incelemede prolen ile kapatılan faringoözafagotomi sonrası vikril ile kapatmaya oranla daha az fistül oluştuğu gösterilmiştir.⁵² Bu çalışmada sprague sıçanlar kullanılmış ve fistül oluşturulmuştur. Çalışmada cerrahi teknik bizim yaptığımız teknik ile aynıdır, ama sonrasında sıçanların nasıl beslendiği açıklanmamıştır. Çalışmamızda, hem cerrahi teknik, hem de postoperatif takiplerinde sıçanların beslenmeleri ile ilgili bilgi verilmiştir. Bu çalışma bundan sonraki hayvan FKF çalışmaları için yol gösterici bir model özelliği taşımaktadır.

8. SONUÇ

Çalışmamızda sıçan FKF modelinde, makroskopik değerlendirmelerde FKF kapanmasının rHGH verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha iyi olduğu gösterildi. rHGH verilen grupta kollojen oluşumunun ve epitelizasyonun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu da gösterildi. Kollojen oluşumuyla ilgili elde ettiğimiz istatistiksel sonuçlar, literatürde GH'un yara iyileşmesine etkisiyle benzer sonuçlar verip kollojen oluşumunun arttığı izlendi. Diğer yapılan çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada GH verilen gruba kontrol grubu arasında yara iyileşmesi ve granülasyon dokusu oluşumunda temel olan fibroblast yoğunluğu açısından fark gösterilemedi. FKF olan kişilerde, fistül olan bölgede tükrük olması ve oral mikroorganizmaların doğrudan yara yerine gelmesi nedeni ile yara iyileşmesi cilt veya kemik gibi diğer bölgelere göre biraz daha zor ve uzun sürebilmektedir. GH'un FKF kapanmasında etkili olup olmadığının anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Son zamanlarda GH ve büyüme faktörleriyle ilgili yara iyileşmesi, sinir rejenerasyonu ve farklı alanlarda yapılan çalışmalar, FKF kapanmasında da GH ve diğer büyüme faktörlerinin etkili olabileceği yönünde ümit vericidir. Bununla birlikte, GH ve büyüme faktörlerinin normal dokuda olduğu gibi geride kalan tümör dokusu üzerinde de mitogenez ve hücre büyümesini arttıran etkisi olabileceği unutulmamalıdır.

9. KAYNAKLAR

1. Aslam M. J., Ahmed Z., Aslam M.A. ; Complications of total laryngectomy; Pakistan Journal of medical science; March 2006, Volume 22; 876-890
2. Gollo A, Moi R, Simonelli M, Vitolo D, Fiorella ML, Marvaso V. Salvage resection after previous laryngeal surgery: Total laryngectomy with en bloc resection of the overlying cervical skin. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 127:786-9.
3. Ganly I., et al; Postoperative Complications of Salvage Total Laryngectomy; 2005 American Cancer Society, May , 2005 , Volume 103 , Number 10; 273-281
4. Wengen DF, Donald PJ. Complications of radical neck dissection. In: Shockley WW, Pillsbury HC eds. The Neck: Diagnosis and Surgery. Missouri: Mosby, 1994:483-509.
5. Cavalot AL, Gervasio CF, Nazionale G, Albera R, Bussi M, Staffieri A, et al. Pharyngocutaneous fistula as a complication of total laryngectomy: Review of the literature and analysis of case records. Otolaryngol Head Neck Surg 2000; 123:587-92.
6. Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, Hirvikoski PP, Johansson RT, Kosma VM. The incidence and etiology of post laryngectomy pharyngocutaneous fistulae. Head and Neck Surg 2001; 23(1): 29-33.
7. Volling P, Singlemann H, Ebeling O. Incidence of salivary fistulae in relation to timing of oral nutrition after laryngectomy. Head & Neck Oncology 2001; 49(4): 276-82.
8. Palomar-Asenjo V, and et al; Pharyngocutaneous Fistula Following Total Laryngectomy. A Case-Control Study of Risk Factors Implicated in its Onset; Acta Otorrinolaringol Esp. 2008;59(10):480-4
9. Aprigliano F, Pires de Mello LF; Surgical Treatment of Laryngeal Cancer. Analysis of 1055 Cases; International Archives of Otolaryngology; 2006, Vol. 10 , Num. 1;283-302
10. . Chee N, Siow JK. Pharyngocutaneous fistula after laryngectomy: Incidence, predisposing factors and outcome. Singapore Med J 1999; 40(3): 130-2.

11. Grau C, Johansen LV, Hansen HS, Andersen E, Godballe C, Andersen LJ, et al. Salvage laryngectomy and pharyngocutaneous fistulae after primary radiotherapy for head and neck cancer: a national survey from DAHANCA. *Head Neck*. 2003;25:711-6.
12. Sasaki CT, Carlson RD: Malignant Neoplasms of the Larynx. Cummings CW, et al(Eds): *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. Mosby Year Book, St. Louis, Vol 2,Chapter 104, pp: 1925-1954; 1993
13. Thawley SE: Cysts and Tumors of the Larynx. Paperella MM, et al (Eds): *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Vol 2, Chapter 32, pp: 2307-2370; 1991
14. Lawson W, Billier HF: Cancer of the Larynx, Myers EN, et al (Eds): *Cancer of the Head and Neck*. Churchill Livingstone New York, Chapter 22, pp: 533-591; 1989
15. Kaiser TN, Spector GJ: Tumors of the Larynx and Laryngopharynx. Ballenger JJ, et al (Eds): *Disease of the Nose, Throat, Ear, Head and Neck* Lea and Febiger, Philadelphia, Chapter 37, pp: 682-746; 1991
16. Sasaki CT, Driscoll BP, Gracco C. Larinks anatomi ve fizyolojisi (çeviri: Öktem F).In: Ballenger JJ, Snow JB, editors, *Otolarengoloji-Baş ve Boyun Cerrahisi* (çeviri editörleri: Şenocak D, Kaleli Ç). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2000; 422-436
17. Hızalan İ. Anatomik özellikler ve klinik gidiş. Bölüm 17; Larenks kanserleri (bölüm editörü: Coşkun H.) In: *Baş Boyun Kanserleri* (editörler: Engin K, Erişen L), Nobel tıp kitabevi 2003; 345-352
18. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology And Genetics of Head and Neck Tumors* International Agency for Research on Cancer press Lyon; p: 108-162; 2005
19. Kaya S. Larenks Kanseri; Bölüm:17. In: *Larenks hastalıkları*. Bilimsel tıp yayımevi, Ankara, 2002; 539-558

20. Nunez DA, Astley SM, Lewis FA, Wells M. Human papilloma viruses: A study of their prevalence in the normal larynx. *J Laryngol Otol.* 1994; 108(4); p: 319-320
21. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjanen S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol.*; 114(3); p: 348-351; 1994
22. Arthur C. Guyton; *Medical Physiology*; 10. Edition; p 849-854
23. Capan MY, Yuksek MS, Akcay MN, et al. Metabolic and endocrine changes after open and laparoscopic cholecystectomies. *New J. Med.* 1997; 1: 15-17.
24. Wilmore DW. Postoperative protein sparing. *World J Surg* 1999; 23: 545-552.
25. Gilpin DA., Hsieh CC, Kuninger DT, Herndon DN. Regulation of the acute phase response genes α_1 - acid glycoprotein and α_1 - antitrypsin correlates with sensitivity to thermal injury. *Surgery* 1996; 119; 664-673
26. Jarror D, Wolf SE, Jeschke M, Papaconstantinou J. Growth hormone attenuates the acute phase response to thermal injury. *Arch Surg* . 1997 Nov;132(11):1171-5
27. R.J. Ramirez, S. E. Wolf, D. N. Horndon; Is there a role for growth hormone in the clinical management of burn injuries? ; *Growth hormone & IGF research*; 1998, 99-105
28. William G Cioffi, MD, FACS; What's New in Burns and Metabolism; *J Am Coll Surg.* 2001 Feb;192(2):241-54.
29. Vance ML, Mauras N. Growth hormone therapy in adults and children. *N Engl J Med* 1999; 341: 1206-1216.
30. Christensen H, Oxlund H. Growth hormone increases the collagen deposition rate and breaking strength of left colonic anastomoses in rats. *Surgery* 1994; 116: 550–556.
31. Delany HM, Demetriou AA, Teh E, Levenson SM. Effect of early postoperative nutritional support on skin wound and colon anastomosis healing. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990 ; 14: 357-361.

32. Harrison LE, Port JL, Hochwald S, Blumberg D, Burt M. Perioperative growth hormone improves wound healing and immunologic function in rats receiving adriamycin. *J Surg Res* 1995; 58: 646-650.
33. Christensen H, Oxlund H, Laurberg S. Growth hormone increases the bursting strength of colonic anastomoses. An experimental study in the rat. *Int J Colorectal Dis.* 1990; 5: 130-134
34. Atkinson JB, Kosi M, Srikanth MS, Takano K, Costin G. Growth hormone reverses impaired wound healing in protein-malnourished rats treated with corticosteroids. *J Pediatr Surg.* 1992; 27: 1026-1028.
35. Shaw NJ, Fraser NC, Rose S, Crabtree NJ, Boivin CM. Bone density and body composition in children with growth hormone insensitivity syndrome receiving recombinant IGF-1. *Clin Endocrinol* 2003; 59: 487-491.
36. Jeschke MG, Barrow RE, Herndon DN. Recombinant human growth hormone treatment in pediatric burn patients and its role during the hepatic acute phase response. *Crit Care Med* 2000; 28: 1578-1584.
37. Kaya E. Yara iyileşmesi. *Travma.* 1. Baskı İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık Ltd. Şti., 2005: 488-501.
38. Engin A. Yara iyileşmesi. *Temel Cerrahi.* 3.baskı Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 494-508.
39. Bohannon I. A., Jarroll R.V.; Closure of post-laryngectomy pharyngocutaneous fistulae; *Head Neck Oncol.* 2011; 3: 29
40. Jeannon J.P., Orabi A., et al; Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Infection as a causative agent of fistula formation following total laryngectomy for advanced head & neck cancer; *Head Neck Oncol.* 2010; 2: 14.
41. J. O'Hara a,* , C. Lock b, V. Paleri a, R. Wight ; Oral feeding regimes following laryngectomy – A qualitative study of consultants' opinions in the North of England ; *Oral Oncology* 45 (2009) 727–730

42. Küçük B., Yorulmaz İ; Farengo-Kutanöz fistüle bağlı geniş cilt ve mukoza defektlerinin pektpralis major kas –deri flebi ve deltopektoral flep ile onarımı; KBB ve Baş Boyun Cer. Derg.; 2000,8(2); 108-114
43. Mathes JS, Nahai F: Pectoralis major flap. Mathes JS, NAHAI F (Eds): Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique. Churchill Livingstone. New York 1997. Vol 1, 441-465.
44. Mathes JS, Nahai F: Deltopectoral flap. Mathes JS, Nahai F (Eds): Reconstructive Surgery: Principles, Anatom and Technique. Churchill Living- Stone. New York 1997. Vol 1, 411-424.
45. Özlüoğlu LN, Akçayöz N, Saydam L, Gökler A, Velidedeoğlu HV: Baş boyun kanser cerrahisinde fasiokutan servikohumeral omuz flebi kullanımı. KBB Bülteni 3, 1994: 76-80.
46. Y.GU, Z. H.WU, J.X.XIE,* D.Y. JIN, H. C. ZHUO; Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats; Clin Nutr. 2001 Apr;20(2):159-66
47. Guntinas-Lichius O, Eckel HE. Temporary reduction of salivation in laryngectomy patients with pharyngocutaneous fistulas by botulinum toxin A injection. Laryngoscope. 2002;112:187-9.
48. Redaelli de Zinis LO, Ferrari L, Tomenzoli D, et al: Postlaryngectomy pharyngocutaneous fistula: Incidence, predisposing factors, and therapy. Head Neck 21:131-138, 1999
49. Wiseman S., MD, Hicks W, Jr, DDS, MD, at al; Fibrin Glue–Reinforce Closure of Postlaryngectomy Pharyngocutaneous Fistula; Am J Otolaryng. 2002;23:368-373.
50. J. Galli, V. Valenza, C. Parilla, at al; Pharyngocutaneous fistula onset after total laryngectomy: scintigraphic analysis; Acta Otorhinolaryngol Ital. 2009 October; 29(5): 242–244.

51. Gu SG, Ren J, Li N, and Li JS; Effects of recombinant human growth hormone on enterocutaneous fistula patients; *World J Gastroenterol.* 2008 November 28; 14(44): 6858–6862.
52. Liu SA , Tung KC·, Cheng CC· Chiu YT; The impact of diVerent closure materials on pharyngeal wound healing: an experimental animal study; *Eur Arch Otorhinolaryngol* ,2008; 265:227–231
53. Jeschke M. G., M.D., Herndon David N.; The Effect of Growth Hormone on Gut Mucosal Homeostasis and Cellular Mediators after Severe Trauma1; *Journal of Surgical Research* 127, 183–189 ;2005
54. V. Dunaiski1 and D.A. Belford; Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats; *Growth Horm IGF Res.* 2002, 12, 381–387
55. Lee, SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y; The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration; *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* ,2010, 63; 364- 369
56. Jeschke MG, M.D., Herndon DN; The Effect of Growth Hormone on Gut Mucosal Homeostasis and Cellular Mediators after Severe Trauma1; *Journal of Surgical Research* 127, 183–189 (2005)
57. Cioffi WG; What’s New in Burns and Metabolism; *J Am Coll Surg.* 2001 Feb;192(2):241-54.
58. V. Dunaiski1 and D.A. Belford; Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats; ; *Growth Horm IGF Res.* 2002, 12, 381–387
59. Lee SY, Kim SH, Kim JY, Lee Y; The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration; *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2010, 63, 364-369

60. Veldhuis JD, Anderson SM, Shah N, et al; Neurophysiological regulation and target tissue impact of pulsatile mode of growth hormone secretion in the human; *Growth Horm IGF Res.* 2001; 25-37
61. Lisset CA, Shalet SM; Effects of growth hormone on bone and muscle; *Growth Horm IGF Res.* 2000 Apr;10 Suppl B:S95-101