

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
K.B.B. SERVİS ŐEFLİĐİ

**SUBGLOTTİK TRAVMA SONRASI UYGULANAN SİSTEMİK VE
TOPİKAL HALOFUGİNONUN FİBROZİS GELİŞİMİNİ ÖNLEMEDEKİ
ETKİSİ**

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ

EYLEM ERTUĞ ERTUĞRUL

HV.TBP.KD.ÜTĐM.

İSTANBUL – 2006

ÖNSÖZ

Bu tez konusu, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi K.lığının 01.12.2005 tarih ve KBB Srv: 0530-80-05/421 sayılı yazılı emriyle verilmiştir.

Subglottik stenoza Kulak Burun Boğaz hekimlerinin meslek yaşantıları boyunca karşılaşılabilecekleri, çözümü en güç hastalık gruplarından birisidir. Tedavisinde cerrahi ya da tıbbi bir çok yöntem denenmesine rağmen çözüm sağlayan bir tedavi yöntemi üzerinde halen ortak bir karara varılamamıştır. Subglottik hasar sonrası topikal veya sistemik halofuginon uygulaması ise umut verici bir tedavi yöntemi olarak düşünülmüştür.

Çalışmamızda ratlarda deneysel olarak oluşturulan subglottik hasar sonrasında, bir gruba sistemik, bir gruba topikal halofuginon uygulandı, bir başka gruba ise hasar sonrası hiçbir ilaç uygulanmadı. Sonuçlar hem kontrol grupları, hem de birbirleriyle karşılaştırıldı. Sistemik ve topikal halofuginon uygulamasının stenozu önlemede etkili olduğu tespit edildi.

Asistanlığım süresince beni sonsuz deneyimiyle eğiten, çalışma disiplini konusunda yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Hasan CANDAN'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimimde yetişmemde büyük emeği olan, bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Ethem POYRAZOĞLU'na teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamın ve asistanlık eğitimimin her aşamasında bilimsel ve insani eleştirileri ile beni yönlendiren, geceli gündüzlü değerli zamanlarını ayırarak mesleki becerilerimin gelişmesini sağlayan, sabır, hoşgörü, titizlik ve iş disiplinine hayran olduğum tez danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Atila GÜNGÖR'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Eğitim sürecimin her aşamasında, her biri çok önemli paylara sahip olan, özveri ve sabır timsali ağabeylerim Yrd. Doç. Dr. Hakan CINCİK, Yrd. Doç. Dr. Engin ÇEKİN, Yrd. Doç. Dr. Salim DOĞRU ve Op. Dr. Fikret KISAT'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin patolojik değerlendirmesinde koşulsuz yardımlarını esirgemeyen sevgili meslektaşım Dr. Ufuk BERBER'e ve tezimin istatistiksel analizlerini gerçekleştiren istatistik uzmanı Özlem KÖKSAL'a teşekkür ederim.

Üç yıl boyunca beraber çalıştığım, bu süre boyunca gösterdikleri anlayış, fedakarlık, özveri ve arkadaşlıkları için başta asistan arkadaşlarım olmak üzere kliniğimizin tüm hemşire, odyometrist, hastabakıcı ve personeline ayrı ayrı teşekkür ederim.

Uzmanlık öğrenciliğim süresince ve tezimin hazırlanmasında yoğun çalışma tempoma rağmen destek ve yardımlarını esirgemeyen başta sevgili eşim Handan olmak üzere tüm aileme şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

<u>Konu</u> :	<u>Sayfa no:</u>
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
A. İNSANDA SUBGLOTTİK BÖLGENİN ANATOMİSİ	3
B. İNSANDA SUBGLOTTİK BÖLGENİN HİSTOLOJİSİ	4
C. RAT LARENKSİNİN ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ	5
D. SUBGLOTTİK STENoz	6
E. LARENGOTRAKEAL STENozUN EVRELENDİRİLMESİ VE CERRAHİ TEDAVİSİ	10
F. HALOFUGİNONUN FARMAKOLOJİSİ	14
III. GEREÇ VE YÖNTEM	16
IV. BULGULAR	27
A. MORFOMETRİK BULGULAR	27
B. MİKROSKOBİK BULGULAR	33
V. TARTIŞMA	37
VI. SONUÇ	48
VII. ÖZET	49
VIII. SUMMARY	51
IX. KAYNAKLAR	53

I. GİRİŞ

Trakeal stenozların tedavisi baş-boyun cerrahisinin en zor alanlarından biridir ve başarısızlık oranı fazladır. Bunun da en büyük sebebi restenozdur. Ancak iyileşme sürecinde fazla skar oluşumunu önleyici tedavi yöntemleri kullanılarak restenoz engellenebilirse başarı oranı artacaktır (77).

Günümüzde, subglottik stenozların tedavisi, stenozun şiddetine ve semptomlarına bağlı olarak değişir (18). Hafif stenozlarda spontan iyileşme görülebilir, orta derecedeki stenozlar ise endoskopik yöntemlerle tedavi edilirler (83). Trakeomalazi, kıkırdak kaybı ve enfeksiyonun olmadığı kıkırdak çatısının sağlam olduğu bir santimetreden kısa çepçevre skar olgularında endoskopik tedavi önerilmektedir (41). Ciddi olgularda ya da endoskobinin yetersiz kaldığı durumlarda trakeanın önüne veya arkasına kıkırdak greft yerleştirilerek tedavi edilmelidir (15,17).

Cerrahi girişim sonucunda hava yolunda oluşan hasarın en az seviyede tutulması yeni skar oluşumunun ve kontraksiyonun önlenmesi açısından önemlidir. Bununla beraber bütün yöntemlerde stenozun tekrarlama riski vardır ve bu risk stenozu oluşturan kronik inflamatuvar süreçle veya cerrahi girişim sonucu oluşan hasarla ilişkilidir (41).

Trakeal stenoz tedavisinde cerrahi yöntemlere ek olarak antimetabolit, antiinflamatuvar ve antifibrotik etkinlikleri nedeniyle mitomisin-C, 5-Florourasil ve steroidler gibi çeşitli ilaçlar kullanılmakta olup her geçen gün alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmakta ve yeni ilaçlar denenmektedir (9,13,65).

Halofuginon, in vivo ve in vitro olarak Tip I kollajen sentezini ve kollajen α -1 geninin ekspresyonunu önleyen antimetabolit bir ajandır (73). Sistemik veya topikal kullanıldığında ekstrasellüler matriks birikimini engellediği, fibroblast fonksiyonlarını

baskıladığı, anjiogenezisi ve neovaskülarizasyonu azalttığı, postoperatif intraabdominal ve peritendinöz yapışıklıkları azalttığı tespit edilmiş, kostik hasar sonrası özefagus stenozunu önlemede etkili bulunmuştur (58, 60, 63, 67).

Türkçe ve İngilizce literatürde 1990 yılından itibaren yaptığımız taramada halofuginonun subglottik travma sonrası trakeal stenoz gelişimini önlemede etkinliğini araştıran bir çalışma tespit edilemedi. Biz de subglottik hasar sonrası fibrozis gelişiminin önlenmesinde halofuginonun sistemik ve yanı sıra topikal olarak da uygulanmasının antifibrotik ve antistenotik etkilerini incelemek istedik. Bunun üzerine halofuginonun etken maddesinin üreticisi olan *Collgard Biopharmaceuticals* (İsrail) firması ile temasa geçtik. Bu temastan yedi ay sonra İsrail'de yapılan ve subglottik stenoz gelişiminin önlenmesinde halofuginonun etkinliğini gösteren bir araştırma yayınlandı. Bu çalışmada Eliashar ve ark., 10 köpeğin subglottik bölgesine hasar verdikten sonra oral halofuginon uygulamışlar ve bu köpeklerde stenozun gelişmediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca halofuginonla mitomisininin insan trakeal fibroblast kültüründe fibroblast fonksiyonlarını önleyici etkisini karşılaştırmışlar, halofuginonun %75 oranında, mitomisininin ise %60 oranında önleyici etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (24).

Çalışmamızda ratlarda deneysel olarak subglottik travma oluşturuldu. Bir gruba sistemik, bir gruba topikal olarak halofuginon uygulandı ve fibrozisi önlemedeki etkinlikleri ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

II. GENEL BİLGİLER

A. İNSANDA SUBGLOTTİK BÖLGENİN ANATOMİSİ

Subglottik bölge; vokal kordların alt iç yüzeyleri, krikoid kıkırdağın iç yüzeyi ve krikotiroid membran ile sınırlıdır. Trakea ile devam eder. Bu bölge larenks boşluğunun üçüncü parçası olarak kabul edilir. Glottisten krikoid kıkırdağın alt kenarına kadar uzanır (43).

Krikoid kıkırdağ, larenks ve trakeanın tam halka oluşturan tek kıkırdağıdır. Taşlı yüzük biçimindedir. En geniş kısmı arka laminadır, alt sınırı düzdür, arka laminanın üst sınırı ön krikoid lamina düzleminin üstündedir. Subglottik boşluk krikoid kıkırdağın içinde yer alır (5). İnfant larenksi ile erişkin larenksi arasında bazı küçük değişiklikler vardır. İnfantlarda hava yolunun en dar kısmı subglottik bölge, iken erişkinlerde en dar kısım glottistir (85).

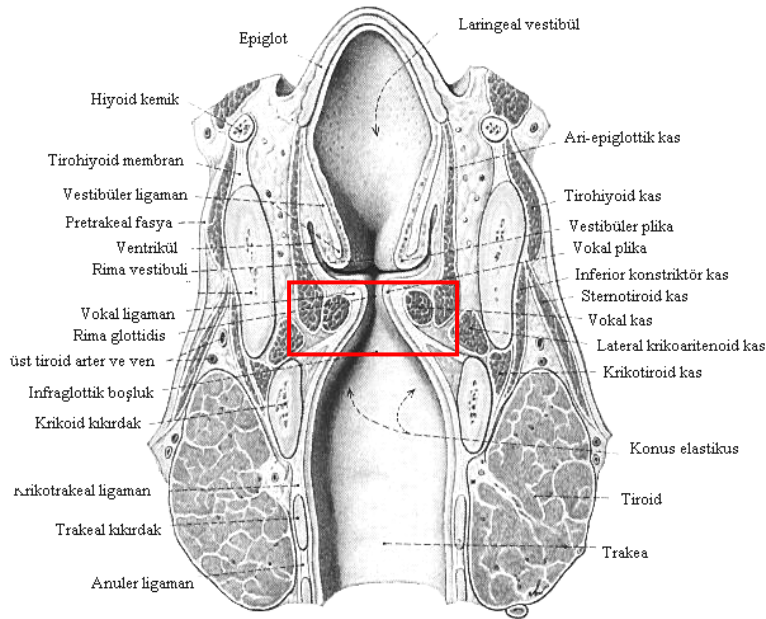
Krikoid kıkırdağın osifikasyonu, krikoidin arka laminasının üst sınırından başlar ve en son ön bölümü osifiye olur (34). Krikoid kıkırdağın üst kenarlarından başlayan konus elastikus mediyalde ters "V" oluşturacak şekilde yukarı doğru uzanarak vokal ligament şekline dönüşür. Yukarıda tiroid kıkırdağın alt ön kenarına bağlanarak krikotiroid membranı oluşturur. Krikotiroid eklem ligamentlerle çevrelenmiştir ve krikoidin, tiroid kıkırdağın alt boynuzu üzerinde dönme ve kayma hareketi yapmasını sağlar. Krikotrakeal ligament ise krikoid kıkırdağı ilk trakeal halkaya bağlar (5, 43).

Subglottik bölgenin lenfatik drenajı lateralde krikotiroid membran yoluyla paratrakeal lenf nodlarına ve mediyalde prelarengeal bölgedeki Delfian noduna doğrudur (85).

B. İNSANDA SUBGLOTTİK BÖLGENİN HİSTOLOJİSİ

Larenks mukozasının büyük bir kısmı goblet hücrelerini içeren yalancı çok katlı silyalı silindirik epitel ya da diğer adıyla “*respiratuvar epitel*” ile döşelidir. Vokal katlantılar, epiglotun ön yüzü ile arka yüzün üst kısmı, ariepiglottik katlantıların kenarları ve piriform fossanın bazı bölümleri ise “yassı epitel” ile döşelidir (85). Mukus salgılayan bezler en çok epiglot, aritenoid kıkırdağın önü ve ventrikülde bulunur (32).

Subglottik bölgeyi “*yalancı çok katlı silyalı silindirik epitel*” döşer. Bu epitelde submukozal tubuloasiner bezler ve goblet hücreleri dağılmıştır. Silyalar, dakikada 1000’den fazla titreşir ve mukus örtüsünü dakikada 1-1,5 cm kadar hareket ettirir. Mukozal onarım subepitelyal marjinal hücrelerce yapılır ve hızı 24 saatte bir milimetre kadardır. Enfeksiyon, nekroz ve yabancı cisimler mukozal onarımı engellerler (4). Kord vokaller adduksiyonda iken subglottik bölge yarık gibi görünür. Ancak krikoidin çevrelediği bölgede lümen halka şeklinde sabit kalır (43).



Resim 1. İnsanda larenksin frontal kesiti (subglottik bölge dikdörtgen içine alınmıştır) (76).

Subglottik bölgede yassı epitelden respiratuvar epitele geçiş olur. Glottik ve subglottik bölge ayırımı için farklı görüşler vardır. Bazı yazarlar “*yassı ve respiratuvar epitel arasındaki sınırdır*” diyerek vokal kordların alt yüzeyindeki yassı epiteli de glottise dahil eder, bazı yazarlar da “*krikoidin üst kenarını, kordun serbest kenarının bir santimetre aşağısını*” kabul ederler. (Resim 1) (43).

C. RAT LARENKSİNİN ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ

Rat larenksi de insanda olduğu gibi boynun orta hattında hiyoid kemikle sternum arasındaki strep kasların arkasında yer alır (Resim 2a). Larenks çatısını oluşturan ana yapılar ile insan larenksi arasında belirgin bir benzerlik vardır. Larenksin triangüler açıklığı önde epiglot, yanlarda ariepiglottik plikalar, arkada ise aritenoid kıkırdaklarla sınırlıdır. Larengeal vestibülün duvarları esnektir. Glottis, elastik vokal ligamentler ve rijid krikoaritenoid ligamentlerle sınırlıdır. Tiroid kıkırdak diğer kıkırdakları yanlarda ve önde örter. Halka şeklindeki krikoid kıkırdak larenksin çatısını oluşturur ve arkada birinci trakeal kıkırdağın üzerine taşar. Kıkırdak yapılar birbirlerine ve hiyoid kemiğe ligamanlarla bağlanır (Resim 2b) (86).

Birinci trakeal kıkırdaktan bifurkasyona kadar olan uzaklık yaklaşık 33 milimetredir. Normalde toplam 24 trakeal kıkırdak olsa da kıkırdakların düzensiz birleşimi nedeniyle bu sayı değişebilir. Transvers kesitlerde lümen oval şekildedir. Horizontal olarak 3 milimetre, vertikal olarak 1,4-2 milimetre uzunluğundadır. Duvar kalınlığı yaklaşık bir milimetredir. “C” şeklindeki kıkırdakların arka uçları transvers trakeal kasla birbirine bağlanmıştır. Respiratuvar mukoza basit silindirik epiteldir. Seyrek olarak glandlar ve subepitelyal lenf folikülleri içerir. Silyalı hücrelere ek olarak goblet hücreleri ve mikrovilluslu hücreler de bulunabilir (86).

Tablo 1. Subglottik stenozun nedenleri (41, 69)

A. Doğumsal nedenler

B. Edinsel nedenler

1. Travmatik nedenler

a. Endotrakeal entübasyon

- I. Travmatik entübasyon**
- II. Uzun süreli entübasyon**
- III. Sık entübasyon ve tüp değiştirme**
- IV. Çok geniş tüp kullanılması**
- V. Hastanın veya endotrakeal tüpün hareketi**
- VI. Lokal enfeksiyon**
- VII. Düşük doğum ağırlığı**

b. Trakeotomi

c. Yanık

2. Neoplastik nedenler

- a. Kondroma**
- b. Yassı hücreli kanser**

3. Enfeksiyonlar

- a. Tüberküloz**
- b. *Klebsiella Rhinoscleromatis* enfeksiyonu**

4. Sistemik Hastalıklar

- a. Wegener granülomatozu**
- b. Sarkoidoz**
- c. Amiloidoz**
- d. Gastroözefageal reflü**
- e. Tekrarlayan polikondrit**
- f. Pemfigus**

5. İdyopatik nedenler

Subglottik stenozun etyolojisinde 1960'lardan 1970'lerin başlarına kadar geçen sürede en çok suçlanan endotrakeal tüplerin şekilleri ve sterilizasyonunda kullanılan etilen oksitin toksik kalıntıları idi (35). Günümüzde bunlar sorun teşkil etmemektedir. Çünkü kullanılan tüpler doku testi yapılmış polivinilkloritten üretilmiş tek kullanımlık tüplerdir (36).

Kazanılmış subglottik stenozu olan bir hastada genellikle birden çok faktör vardır (Tablo 1). Ancak genel ortak unsur "*larengeal travmadır*". İlk entübasyonda yeterli travma oluşursa, tüp kısa süreli bile kalsa subglottik stenoz oluşabilmektedir. Eğer tüp sık çıkarılır ve tekrar konursa travma olasılığı artar. Endotrakeal tüp larenks için çok büyükse, subglottik bölgedeki kıkırdak ve tüp arasındaki yumuşak dokular basınçla erozyona uğrar. Solunum cihazına bağlı iken hastanın hareket etmesi, hastanın hareketsiz olmasından daha fazla larengeal travma nedenidir. Solunum cihazının inspiratuvar atımlarına bağlı endotrakeal tüpün hareketi de subglottik stenozun gelişimi için bir faktördür. Zedelenmiş larengeal dokuların bakteri veya kandida ile enfeksiyonu da stenoz olasılığını artırmaktadır. Larenks yaralanmışsa uzun süreli tüp varlığı subglottik stenoz riskini daha da artırır. Ancak larenks yaralanmamışsa hasta uzun süreli entübasyonu tolere edebilir. Hasta ne kadar gençse endolarengeal tüpü de o kadar uzun süre tolere edebilir (36).

Doğum ağırlığı 1000 gramın altında olan yenidoğanların yüksek risk içinde olmalarının olası bir sebebi de larenkslerinin en küçük endotrakeal tüpler için bile küçük olmasıdır. Ek olarak yenidoğanlar uzun süreli entübasyona ihtiyaç duyabilirler. Ancak bu bebeklerin tamamında stenoz gelişmez. Bu da krikoid kıkırdağın yeterince olgunlaşmaması ve çok esnek olmasına bağlıdır (36).

Kıkırdağın sertliğini matriks sağlar. Büyümeyle birlikte kıkırdak matriksi artar; daha az hidratlı, daha fazla lifli ve daha sert olur. Bu nedenle büyük çocukların ve yetişkinlerin larenksleri entübasyon travmasına daha az toleranslıdır (36).

Kazanılmış subglottik stenoz muhtemelen şu şekilde gelişir; endotrakeal tüpün yerleştirilmesi ile travma meydana gelir. Travma yeterince şiddetli ise bu tek başına stenozla sonuçlanır. Daha sıklıkla, entübasyon travması sadece mikroskopik mukozal kanama ve ödemle sonuçlanır. Ülserleşme daha çok her iki aritenoid kıkırdağın hemen altındaki posterolateral krikoid halkadadır (35). Ancak önde, arkada ve orta hatta da görülebilir. Ülserleşmeler genellikle daireseldir ve mukozadaki yumuşak dokularla sınırlı olabilir veya krikoidin perikondriumundan kıkırdağa kadar yayılabilirler. Artan travmayla veya entübasyon süresine bağlı olarak ülserler genişler ve derinleşir. İyileşme döneminde, granülasyon dokuları ülserleri dolduracak şekilde artar (36).

Siliyer staz ve lokal enfeksiyon sonucu daha fazla granülasyon dokusu gelişir. Bazen lümeneye doğru granülom şeklinde çıkıntılar oluşur. Granülasyon dokuları kollajen lifleri oluşturarak ülserleri tabanından itibaren fibrozis ile doldururlar. Bu iyileşme sürecinde ülserin genişliğine ve derinliğine bağlı olarak subglottik stenoz oluşabilir (36).

Kazanılmış subglottik stenozun önlenmesindeki önemli yöntemlerden biri endotrakeal tüpün sabitlenmesidir. Nazotrakeal entübasyon daha az sıklıkta subglottik stenoza yol açar (42, 65). Tüpün sabitlenmesi trakeadan aşağı kaymasını engeller ve aynı zamanda solunum cihazına sekonder endotrakeal tüpün hareketini de sınırlar. Buruna veya dudaklara yapılan sabitleme, larenkste tüpün sabit durduğu anlamına gelmez. Yutkunma sırasında larenksin yükselmesi veya hastanın hareketi, larenksin tüp üzerinde hareket etmesi ile sonuçlanır (36).

İdyopatik subglottik stenozun gelişimi tamamen varsayımlara dayandırılır. Larengotrakeal enfeksiyondan sonra üst hava yolları mukozasında enfeksiyon ve ülserleşme meydana gelebilir . Krikoid kıkırdağın kan akımı sınırlı olup yutma ve baş hareketi ile sürekli değişir. Bu da iyileşmede bozulmaya, granülasyon dokusu gelişimine ve stenoza yol açabilir. Herhangi bir nedenle subglottik bölgenin yaralanması stenoz ile sonuçlanabilir (28).

Subglottik bölgenin primer tümörlerine sık rastlanmaz (19). Tümörleri primer ve sekonder olarak iki sınıfta incelenir. Primer lezyonlar subglottisten kaynaklanan, sekonder lezyonlar ise glottik bölge başta olmak üzere, larenksin diğer bölgelerinden buraya uzanan tümörleri tanımlamak için kullanılır. Tüm larenks malignitelerinin %1-3,6'sını primer subglottis tümörleri oluşturur (81).

E. LARENGOTRAKEAL STENOZUN EVRELENDİRİLMESİ VE CERRAHİ TEDAVİSİ

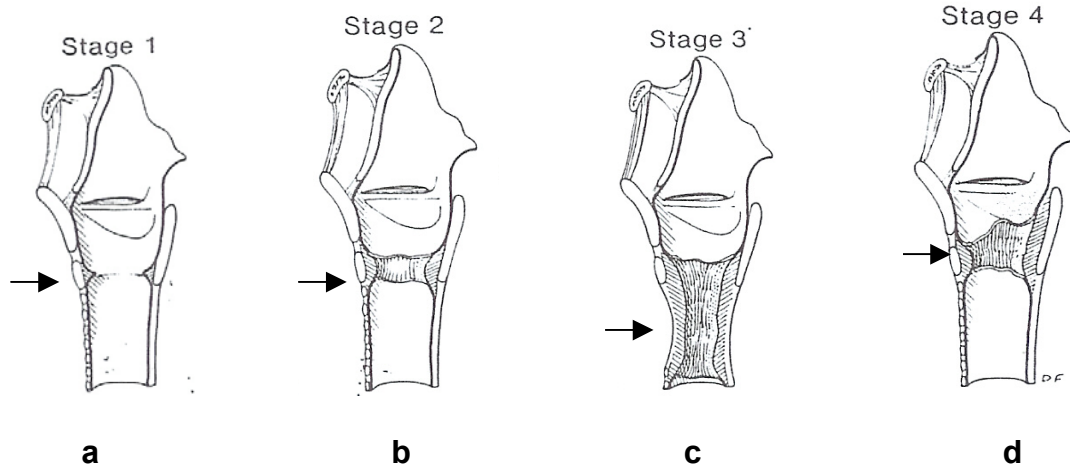
Larengotrakeal stenozlar klinik olarak şu şekilde evrelendirilir (49,50):

Evre 1 lezyonlar: Subglottik bölge ya da trakeayı kuşatan bir santimetreden kısa stenozlardır (Resim 3a).

Evre 2 lezyonlar: Krikoidin kıkırdak halkasını kuşatan ve glottik bölgeye ya da trakeaya uzanan, bir santimetreden uzun subglottik stenozlardır (Resim 3b).

Evre 3 lezyonlar: Trakeanın üst bölümüne uzanan, glottik bölgeyi içermeyen subglottik stenozlardır (Resim 3c).

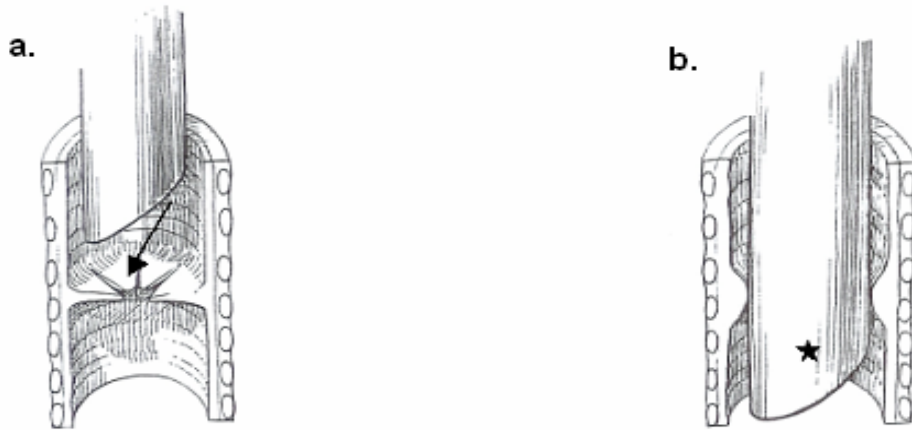
Evre 4 lezyonlar: Bir ya da her iki vokal kordun felci veya glottik bölgeyi içeren stenozlardır (Resim 3d).



Resim 3. Larengotrakeal stenozların evrelendirilmesi (50).

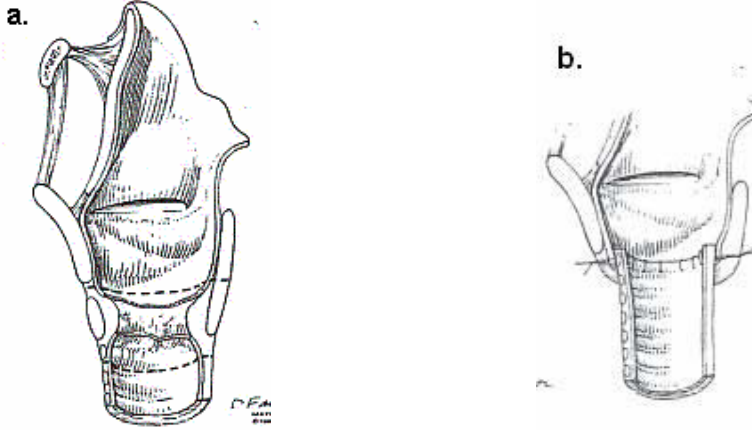
Larengotrakeal stenozlu hastaların tedavisinde temelde üç teknik kullanılır (50):

1. Endoskopik tedavi: Stenotik alana CO₂ lazer ile multipl radyal insizyonlar yapılır, ardından bronkoskobun ucuyla genişletilir. Bu işlem stenozlu bölgedeki mukozayı korumakta ve genişletilen bölgenin restenoz olasılığını azaltmaktadır (Resim 4) (50).



Resim 4. İnce trakeal stenozun tedavisi (50), **a.** CO₂ lazer kullanılarak stenozun genişletilmesi. **b.** Bronkoskobun ucunun (yıldız) stenotik parçaya uzunlamasına geçirilerek genişletme işleminin yapılması.

2. Segmental rezeksiyon: Trakea ya da krikoid kıkırdak düzeyinde yapılır ve primer reanastomoz ile onarılır. Trakeanın primer reanastomozu trakeayı serbestleştirdikten sonra yapılır (28). Eğer stenoz vokal kordlara 1,5 cm kadar yaklaşırsa krikoid kıkırdağın segmental rezeksiyonu da ayrıca yapılır (Resim 5) (70).



Resim 5. Subglottik stenoz için rezeksiyonu (50), **a.** Kesik çizgi ile işaretlenen bölge çıkarılacak bölgeyi göstermektedir. **b.** Krikoid kıkırdağın trakea ile reanastomozu.

3. Genişletme larengotrakeoplastisi: Krikoid ve tiroid kıkırdağının ön ve arkası kesilir, kıkırdak greft öne ya da hem ön, hem arkaya yerleştirilir (Resim 6 ve 7) (48) .

F. HALOFUGİNÖNÜN FARMAKOLOJİSİ

Halofuginon (HF), kimyasal bileşimi *7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidiny)-2-oxypropyl]-4(3H)-quinazolinone* olan ve *Dichroa Febrifuga* bitkisinden elde edilen, hindi ve tavuklarda koksidiomikozis tedavisinde kullanılan bir alkaloiddir (3). Ancak daha sonra hayvan çalışmalarında ratlardaki *graft versus host* hastalığı gibi aşırı kollajen depolanmasıyla birlikte seyreden hastalıklarda deri kollajen sentezini baskıladığı da tespit edilmiştir (27, 45). Bleomisin verilerek pulmoner fibrozis oluşturulan sıçanlarda halofuginonun fibrozisi azalttığı (55), dimetilnitrozamin verilerek oluşturulan karaciğer sirozunu önlediği gösterilmiştir (72). Operasyon sonrası gelişen peritendinöz yapışıklıkları azalttığı (63), sıçanlarda postoperatif batin içi yapışıklıkları önlediği rapor edilmiştir (58). Vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek anastomoz bölgelerindeki intima hiperplazisini önlemiştir (12, 56). Glomerülopatilerde ve ileri glomerüler lezyonlarda mezanjiyal hücre proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks birikimini önleyerek son dönem böbrek yetmezliğine gidişi engellediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.(57).

Tüm bu çalışmalarda halofuginon, in vivo ve in vitro olarak kollajen alfa-1 (Tip I) gen ekspresyonunu ve kollajen Tip-I sentezini baskılamıştır (73). Kültürde halofuginonun kronik *graft versus host* hastalıklı ve sklerodermalı hastalardan elde edilen insan fibroblastlarının kollajen üretimini ve kollajen alfa-1 (Tip I) gen ekspresyonunu zayıflattığı gösterilmiştir (31). Ayrıca halofuginon normal insan deri fibroblastlarında da *Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)*'nin uyardığı kollajen alfa-1 (Tip I) gen ekspresyonunu zayıflatmış, ancak Tip 2, 3 ve 10' a etkisi olmamıştır (59). Kronik *graft versus host* hastalığı olan bir hastada halofuginon topikal olarak kullanılmış ve kollajen alfa-1 (Tip I) gen ekspresyonunun azaldığı klinik olarak da gösterilmiştir (60).

Kollajen, vücuttaki tüm destek dokuların temel bileşimidir. Kollajen döngüsü tümör bünyesini, yeni damar oluşumunu ve metastatik yayılımı engeller. Halofuginon kollajen üretimini önlemek suretiyle tümörün büyümesi için gerekli olan angiogenezisi, hücre proliferasyonu ve hücre migrasyonu gibi çeşitli hücresel aktiviteleri bozar. Halofuginona spesifik olan bu mekanizma *panstazis* olarak adlandırılır ve yeni bir anti-tümör ajan sınıfını oluşturur. Halofuginon tümörün stromal desteğini bozduğu için deneysel çalışmalarda, mesane, prostat, meme, deri ve akciğer kanserinin tedavisinde de kullanılmaktadır (25).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 19.01.2006 tarih ve 01/06 nolu onayı alınarak çalışmaya başlandı. Çalışma 1. Ordu K.ıığı Gıda Kontrol Müfrezesi Deney Hayvanı Bakım Merkezinde 250-300 gram ağırlıktaki (ortalama ağırlık 265 gram), her iki cinsten 38 adet “*Sprague Dawley*” tipi rat kullanılarak gerçekleştirildi. Isısı 20-22 santigrat derecede sabit tutulan, günde iki defa temizliğı yapılan, 12 saat karanlık / aydınlık döngüsüne uygun, kapalı hayvan barınağında bakılan ratlar dörder deneklik kafeslerde tutuldu. Standart rat yemi ve çeşme suyu verilerek beslendi (Resim 8).



Resim 8. Deney hayvanları bakım ünitesi.

Çalışmada kullanılan "halofuginone hydrobromide" maddesi 20 mg saf toz halinde üretici firma olan *Collgard Biopharmaceuticals, İsrail* ile temasa geçilerek temin edildi. Toz haldeki *halofuginone hydrobromide* 30 mg/dl olacak şekilde serum fizyolojikle sulandırıldıktan sonra solüsyon halinde kullanıldı.

Ratlar çalışma ve kontrol grubu olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Çalışma grubu sistemik halofuginon uygulanan A grubu ve topikal halofuginon uygulanan B grubu olarak 15'er rattan oluşacak şekilde; kontrol grubu ise pozitif kontrol C grubu olarak 6 rattan ve negatif kontrol D grubu ise 2 rattan oluşacak şekilde ikişer alt gruba ayrıldılar. Ancak çalışma süresince A grubundan 1, B grubundan ise 7 rat aşırı anestezi madde uygulanması sonucunda öldü. Çalışmaya A grubu 14 rat, B grubu ise 8 rat olacak şekilde devam edildi (Tablo 2).

Cerrahi işlem: Her bir rata intramusküler 40 mg/kg ketamin baz (*Ketalar®* 10 ml flakon, Pfizer) ile 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (*Rompun®* 50 ml %2 flakon, Bayer) verilerek anestezi sağlandı ve ratlar operasyon sırasında spontan solunuma bırakıldı.

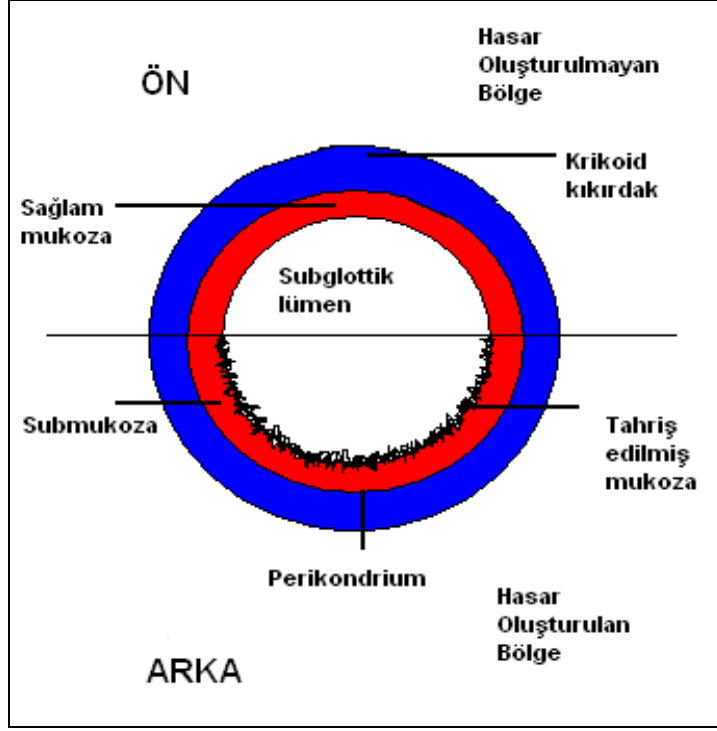
Intramusküler anestezi uygulandıktan on dakika sonra ratlar supin pozisyonda yatırıldı. Boyun ön bölümü traş edildi, povidon-iodin (*Poviodeks®* 1000 ml antiseptik solüsyon, KİM-PA) ile silindikten sonra steril örtüyle kapatıldı. Sterilizasyondan sonra operasyon mikroskobu (Karl Kaps SOM 62, Almanya) ile çalışıldı.

Hemostaza yardımcı olmak, peroperatuvar ve postoperatuvar ağrıyı azaltmak amacıyla boynun ön kısmına subkutan 0,2 ml epinefrinli lidokain hidroklorür (*Jetokain®* ampul 2 ml, Adeka) uygulandı. Cerrahi işlemler mikrocerrahi seti ile yapıldı (Resim 9).



Resim 9. Operasyonda kullanılan cerrahi set

Orta hatta çene altında tiroid kıkırdak üst sınırından insisura jugularise uzanan yaklaşık 3 cm uzunluğunda vertikal cilt insizyonu yapıldı (Resim 10a ve b). Cilt ve cilt altı geçildi, strep kaslar ekarte edilerek larengotrakeal çatı ortaya kondu (Resim 10c). Pretrakeal fasya eleve edildikten sonra krikoid kıkırdak ile 1. trakeal halka arasından 11 numara bistüri ile transvers kesi yapıldı. Mikromakas ile kesi genişletildi ve subglottik bölgeye ulaşıldı (Resim 10d). Mikroskop altında pik yardımı ile A, B ve C gruplarındaki ratların subglottik bölgelerinin arka yarımaları travmatize edildi. (Resim 11a)(Şekil 1). Ardından subglottik insizyon, strep kaslar, cilt altı dokusu ve cilt anatomiye uygun olarak 6/0 *polyglactin 910* (*Vicryl*, Ethicon, Belçika) ile kapatılarak operasyona son verildi (Resim 11 b, c ve d).



Şekil 1. Subglottik bölgeye yapılan travmanın şematik aksiyel kesiti

A grubu 14 rattan oluşturuldu. Subglottik hasar meydana getirildikten sonra, önceden hazırlanan halofuginon solüsyonu 0,1 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak (sistemik) uygulandı. İlaç uygulaması 30 gün boyunca her gün tekrarlandı (Tablo 2).

B grubu 8 rattan oluşturuldu. Subglottik hasardan sonra 30 mg/dl konsantrasyonda hazırlanan halofuginon solüsyonu pamuğa emdirildi ve 5 dakika boyunca travmatize edilen subglottik bölgeye topikal olarak uygulandı (Resim 9f). İşlem sadece bir kez yapıldı (Tablo 2).

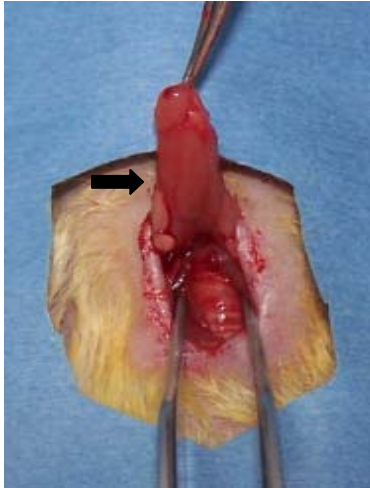
Pozitif kontrol grubu olan C grubu 6 ve negatif kontrol grubu olan D grubu 2 rattan oluşturuldu. C grubuna subglottik bölgede hasar uygulandı, ancak hiç ilaç uygulanmadı. D grubundaki ratlar ise sadece aynı ortamda bulundular, aynı yemi yediler, ancak hiçbir cerrahi işlem uygulanmadı (Tablo 2).



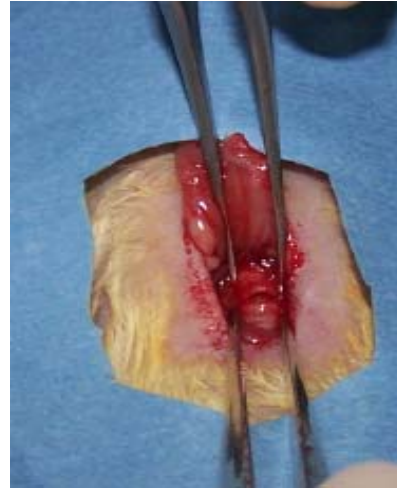
(a)



(b)



(c)

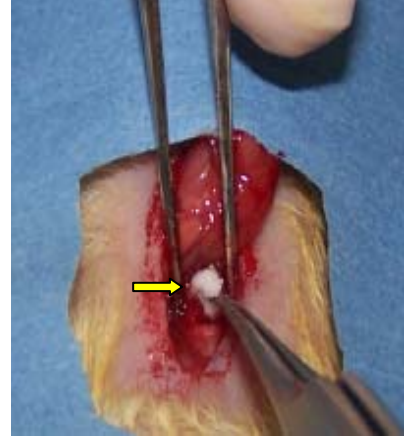


(d)

Resim 10. Cerrahi işlemin bölümleri. **(a)** Operasyona hazırlanan ratın traşlanmış boynu, **(b)** Boyun orta hatta yapılan medyan vertikal cilt insizyonu, **(c)** Larengotrakeal çatının ortaya konuşu (Ok submandibuler glandı göstermektedir), **(d)** Subglottik bölgeye yapılan horizontal kesi.



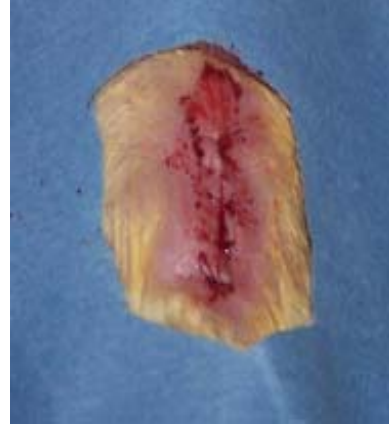
(a)



(b)



(c)



(d)

Resim 11. Cerrahi işlemin bölümleri. (a) Subglottik bölgenin travmatize edilişi, (b) Pamuğa emdirilmiş halofuginon solüsyonunun subglottik bölgeye uygulanması (Ok pamuğu göstermektedir), (c) Subglottik insizyonun kapatılması, (d) Cilt kapatıldıktan sonraki görünüm.

Tablo 2. Çalışma grupları ve uygulanan işlemler.

GRUPLAR		N	Çalışma süresi	Yapılan işlem
ÇALIŞMA GRUBU	A (Sistemik ilaç grubu)	14	30 gün	Krikoid kıkırdak ile 1. trakeal halka arasından yapılan insizyonla subglottik bölgenin arka yarısı travmatize edildi ve insizyon kapatıldı. Ratlara her gün 0,1 mg/kg intraperitoneal halofuginon uygulandı.
	B (Topikal ilaç grubu)	8	30 gün	Krikoid kıkırdak ile 1. trakeal halka arasından yapılan insizyonla subglottik bölgenin arka yarısı travmatize edildi ve aynı bölgeye pamuğa emdirilmiş 30 mg/dl konsantrasyonunda halofuginon solusyonu 5 dakika boyunca uygulandıktan sonra insizyon kapatıldı.
KONTROL GRUBU	C (Pozitif kontrol grubu)	6	30 gün	Krikoid kıkırdak ile 1. trakeal halka arasından yapılan insizyonla subglottik bölge arka yarısı travmatize edildikten sonra insizyon kapatıldı. Sistemik ya da topikal halofuginon uygulanmadı.
	D (Negatif kontrol grubu)	2	30 gün	Ratlara hiçbir uygulama yapılmadı, aynı ortamda tutuldular, halofuginon hariç aynı ilaç uygulamaları yapıldı.

N: Rat sayısı

Profilaksi amacıyla tüm ratlara peroperatuvar intraperitoneal 50 mg/kg dozunda sefazolin sodyum (*Sefazol* 250 mg flakon, Mustafa Nevzat) verildi. Postoperatif erken dönemde solunum sıkıntısı yönünden takip edilip tamamen uyandıklarında kafeslerine alındılar. Opere edilen ratlar solunum sıkıntısı, stridor ve beslenme bozukluğu açısından sakrifiye edilinceye kadar gözlemlendi. Herhangi bir nedenle ölen rat yerine başka bir rat ile çalışmaya devam edildi.

A, B ve C gruplarındaki ratlar 30. uncu günde intramüsküler 40 mg/kg ketamin baz (*Ketalar* 10 ml flakon, Pfizer®) anestezisi altında, veküronyum bromid (*Norcuron* 4 mg/amp, Organon Teknika) verilerek sakrifiye edildi. Bütün ratların larenksleri altta 4. trakeal halkanın alt, üstte tiroid kıkırdağın üst kenarından kesilerek çıkarıldı (Resim 12).



Resim 12. İşlem bitiminde çıkarılan rat larenksi. Önden (a) ve yandan (b) görünüm.

Mikroskopik inceleme için kesitler %10'luk nötral formaldehit ile fikse edildi. Parafin içine gömülüp bloklandı. Mikrotomla (Leica RM2035, Almanya) 3 mikron kalınlığında horizontal kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ve *Masson Trichrome* (MT) ile boyandı ve ışık mikroskopunda (Olympus BH-2, Japonya) x10, x20 ve x40 büyütmelemlerle incelendi.

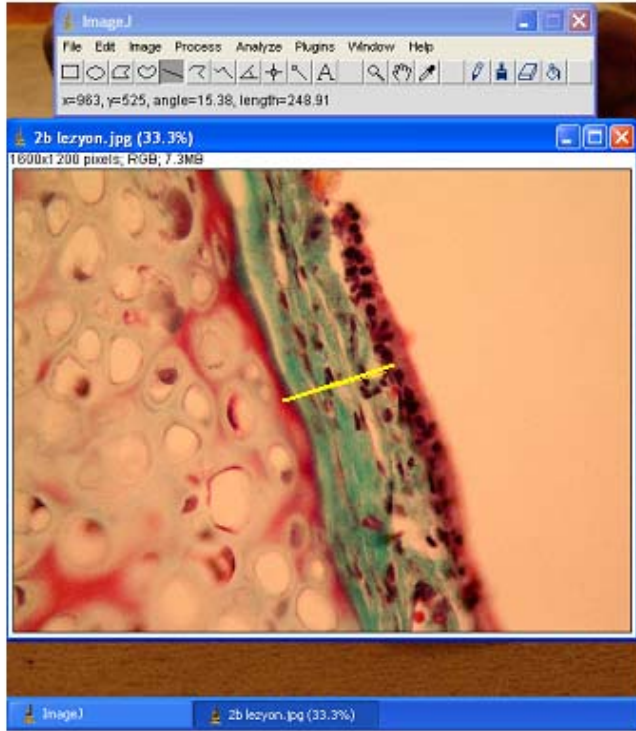
Histopatolojik incelemede; epitelizasyon, inflamasyon ve nekroz parametreleri değerlendirildi. Tüm parametrelerde; yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

şeklinde nitelendirildi ve mikroskopik değerlendirme sırasında “+” ve “-” işaretle değerlendirilen parametreler istatistiksel değerlendirme için 0, 1, 2 ve 3 olacak şekilde nümerik hale getirildi. Epitelizasyon için hasarlı bölgedeki mukoza yüzeyindeki epitel rejenerasyonu yüzde (%) alan olarak değerlendirildi. İnflamasyon ise hasarlı bölgedeki submukozal alanda x40 büyütme alanındaki toplam inflamatuvar hücreler sayılarak değerlendirildi. Derecelendirmeye esas olarak tüm deneklerin sağlam bölgelerinin bir büyütme alanındaki inflamatuvar hücre sayıları tespit edilip ortalamaları alındı. Bunun için (-) değerlendirme 0, (+) değerlendirme 1, (++) değerlendirme 2, (+++) değerlendirme 3 olarak puanlandı (Tablo 3).

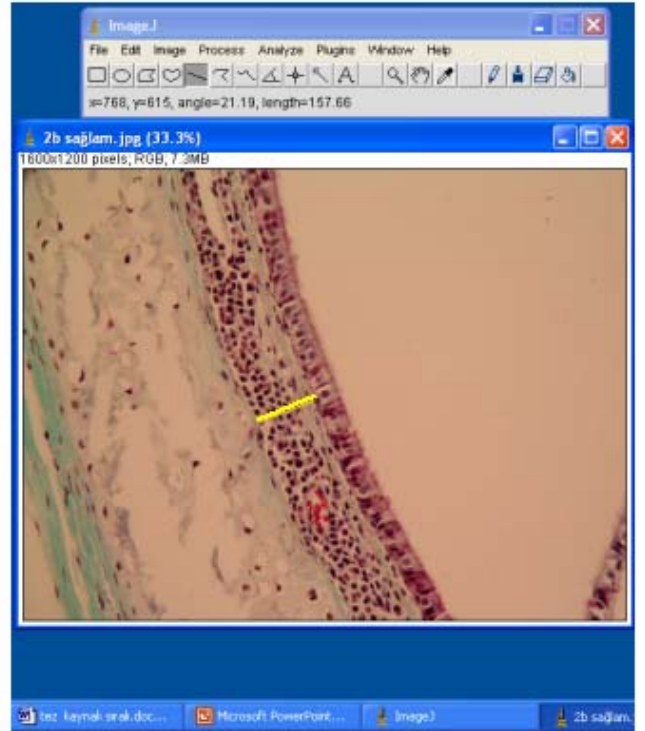
Tablo 3. Mikroskopik değerlendirme sırasında “+” ve “-“ olarak değerlendirilen parametrelerin istatistiksel değerlendirme için nümerik hale getirilmesi (x40 büyütme).

PARAMETRELER	(-) Yok	(+) Hafif	(++) Orta	(+++) Şiddetli
EPİTELİZASYON	%25'den az	%26-50	%51-75	%75'den fazla
İNFLAMASYON	0-50 inflamatuvar hücre var	51-100 inflamatuvar hücre var	101-150 inflamatuvar hücre var	151'den fazla inflamatuvar hücre var
NEKROZ	Nekroz bulgusu yok	Bir bölgede hafif nekroz var	Periferde birden fazla bölgede nekroz var	Periferde ve merkezde yaygın nekroz var

MORFOMETRİK ÖLÇÜM: Işık mikroskobunda *Masson Trichrome* boyama ile x40 büyütmede elde edilen görüntüler renkli video kamera (Sony CCD-IRIS Japonya) aracılığı ile bilgisayar ortamına (Intel Pentium 3) aktarıldı (13). Fibrotik alanlar bilgisayar ortamında ImageJ 1,36b (National Institutes of Health, A.B.D.) görüntüleme programı ile piksel cinsinden ölçüldü (Resim 13) (Şekil 2).



a.

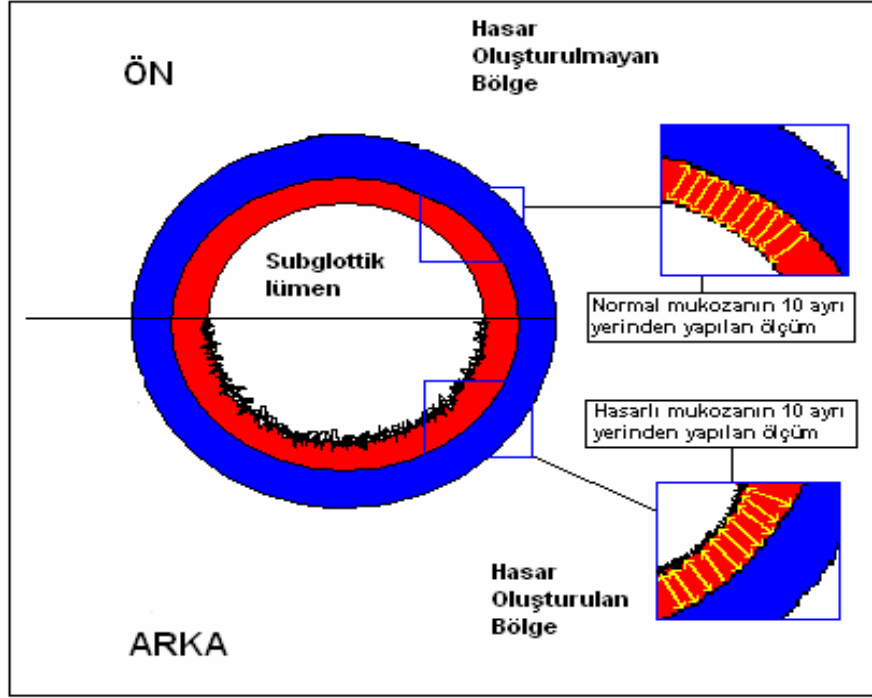


b.

Resim 13. Lezyonlu ve sağlam alanların bilgisayar ortamında ölçülmesi. (a) İlaç uygulanmayan hasarlı bölge, (b) Sağlam bölge.

Her ratın subglottik bölgesinde tahriş edilen lümenin arka tarafındaki fibrozisli dokunun on ayrı yerinden yapılan ölçümlerinin ortalaması “**lezyonlu alan skoru (LAS)**”, tahriş edilmeyen ön tarafındaki normal mukozanın on ayrı yerinden alınan ölçümlerinin ortalaması ise “**sağlam alan skoru (SAS)**” olarak belirlendi. Lezyonlu

alan skorunun, sağlam alan skoruna oranı (LAS/SAS) “**fibrozis indeksi (Fi)**” olarak belirlendi (13) .



Şekil 2. Normal ve hasarlı subglottik bölgelerdeki mukoza ölçümünün şematik görünümü.

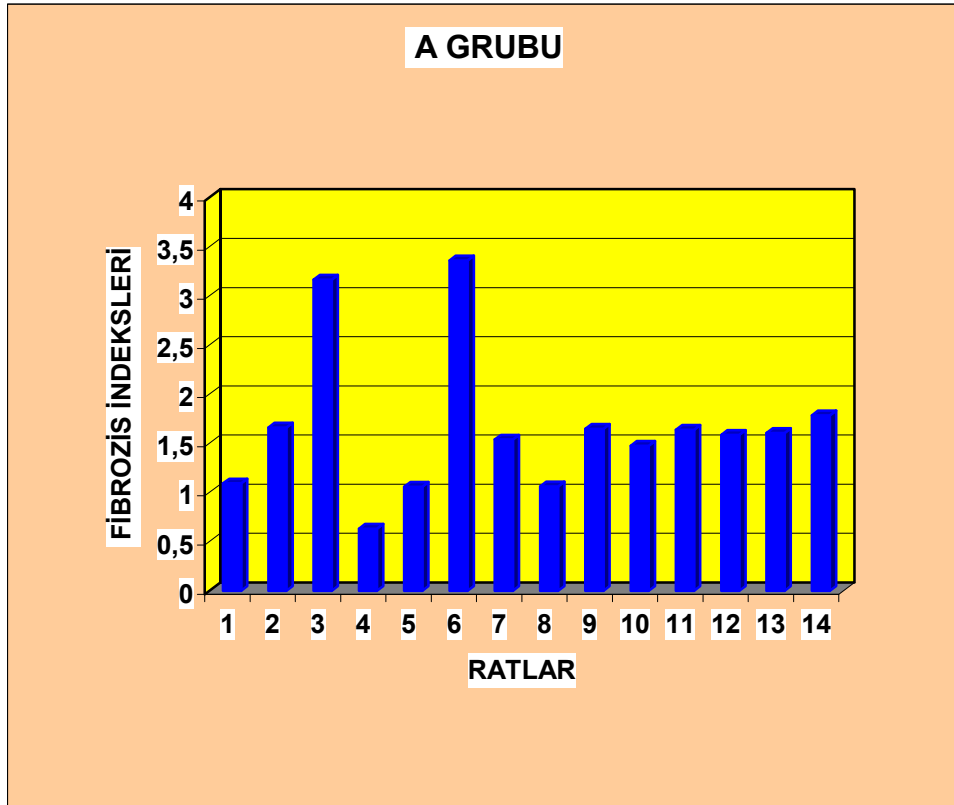
Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizleri için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11,0 programı kullanıldı. Çalışma ve kontrol gruplarının verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (Ortalama, Standart sapma ve Ortanca) yanısıra, niceliksel verilerin (Ortalamaların) karşılaştırılmasında, üç grubun karşılaştırması için *Kruskal Wallis Test* ve ikili olarak gruplarının morfolojik ölçümlerinin karşılaştırılması için *Mann-Whitney U Test (MWU)* kullanıldı. Üç grubun inflamasyon sonuçlarının istatistiksel olarak incelenmesinde *Pearson Chi-Square Test* kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde ve %99 güven aralığında ileri derecede anlamlılık $p < 0,01$ düzeyinde değerlendirildi.

IV. BULGULAR

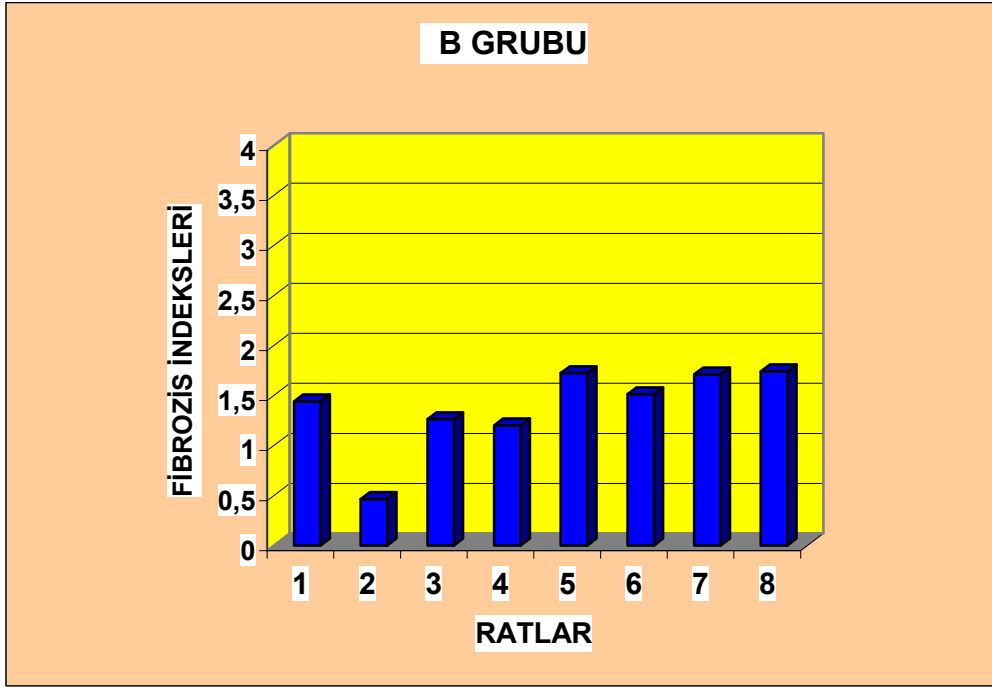
Ratlarda anesteziden kaynaklanan peroperatuvar herhangi bir komplikasyon izlenmedi. Tüm ratlarda birinci gün oral alım azaldı, fakat daha sonra normale döndü.

A. MORFOMETRİK BULGULAR; Hazırlanan her preparatın 10 ayrı noktasından yapılan ölçümlerle tüm grupların fibrozis indeksleri oluşturuldu (Resim 13)(Tablo 4, 5 ve 6) (Şekil 2).

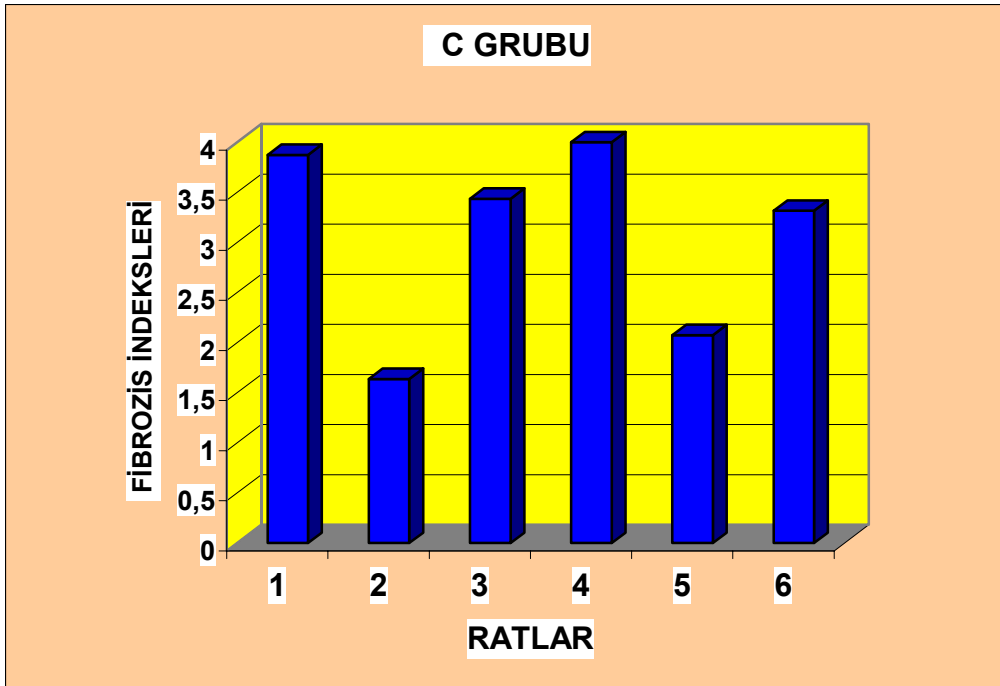
Tablo 4. Subglottik hasar sonrası 30 gün boyunca intraperitoneal halofuginon uygulanan A grubunun “Fibrozis İndeksi” ölçüm sonuçları.



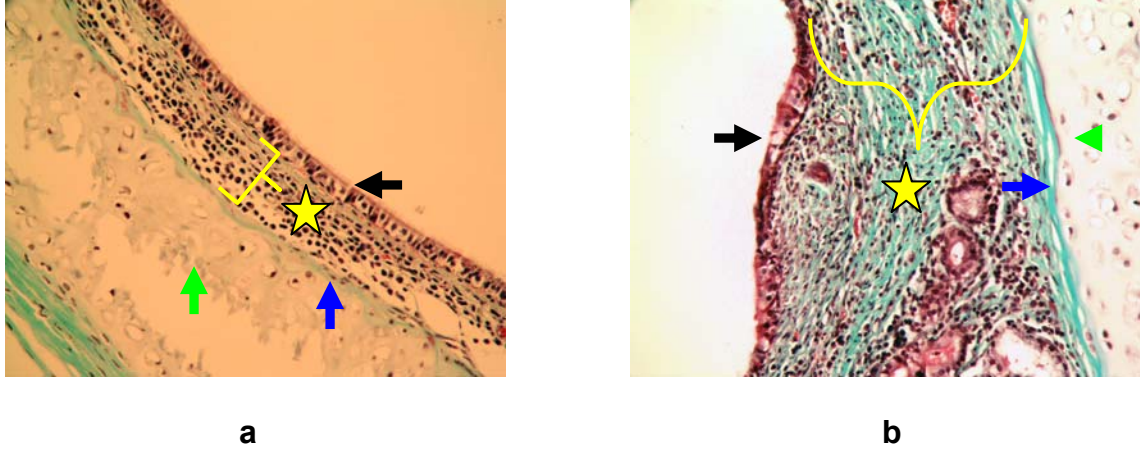
Tablo 5. Subglottik hasar sonrası bir kez topikal halofuginon uygulanan B grubunun “Fibrozis İndeksi” ölçüm sonuçları.



Tablo 6. Subglottik hasar sonrası ilaç uygulanmayan C grubunun “Fibrozis İndeksi” ölçüm sonuçları.

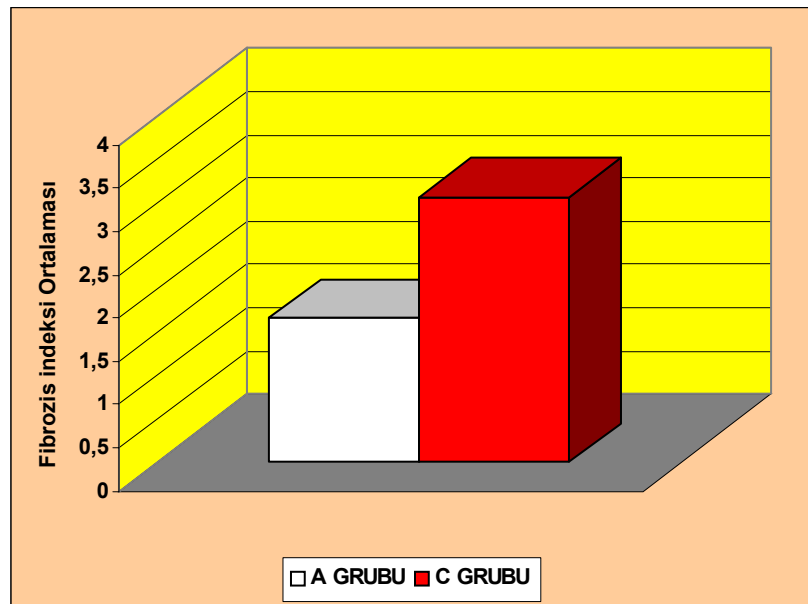


Otuz gün boyunca intraperitoneal halofuginon uygulanan çalışma grubu (A) ile pozitif kontrol grubunun (C) “**Fibrozis indeks**”leri ortalamaları karşılaştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edildi ($p<0,05$)(Resim 14)(Tablo 7).

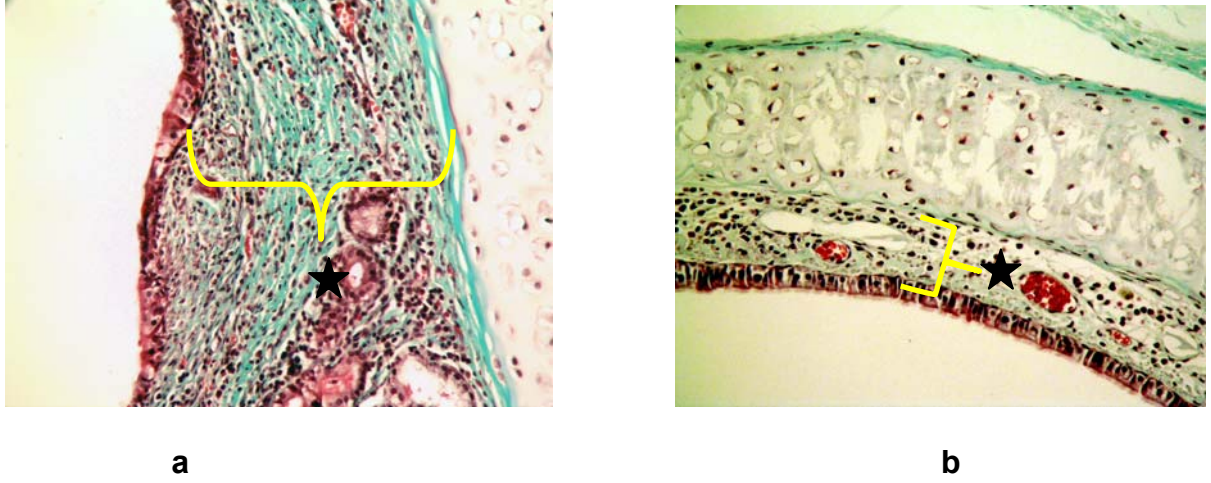


Resim 14. Sistemik halofuginon uygulanan çalışma grubu (a) ile pozitif kontrol grubundan birer ratın (b) subglottik bölgesindeki fibrozis (yıldız) (Siyah ok; yalancı çok katlı silyalı silindirik epitel, Mavi ok; bazal membran, Yeşil ok; krikoid kıkırdak) (HE, x10).

Tablo 7. A çalışma grubu ile C pozitif kontrol gruplarının fibrozis indeksi ortalamaları ($p<0,05$).

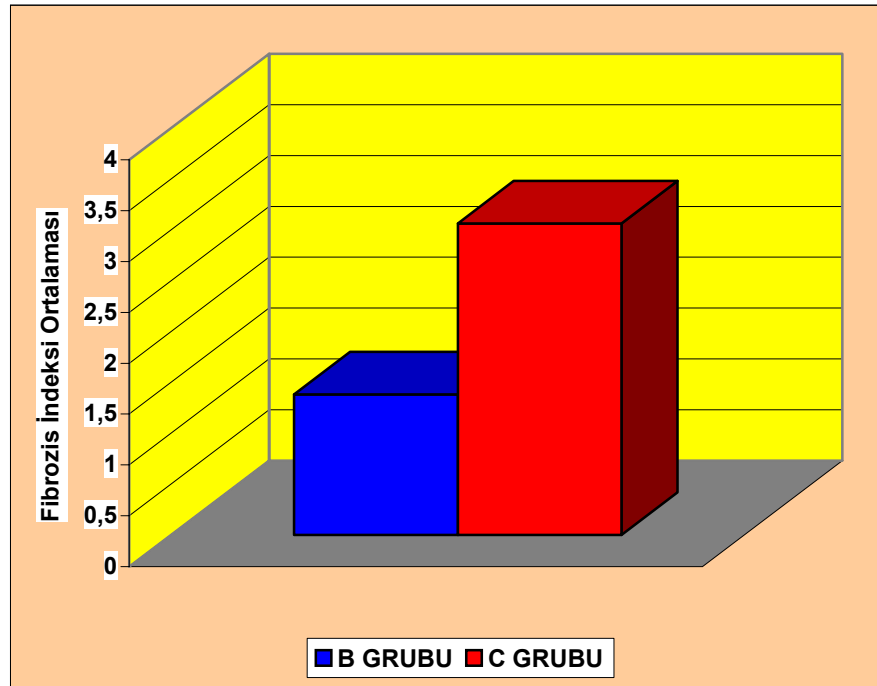


Subglottik hasar sonrası ilaç uygulanmayan C grubu ile topikal halofuginon uygulanan B grubunun “Fibrozis indeksi” leri ortalamaları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edildi ($p<0,05$)(Resim 15)(Tablo 8).

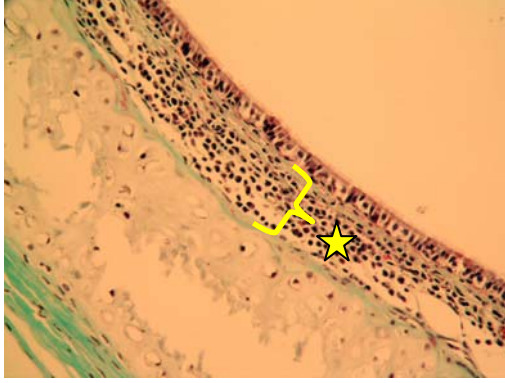


Resim 15. (a). Halofuginon uygulanmayan ve (b) topikal halofuginon uygulanan gruptan bir ratın subglottik bölgesindeki fibrozisin 30. gündeki durumu (Yıldız) (HE, x10).

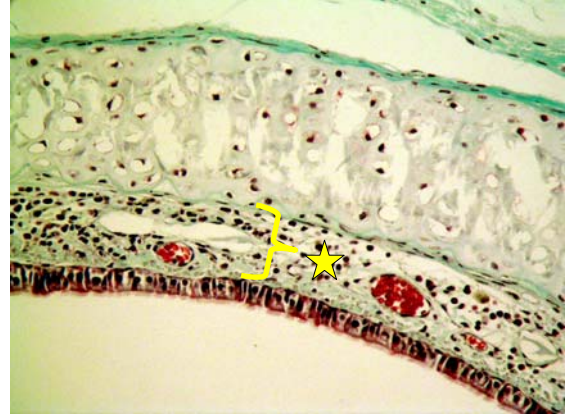
Tablo 8: B ve C gruplarının fibrozis indeksi ortalamaları $p<0,05$.



Subglottik travma sonrası 30 gün boyunca intraperitoneal halofuginon uygulanan A grubu (Resim 16a) ile topikal halofuginon uygulanan B grubu (Resim 16b) “**Fibrozis indeks**” leri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 9).



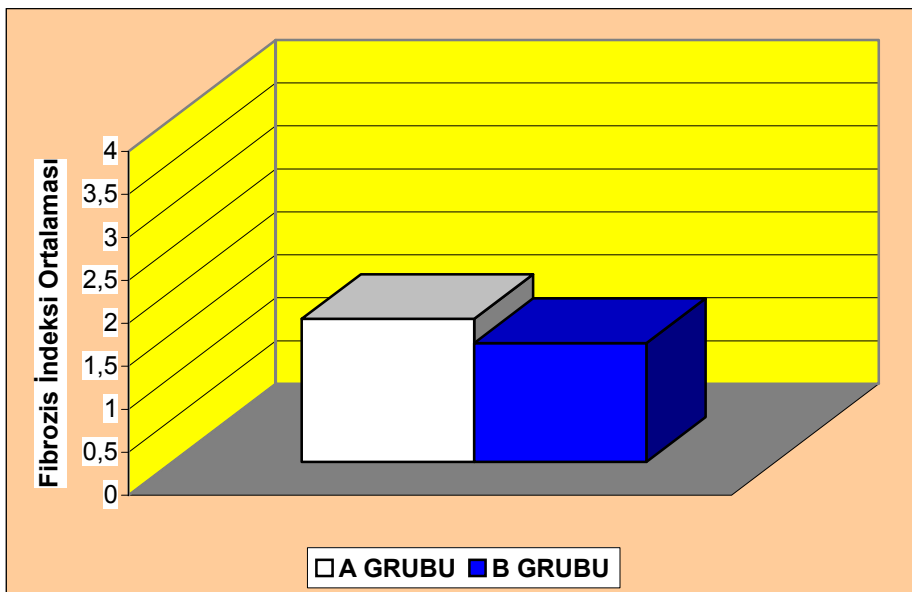
a



b

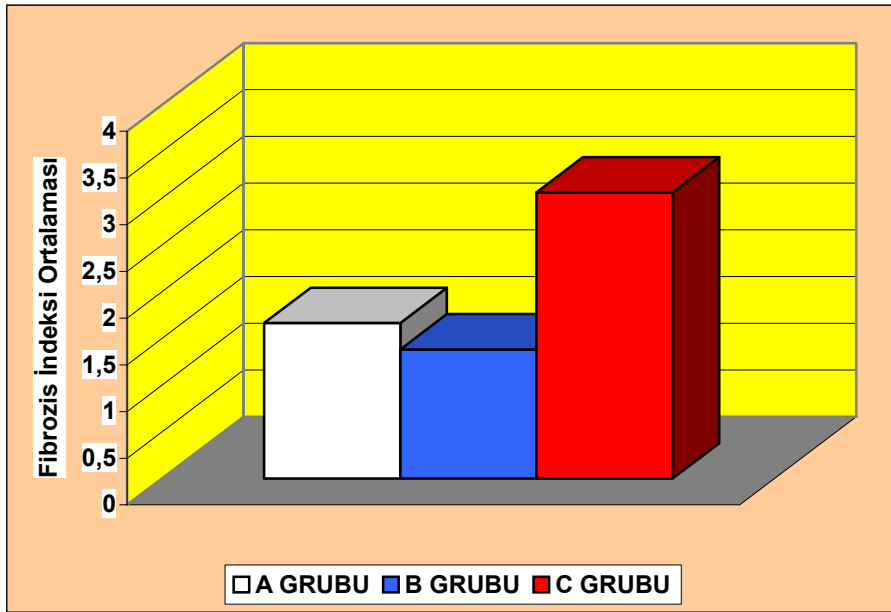
Resim 16. (a) Sistemik halofuginon uygulanan A grubu ile (b) topikal halofuginon uygulanan B grubundan bir ratın subglottik bölgesindeki fibrozis (Yıldız) (HE, x10).

Tablo 9. A ve B gruplarının fibrozis indeksleri ortalamaları ($p>0,05$).



Subglottik travma sonrası her üç grubun “fibrozis indeksi” ortalamaları karşılaştırıldı, ilaç uygulanmayan C grubunun indeks ortalamalarındaki yükseklik ilaç uygulanan A ve B grubundan istatistiksel olarak ileri derecede farklı bulundu ($p<0,01$) (Tablo 10 ve 11).

Tablo 10. A, B ve C gruplarının fibrozis indeksleri ortalamaları ($p<0,01$).



Tablo 11. A, B ve C gruplarının istatistiksel analizleri (Değerler piksel cinsinden ortalamalardır).

GRUP	Ortalama	N	Standart Sapma
A	1,6638	14	0,7510
B	1,4289	8	0,4309
C	3,0625	6	0,9814

B. MİKROSKOBİK BULGULAR; Hiçbir işlem uygulanmayan negatif kontrol (D Grubu) grubunda inflamasyon, nekroz ve fibrozis saptanmadı. A, B ve C grubunun inflamasyon sonuçlarının nümerik ortalamaları ayrı ayrı hesaplandı (Tablo 12, 13 ve 14).

1. NEKROZ ; Hiçbir ratta nekroza rastlanmadı.

2. İNFLAMASYON ; Günlük sistemik halofuginon uygulanan A grubunda 3 denekte şiddetli, 2 denekte orta, 3 denekte hafif derecede inflamasyon izlendi, kalan 6 denekte belirgin inflamasyon izlenmedi. İnflamatuvar hücreler 2 denekte plazmositlerden, diğer deneklerde plazmosit ve lenfosit baskın mononükleer inflamatuvar hücrelerden oluşmaktaydı.

Tablo 12. A grubunun inflamasyon sonuçları (PL: Plazmosit, L: Lenfosit).

	Ratlar													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inflamatuvar Hücre Sayısı	160	155	25	40	25	55	140	65	35	120	170	30	45	80
Inflamatuvar Hücre Tipi	PL	PL-L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L	PL	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L
Inflamasyon Skoru	3	3	0	0	0	1	2	1	0	2	3	0	0	1

Topikal halofuginon uygulanan B grubunda 2 denekte orta derecede, 4 denekte hafif derecede plazmosit ve lenfosit baskın inflamasyon görüldü. Diğer 2 denekte ise hiç inflamasyon görülmedi.

Tablo 13. B grubunun inflamasyon sonuçları (PL:Plazmosit, L:lenfosit).

	Ratlar							
	1	2	3	4	5	6	7	8
İnflamatuvar Hücre Sayısı	60	25	130	60	35	135	70	55
İnflamatuvar Hücre Tipi	PL/L	L/PL	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L
İnflamasyon Skoru	1	0	2	1	0	2	1	1

Subglottik travma sonrası halofuginon uygulanmayan C grubunda, orta ve şiddetli derecede inflamasyon izlenmedi, 2 denekte hafif derecede inflamasyon izlendi (Resim 17). Bunlardan birinde inflamatuvar hücreler plazmosit ve lenfositlerden, diğerinde ise sadece lenfositlerden oluşmaktaydı. Kalan deneklerde inflamasyon gözlenmedi.

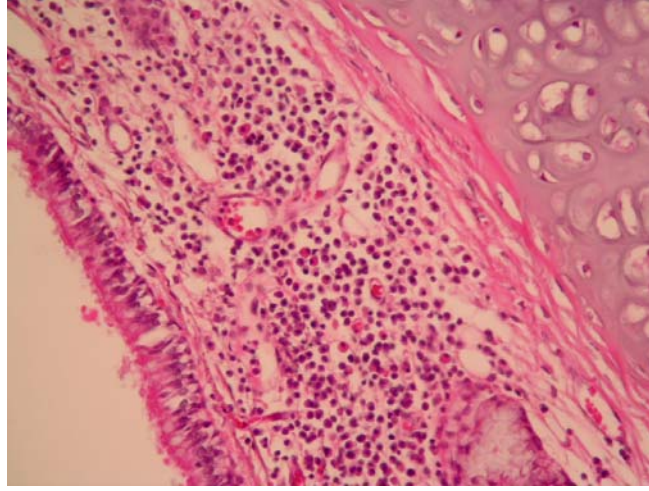
Tablo 14. C grubunun inflamasyon sonuçları (PL: Plazmosit, L:lenfosit).

	Ratlar					
	1	2	3	4	5	6
İnflamatuvar Hücre Sayısı	25	55	20	45	65	40
İnflamatuvar Hücre Tipi	PL/L	L	PL/L	PL/L	PL/L	PL/L
İnflamasyon Skoru	0	1	0	0	1	0

Grupların kendi içlerinde ve birbiriyle karşılaştırılması sonucunda inflamasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 15).

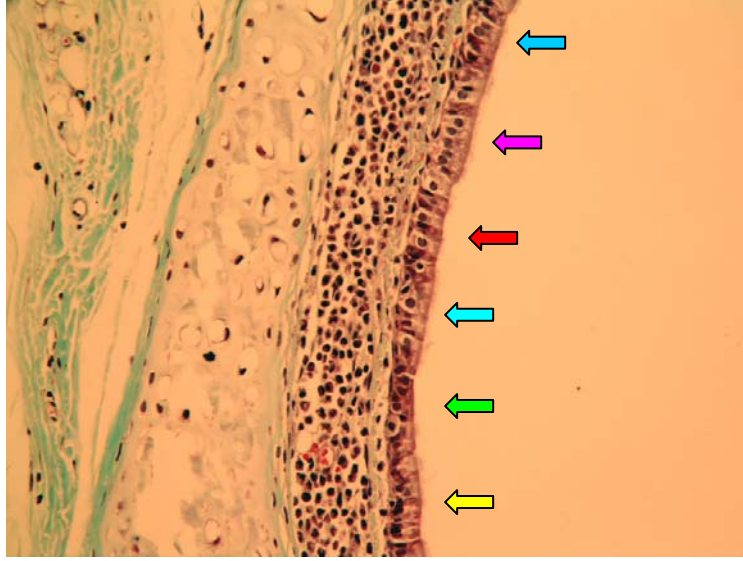
Tablo 15. İnflamasyon skorları

İnflamasyon Skoru	GRUPLAR			TOPLAM
	A	B	C	
0	6	2	4	12
1	3	4	2	9
2	2	2	-	4
3	3	-	-	3
TOPLAM	14	8	6	28



Resim 17. Ratın subglottik bölgesindeki hafif inflamasyon (HE, x40).

3. EPİTELİZASYON; Epitelizasyon ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Deneklerin hepsinde hasarlı bölgelerde mukoza epitelinin rejenere olduğu görüldü. A ve C grubunda birer denekte, B grubunda ise 3 denekte kolumnar epitelde fokal silya kaybı izlendi. Hiçbir denekte skuamöz metaplazi gözlenmedi (Resim 18).



Resim 18. Topikal halofuginon uygulanan B grubundan bir ratın subglottik bölgesinde 30. gündeki tamamlanmış epitelizasyonun görünümü (renkli oklar) (HE, x10).

V. TARTIŞMA

Subglottik stenoz, doğumsal veya edinsel olarak meydana gelen sikatrize bağlı olarak solunum pasajının tam veya parsiyel tıkanmasıdır. Doğumsalların sebebi, gestasyonel yaşamın üçüncü ayında normal epitelyal birleşmenin olmamasıdır (36). Edinsellerin sebepleri ise travma, kronik enfeksiyonlar ve larenksin neoplastik hastalıkları gibi nedenler olup en önemli sebep travmadır (Tablo 1). Travmalar eksternal veya internal olabilirler. Eksternal olanlar künt ve/veya delici larengeal yaralanmalar, yüksek trakeotomi; internal olanlar uzun süreli entübasyon, cerrahi girişimlere bağlı iyatrojenik lezyonlar, termal veya kimyasal sebeplerle meydana gelen endotrakeal yanıklardır (36, 39). Baş ve boyun cerrahlarının en sık uyguladıkları işlemlerden biri olan trakeotomiden sonra enfeksiyon gelişimi de postoperatif uzun dönemde granülasyon dokusu gelişimi ve trakeal stenozis gibi komplikasyonların gelişimi riskini artırır (16, 26).

Mukoza, basınç nekrozuna maruz kaldığında inflamatuvar değişiklikler başlar. Küçük ülserasyonlar perikondriyumu tahriş edebilir, bu da perikondrite, kondrite ve kırırdağın nekrozuna sebep olabilir. Tahriş devam ederken iyileşme mekanizmaları da devreye girer, granülasyon ve fibroz ile doku proliferasyonu meydana gelir (23). Fibroblastlar kontraksiyona uğrayarak lümenin daralmasına yol açar (14). Yara iyileşmesinin bir parçası olan fibroblast kontraksiyonu önlendiği takdirde stenoz da önlenir (23).

Larengotrakeal stenozun insidansı son yıllarda artmıştır. Bu artma reanimasyon tekniklerindeki gelişmeye bağlı olarak prematürelde ve travmalı hastalarda yaşam süresinin uzamasına bağlıdır (23).

Doğru tanı ve tedaviye rağmen larenks ve trakea stenozunun başarılı tedavisi oldukça zordur. Tedavinin amacı hava yolunu açık tutmak, aspirasyonu önlemek ve konuşma yeteneğini sağlamaktır (77).

Subglottik stenozun tedavisinde uygulanan yöntemler ikiye ayrılır. Birinci grupta stentli veya stentsiz olarak stenotik kısmın forsepsle, lazerle, kriyocerrahi ile veya elektrokoterle endoskopik yoldan temizlenmesi; ikinci grupta açık cerrahi yöntemlerle stenotik segmentin rekonstrüksiyonu vardır (11). Tedavinin açık cerrahi ya da endoskopik olması; yaşa, genel sağlık durumuna, stenozun sebebine, yerleşimine, derecesine, uzunluğuna ve önceki tedavi yöntemine bağlıdır (77). Açık teknik rekonstrüktif yöntemler arasında iki seanslı larengotrakeal fissür ile cilt grefti, *rotary door* strep kas flebi ile rekonstrüksiyon, ön-arka krikoid split ve kıkırdak interpozisyon greftleri ile uç uca anastomozlar sayılabilir (89).

Son 20 yılda larenks ve trakea lezyonlarının endoskopik tedavisinde mikrolarengoskopi ve endolarengal karbondioksit lazer cerrahisi gibi ileri teknikler geliştirilmiştir (44). Bütün bu endoskopik tekniklerdeki gelişmelere rağmen halen skar dokusuna bağlı restenoza rastlanılmaktadır (77). Larenks ve trakea stenozlarının endoskopik tedavisinde Strong ve ark. %50 (88), Andrews %66 (2), Simpson ve ark. %44 (84), Carruth %50 (10), Shapshay %40 (82), Ossoff ve ark. %57 (66) oranında başarı elde etmişlerdir. Çalışmalarda farklılıklar olsa da başarısızlığın temel sebebi restenoz ve skar gelişimine bağlanmıştır (77).

Strong (87) ve Simpson (84) CO₂ lazer vaporizasyonundan sonra genellikle stent kullanmış, Healy köpeklerdeki çalışmaları sonucunda stent kullanımının epitelizasyon oluşuncaya kadar gerekli olduğunu tespit etmiştir (37). Özkarakaş ve ark. 18 yetişkin sağlıklı tavşanın trakealarında polivinilklorid (PVC) ve silkolateks endotrakeal tüplerden hazırlanmış iki farklı stentin etkisini karşılaştırmışlar, PVC'nin

hafif inflamatuvar reaksiyona sebep olmasına rağmen her iki materyalin trakeal mukozada minimal geri dönüşebilir travmatik etkilere sahip olsa da larengeal stent olarak kullanılabilecekleri sonucuna varmışlardır (68). Ay ve ark. benign trakeal stenozis ve trakeomalazi tedavisinde *nitinol stentler* kullanmışlar, fakat yerleştirilmeleri kolay olsa bile stente bağlı granülasyon dokusunun gelişebileceğini ve stentte kayma gibi istenmeyen sonuçların ortaya çıkabileceğini belirtmişlerdir (6). Schmidt ve ark. ise skarın daha küçük ve segmental çıkarılması ile stent kullanımının ve skarın tekrar oluşmasının engellenebileceğini göstermişlerdir (79).

Çevresel skar ve kontraktür, trakeomalazi ve kıkırdak desteğinin kaybolması, skarın bir santimetreden uzun olması başarısızlığa yol açar (84). McGovern ve ark. entübasyondan sonra trakeotomi yapılırsa larengeal komplikasyonların 2 kat arttığını göstermişlerdir (52). Endoskopik tedavi daha çok normal kıkırdak destekli ağı yapıda kısa segmentli stenozlarda kullanılır. Schweinfurth, 20 olguluk serisinde endoskopik tedaviyi kıkırdak tutulumu olan hastalarda başarıyla uygulamış, ancak başarının 3 santimetreden daha uzun olan ve krikoid kıkırdağın tutulduğu vakalarda çok kısıtlı olduğunu tespit etmiştir (80).

Sasaki ve ark. solunum yolundaki skar miktarının; iyileşme için gerekli sürenin uzunluğuna ve enfeksiyona bağlı olduğunu, skar dokusunun enfeksiyonla, enfeksiyon riskinin de trakeotomi ile arttığını gözlemlemişlerdir (78). Larengotrakeoplastiden sonra T-tüp takılan 12 hastada antibiyotik başlanmış, 14 ay takip edilen hastalarda granülasyon miktarında belirgin bir azalma gözlenmiştir (8).

Maddalozzo ve Holinger, 9'u doğumsal, 10'u edinsel, biri de hem doğumsal, hem de edinsel subglottik stenozlu 20 çocuğa, açık cerrahi ile kostal kıkırdak yerleştirmişler, 16'sını dekanüle ettiklerini ve endoskopik yöntemlerin başarısız

olduğu durumlarda larengotrakeal rekonstrüksiyonun iyi sonuçlar veren bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (46).

Larengotrakeal rekonstrüksiyon sonrası yara iyileşmesini hızlandırmak ve daha iyi sonuçlar almak için cerrahi tekniklerle günümüzde sık kullanım alanı bulan hiperbarik oksijen tedavisi de kombine edilmiştir. Güngör ve ark., 32 tavşanı kontrol ve çalışma olarak iki eşit grubu bölmüşler, tavşanların 6'şar trakeal halkasının ön yarısını rezeke edip defekti aurikuler greftlerle tamir etmişler ve tavşanlara bir hafta boyunca günde 2 kez hiperbarik oksijen tedavisi uygulamışlardır. Sonuçta çalışma grubunda inflamasyon, fibrozis ve nekrozun kontrol grubuna göre belirgin olarak az olduğunu, neovaskülarizasyon, skar maturasyonu ve neokondrifikasyonun ise kontrol grubuna göre belirgin olarak daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir (29).

Larengotrakeal cerrahide erken komplikasyon olarak yara enfeksiyonları gelişebilir. Bu orofaringeal sekresyonların kontaminasyonu ile oluşur. Ama boyun yumuşak dokularının dolaşımı iyi olduğundan bu komplikasyon nadirdir. Boyunda yara enfeksiyonu olursa açık drenajla iyileşmeye bırakılır. Böyle temiz-kontamine yaralarda, peroperatuvar olarak intravenöz antibiyoterapi verilmeli, postoperatif olarak 6 saat arayla iki doz daha uygulanmalıdır. Mümkünse enfekte dokudan kültür-antibiyoqram yapılmalıdır. En sık tespit edilen mikroorganizma da stafilokoklardır (20). Çalışmamızda hiçbir ratta klinik enfeksiyon bulgusu tespit edilmedi. Bunda dikkatli cerrahi tekniğin yanı sıra peroperatuvar antibiyotik uygulamasının ve asepti-antisepsiye dikkat edilmesinin önemli rolü olduğu düşüncesindeyiz.

Eliashar ve ark. deneysel hasar verilen olgularda 2 gün sonra başlanan sekresyon aspirasyonunun larengotrakeal stenoz oluşumunu geciktirdiğini tespit etmişler, akut hava yolu hasarlarında tedavi olarak kullanılabileceği için bu bulgunun önemine dikkat çekmişlerdir (23).

T-tüp uygulanmasından önce, stenoza neden olan granülasyon dokularının endoskopik yolla temizlenmesi ve bölgeye steroid enjeksiyonu ile granülasyon dokusu nüksüne engel olunabilir (53). Ayrıca stenoz trakeotominin yukarısında ise, hasta kısa boyunlu ve obez ise T-tüp yerleştirilmesi oldukça zor ve zaman alıcı bir işlem olabilir (7).

Gürsan ve Sütbeyaz, birine eksternal, beşine endotrakeal yolla skar rekonstrüksiyonu yaptıkları altı olguya trakeal T-tüp yerleştirmişler, takip edilemeyen bir olgu hariç kalan 5'inde T-tüpü 5-18 ay sonra çıkarmışlar, 1,5-2 yıl sonra yaptıkları kontrollerde olgularının solunum problemleri olmadan yaşamlarını sürdürdüklerini tespit etmişlerdir (30).

Silikon Montgomery T-tüpü doku reaksiyonuna sebep olmaz. Hem stent, hem de trakeotomi tüpü olarak kullanılır. İntraluminal bölümü stenotik larenks ve trakeayı destekleyecek yapıdadır. Mukus ve kabuklar silikon materyaline yapışmazlar. Çoğu zaman yumuşak T-tüp yerinde bırakılır, böylece respirasyon ve fonasyon sağlanır (54).

CO₂ lazer, subglottik ve trakeal stenozun tedavisinde önemli rol oynar, fakat stenoz bir santimetreden uzun olduğu zaman genellikle intraluminal stent gereklidir (54). Whitehead ve ark. 2,5 cm'den uzun subglottik stenozu olan 2 hastada CO₂ lazer uygulamasının ardından Montgomery T-tüpü yerleştirmişler, her iki olguda da çok iyi konuşma ve hava yolu açıklığı elde etmişlerdir (90).

Konservatif endoskopik girişimler sonrasında ise glotto-subglottik hava pasajındaki açıklığın restenozuna engel olmak üzere birçok (antibiyotik, steroid, penisillamin ve N-asetilsistein gibi) medikal ajan denenmiştir (23, 89). Pillsbury ve Peerless ise değişik bir konservatif yaklaşım olarak, subglottik stenozlu 12 olguda skar dokusunu mikrolarengoskopik yolla temizledikten sonra, iki ay ses istirahati, bir

ay boyunca günde 4 kez beklametazon inhalasyonu ve antibiyotik tedavisi ile ses kalitesinde bozulmaya yol açmadan, rahat bir solunum yolu elde ettiklerini ifade etmişlerdir (71).

Cerrahi teknikler ne olursa olsun mukozaya hasar verilmektedir. Bu da fibroblast proliferasyonu ve kollajen yapımının ardından skar oluşumuna sebep olmaktadır (77). Yara iyileşmesinin düzenlenmesi skar oluşumunu önleyebilir ve böylece cerrahi tedavinin başarısını artırarak müdahale sayısı en aza indirilebilir. Beta aminopropionitrilin (BAPN) ve 5-Florourasilin kollajen çapraz bağlanmayı engelleyeceği ve böylece skar formasyonunu en aza indirebileceği gösterilmiştir (21, 41).

Doolin ve ark. hayvan çalışmalarında kontrol grubunun yanında oral dekadron (2 mg/gün) ve oral BAPN (40 mg/gün) kullandıkları grupları kollajen yapımı bakımından karşılaştırmışlar, kollajen yapımının BAPN grubunda baskılandığı gözlenmiş, steroid kullanılan grupla kontrol grubu arasında fark gözlememişlerdir (21).

Yara iyileşmesinin en önemli faktörlerinden biri olan granülasyon dokusu, skar ve fibroza yol açmaktadır (8, 78). Ayrıca granülasyon dokusu kanamaya da neden olabilir (8, 47, 75). Tekrarlayan travmalar, tüp veya stentin yol açtığı kronik enfeksiyonlar, stente karşı gelişen yabancı cisim reaksiyonu, kontaminasyon ve gastroözefageal reflü granülasyon dokusuna neden olur (8, 78).

Ingrams ve ark. tavşanlarda subglottik bölgeye dairevi hasar vermişler, ancak ölümcül trakeal ödemle karşılaşmışlardır (40). Bu nedenle çalışmamızda hem ölümcül ödemi önlemek, hem de hasarlı ve hasarsız bölgelerin fibrozis indekslerini karşılaştırabilmek için subglottik bölgenin sadece arka yarısına hasar verildi.

Antimikrobiyal tedavi, steroidler, antireflü tedavi, tüpsüz trakeotomi, yumuşak ve esnek stentlerin kullanılması ile granülasyon dokusu azaltılabilir. Bu tedavilere rağmen granülasyon dokusu oluşumu larengotrakeal stenoz açısından yüksek riskli hastalarda problem olmaktadır (23).

Steroidler; inflamasyonu, fibroblast çoğalmasını, kollajen sentezini ve kollajenazı inhibe ederek yara iyileşmesini yavaşlatırlar (22, 33). Bu nedenle KBB hekimlerinin bir kısmı subglottik stenozun tedavisinde sadece intralezyonel steroidleri kullanır ve bir kısmı da genişletme cerrahisi süresince intralezyonel steroid enjeksiyonunu tavsiye ederler (9, 65). Bununla beraber, pratikte steroidler larengotrakeal stenozu engellemede veya küçültmede çok sınırlı bir etkiye sahiptirler (9, 62).

Cıncık ve ark., 32 tavşanın her birinin subglottik bölgelerine standardize travma uyguladıktan sonra tedavi uygulanan ve uygulanmayan olarak iki eşit gruba ayırmışlar, daha sonra her birini 4'er tavşan içeren alt gruplara ayırarak tavşanlara topikal 0,4 mg/ml konsantrasyonda mitomisin C veya paratrakeal 5 mg 5-florourasil/triamsinolon (5-FU/TA) enjeksiyonu uygulamışlar, tavşanları 2. hafta ve 6. haftada sakrifiye ederek larenkslerini çıkarmışlardır. Çıkarılan spesimenlerin histopatolojik olarak fibrozis, epitelizasyon ve inflamasyon açısından incelenmesi sonucunda hem mitomisin C'nin, hem de 5-Florourasil/Triamsinolon asetonid kombinasyonunun subglottik travma sonrasında fibrozis ve skar dokusu oluşumunu azalttığını ve iki ilacın akut hasara uğramış larenks üzerindeki etkileri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkları olmadığını tespit etmişlerdir (13).

Antifibrotik olarak spesifik bir Tip-I kollajen sentez inhibitörünün pratikte kullanım alanı oldukça geniş olabilir, çünkü herhangi bir dokunun sellüler fonksiyonundaki bozukluk aşırı kollajen depolanmasına neden olabilir. Tip-I kollajen

sentezini transkripsiyon seviyesinde inhibe etmek, bazı ilaçların hedeflediği gibi kollajen birikimi sonucunda oluşan tabloyu düzeltmeye çalışmaktan daha etkili olabilir. Erişkinlerde kollajen döngüsü oldukça yavaştır ve genelde çok düşük seviyede kollajen Tip-I alfa geni ekspresyon edilir. Fakat hasarlı bölgelerde bu gen aşırı aktive olur ve aşırı Tip-I kollajen sentezlenir. Sistemik olarak uygulanacak olan Tip-I kollajen sentez inhibitörü bir ajan böylece hedeflenen dokuda etki gösterecektir (73).

Halofuginonun çeşitli hayvan modellerinde ve insan hastalıklarında kollajen sentezini ve kollajen Tip-I gen ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu etkisini "*transforming growth factor beta*"nın etkisini inhibe ederek gösterir. Diğer tip kollajenlerin sentezini ise engellemez (1, 51, 58, 59, 61, 74). Kollajen Tip-I 'in fibrozisin ana komponenti olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle selektif bir antifibrotik etki için kollajenin bu alt grubunun baskılanması gereklidir. Halofuginon bu özelliğiyle normal yara iyileşmesini etkilemezken fibrozis gelişimini selektif olarak engellemektedir (73).

Arbell ve ark., kostik hasar sonrası özefageal stenoz gelişiminde halofuginonun etkinliğini araştırmak için yaptıkları 11 ratlık çalışmada, ratların izole özefagus segmentlerine %25 NaOH enjekte ederek kostik hasar oluşturmuşlar, çalışma grubuna (n=7) preoperatif ve postoperatif dönemde düzenli olarak üçer gün boyunca yem içerisinde oral halofuginon, kontrol grubuna (n=4) ise sadece normal yem vermişlerdir. Sonuçları üst gastrointestinal sistemin seri görüntülemesi ve histopatolojik incelemeyle değerlendirmişler, çalışma grubunda özefageal pasajı %73 oranında açık bulurlarken kontrol grubunda bu oranın sadece %11 olduğunu tespit etmişlerdir. Histopatolojik incelemede çalışma grubunda belirgin olarak az oranda skar oluşumu gözlenmiştir. Yirminci günde çalışma grubunun %86'sı yaşamış kontrol grubunun hepsi ölmüştür. Sonuçta halofuginonun özefagus pasaj açıklığını

koruduğunu, özefageal duvar kalınlığını kontrol grubuna göre azalttığını ve sűrviyi uzattığını tespit etmişlerdir (3).

Özçelik ve ark., kostik hasar sonrası özefageal stenoz geliřiminde halofuginonun etkinliđini arařtırmak için yaptıkları 60 ratlık çalıřmada ratları eřit sayıda dűrt gruba ayırmıřlardır. Grup 1 hiçbir iřlem uygulanmayan kontrol grubunu, Grup 2 sadece laparotomi yapılan grubu, Grup 3 tedavi verilmeyen kostik hasar grubunu ve Grup 4 halofuginonla tedavi edilen grubu oluřturmuřtur. İzole özefageal segmentlerine %50 NaOH'i 3 dakika boyunca uygulayarak stenoz oluřturmuřlardır. Dűrdűncű gruba 21 gűn boyunca intraperitoneal 5 mg/kg halofuginon uygulayıp 21. gűnde tűm ratları sakrifiye etmiřlerdir. Çıkarılan özefagus spesimenleri stenozis, hidroproksilin seviyeleri, lűmen çapı, duvar kalınlıđı açasından incelenmiř, sonuçta halofuginonun özefageal stenoz oluřumunu istatikselsel olarak anlamlı bir řekilde azalttıđını tespit etmiřlerdir (67).

Olbrich ve ark., silikon implantların etrafında kollajen depozitlerini önlemede halofuginonun etkinliđini arařtırmak amacıyla yaptıkları çalıřmada 19 ratı 4 ayrı gruba bűlerek hepsinin sırtlarına silikon implant yerleřtirmiřler, 1. gruba 8 hafta boyunca oral halofuginon verilirken 2. gruba çalıřmanın ilk yarısı boyunca, 3. gruba ikinci yarısı boyunca oral halofuginon verilmiř, 4. gruba hiç ilaç vermemiřlerdir. Sonuçta trikrom boyalı histolojik kesitlerin dijital gűrűntűlerinden yaptıkları űlçűmler sonucunda halofuginonun kollajen birikimini belirgin bir biçimde azalttıđını tespit etmiřlerdir (64).

Nyska ve ark., halofuginonun Tip-I kollajen sentezini inhibe edici etkisini test etmek için 12 tavuđun derin fleksűr tendonuna hasar verip sűtűre etmiřler ve operasyon bűlgesine topikal olarak halofuginon uygulamıřlardır. Diđer gruba hasar verilip halofuginon uygulanmayarak kontrol grubu olarak belirlenmiř ve tedavinin

etkinliğini opere ve intakt tendonları 3 hafta sonra histopatolojik olarak inceleyerek değerlendirmişlerdir. Sonuçta halofuginon uygulanan tendonlarda fibröz peritendinöz yapışıklıkların gelişmediğini tespit etmişlerdir. Halofuginon uygulanmayan tendonlara oranla halofuginon uygulanan tendonların kollajen içeriğinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiş, halofuginon uygulanan tendonları tendon kılıflarından ayırmak için ilaç uygulanmayan tendonlara oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde az kuvvet gerektiği bulunmuştur. Halofuginonun iyileşen dokunun sellülaritesine bir etkisi olmadığını da tespit etmişlerdir (63).

Nagler ve ark., tavşan kulaklarında yaptıkları ezilme yaralanması çalışmalarında hasar sonrası arteryel intimal hiperplaziyi incelemişler ve hasar sonrası topikal olarak uygulandığında halofuginonun arteryel intimal hiperplaziyi %50 oranında azalttığını bulmuşlardır. Endoteli etkilemeyip düz kas hücrelerini etkilemesi Tip-I kollajen ve ekstrasellüler matriks sentezini ve hasar sonrası arteryel intimal hiperplaziyi azaltması nedeniyle halofuginonun tek başına ya da başka bir ajanla beraber arteryel stenoz ve hızlanmış aterosklerozun önlenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (56).

Çalışmamızda, halofuginonun antifibrotik etkisinin, subglottik travma sonrası stenoz gelişiminin engellenmesinde etkili olabileceğini düşünerek ratların trakealarının arka bölümlerine deneysel subglottik travma uyguladık. Travma uyguladığımız ratların bir bölümüne 30 gün boyunca intraperitoneal halofuginon uyguladık, bir bölümüne sadece bir kez topikal halofuginon uyguladık. Bir bölümüne ise hiç ilaç uygulamadık. Ratları 30. günde sakrifiye ettikten sonra larenkslerini çıkararak spesimenleri fibrozis açısından histopatolojik olarak inceledik. Sonuçları istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde, halofuginon uygulanan ratlarda uygulanmayanlara oranla daha az fibrozis geliştiğini tespit ettik. Gruplar arasındaki

bu fark, istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). Aynı şekilde topikal halofuginon uygulanan ratlarda hiç ilaç verilmeyen ratlara oranla daha az fibrozis geliştiğini tespit ettik. Bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). Halofuginonu sistemik ve topikal olarak uyguladığımız gruplar arasında ise fibrozis açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0,01$) bulamadık.

Hava yollarında respiratuvar epitelin korunması enfeksiyon riskinin azalması ve diğer fonksiyonların devamı bakımından önemlidir. Çalışmamızda trakeal hasar mekanik olarak oluşturuldu, reepitelizasyon ışık mikroskopunda değerlendirildi ve ratların hepsinde respiratuvar epitelin rejenere olduğu gözlemlendi. Rejenere olan epitel segmentlerinin hiçbir bölümünde metaplazi tespit edilmedi.

Silya kaybının topikal uygulama yapılan grupta diğer gruplara göre daha fazla görülmesini, yüksek ilaç konsantrasyonu nedeniyle silya gelişiminin baskılanmasından kaynaklandığı yönünde değerlendirdik.

İnflamasyon açısından değerlendirildiğinde tüm gruplarda plazmosit ağırlıklı olarak plazmosit ve lenfositlerden oluşan inflamatuvar hücreler tespit edildi. İnflamatuvar skorlar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilmedi ($p > 0,05$).

Çalışmamızda halofuginon uygulanan her iki çalışma grubu da genel durum düşüklüğü, iştahsızlık, tüy dökme gibi kriterler ile takip edildi, hiçbir ratta bu bulgulara rastlanılmadı.

VI. SONUÇ

Larenks stenozu, tedavisi zor bir hastalıktır. Değişik cerrahi teknikler, ilaç tedavileri ve endoskopik yöntemler önerilmesine rağmen hiçbiri tek başına tam başarı sağlayamamaktadır. Başarısızlığın esas nedeni de skar gelişmesi ve skara bağlı restenozdur. Bu nedenle son yıllarda skar gelişimini önleyici ilaç ve teknikler üzerinde durulmaktadır.

Çalışmamızda ratların subglottik bölgelerinin arka yarımına hasar oluşturuldu, sistemik ve topikal halofuginon uygulamasının hasar bölgesinde skar ve stenozu neden olan fibrozisi önlemedeki etkinlikleri araştırıldı.

Sonuç olarak sistemik veya topikal halofuginon uygulamasının ;

1. Subglottik travmada fibrozis ve skar oluşumunu anlamlı olarak engellediği, solunum yolu epitelinin rejenerasyonunu bozmadığı,
2. İnflamasyon üzerine belirgin etkisinin olmadığı, subglottik bölgede nekroza yol açmadığı,
3. Subglottik hasarlarda, fibrozise bağlı stenoz oluşumunu azaltmak ya da önlemek için halofuginonun kullanılabileceği ,
4. Fibrozis oluşumunu engellemede her iki uygulamanın birbirine üstünlüğünün olmadığı, ancak kullanım koşulları göz önüne alındığında topikal uygulamanın sistemik uygulamadan daha pratik olduğu sonucuna varıldı.

Ancak bu maddenin sistemik ve topikal uygulamasının uzun dönem etkilerini, potansiyel sistemik toksisitesinin olup olmadığını ve fibrozis gelişmiş olgulardaki etkinliklerini, insanlardaki etkilerinin ne olacağını araştırarak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

VII. ÖZET

Larengotrakeal stenozlar Kulak Burun Boğaz hekimlerinin meslek yaşantıları boyunca karşılaşılabilecekleri çözümü en güç hastalık gruplarından biridir. Tedavisinde birçok yöntem denenmesine karşılık halen tedavi yöntemi üzerinde görüş birliğine varılamamıştır. Antifibrotik etkisi kanıtlanmış olan Tip I kollajen sentez inhibitörü olan halofuginon, subglottik travma sonrası stenoz gelişimini önlemede alternatif çözüm sunan ve ümit veren yeni bir etken madde olabilir.

Çalışmamızda sistemik ve topikal halofuginon uygulamasının larengotrakeal hasarlarda meydana gelen fibrozisi önlemedeki etkinlikleri değerlendirildi. Otuz rat çalışma ve kontrol grubu olarak iki ana gruba ayrıldı. Çalışma grubu subglottik hasar sonrası sistemik halofuginon uygulanan A grubu (n=14) ve topikal halofuginon uygulanan B grubu (n=8) olarak ikiye ayrıldı, kontrol grubu da subglottik hasar oluşturulup ilaç verilmeyen C grubu (n=6) ve hiçbir işlem uygulanmayan D grubu (n=2) olmak üzere ikiye ayrıldı. Tüm ratlar genel anestezi altında ameliyat edildi. A, B ve C grubundaki tüm ratların subglottik bölgeleri mukoza, submukoza ve krikoid kıkırdak perikondriumunu içerecek şekilde travmatize edildi. A grubuna 30 gün boyunca 0,1 mg/kg/gün olacak şekilde intraperitoneal halofuginon uygulandı, B grubuna ise travma uygulanması anında topikal olarak 5 dakika süreyle pamuğa emdirilmiş 30 mg/dl konsantrasyonda halofuginon solusyonu uygulandı. C grubuna posttravmatik ilaç uygulanmadı. D grubuna ise hiçbir işlem uygulanmadı.

Tüm ratlar ameliyat sonrası 30. günde genel anestezi altında sakrifiye edildi. Larenksleri çıkarıldı, ışık mikroskopisi ile epitelizasyon, inflamasyon ve nekroz açısından aynı patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi. Fibroz, bilgisayar ortamında ImageJ 1,36b görüntüleme programı ile ölçüldü. Bulguların istatistiksel analizleri için SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) for Windows 11.0 programı kullanıldı.

Halofuginon uygulanan bütün ratlarda subglottik bölgede respiratuvar reepitelizasyon tam olarak tespit edildi ve hiçbir ratta epitel metaplazisi saptanmadı.

Sistemik ve topikal halofuginon uygulanan çalışma grubu ile kontrol grubu ratların subglottik bölgelerindeki inflamasyon skorları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Çalışmamızda hiçbir ratta subglottik bölgede nekroz gözlenmedi.

Morfometrik ölçümlerde sistemik ve topikal halofuginon uygulanan A ve B grupları ile halofuginon uygulanmayan C grubunun subglottik bölgelerindeki fibrozis indeks ortalamaları arasında ileri derecede anlamlı fark saptandı ($p<0,01$). A ve B grupları arasında ise anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Çalışmamızda larengotrakeal stenoza yol açan fibrozis oluşumunu azaltmada halofuginonun sistemik veya topikal uygulamasının eşit derecede etkili oldukları sonucuna varıldı.

VIII. SUMMARY

Efficiency of systemic and topical halofuginone application in preventing fibrosis after subglottic trauma

Laryngeotracheal stenosis is one of the most difficult to treat disease groups encountered by otolaryngologists. Although various methods have been tried, no consensus has been reached on treatment. Halofuginone, an inhibitor of Type I collagen synthesis with proved antifibrotic effect, might be a hopeful alternative agent in preventing stenosis following subglottic trauma.

Effectiveness of systemic and topical application of halofuginone in preventing fibrosis following laryngotracheal injury was evaluated in our study. Subglottic trauma was induced by traumatising the mucosa, submucosa and perichondrium of subglottic regions of rats under general anesthesia. Thirty rats were divided into two main groups as study and control groups. Study group was divided into two subgroups; in Group A (n=14), 0,1 mg/kg halofuginone was intraperitoneally applied for 30 days following subglottic trauma and in Group B (n=8), A cottonoid soaked in 30 mg/dl halofuginone solution was topically applied for 5 minutes following subglottic trauma. Control group was divided into two subgroups; in Group C (n=6), no drug was applied following subglottic trauma and no procedure was applied to Group D (n=2).

All rats were sacrificed on the 30th postoperative day. Their larynx were excised and evaluated by the same pathologist under light microscope for epithelisation, inflammation and necrosis. Fibrosis was measured digitally by ImageJ 1,36b imaging programme. SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.0 was used for statistical analysis.

Complete respiratory repithelisation was observed in all halofuginone applied rats as no epithelium metaplasia was seen in any rats.

No significant difference was found between the subglottical inflammation scores of systemically and topically halofuginone applied study groups and the control group ($p>0,05$). Necrosis in the subglottic area was not observed in any rats.

There was extremely significant difference between the subglottical fibrosis index scores of study and control groups ($p<0,01$). No significant difference was found between groups A and B ($p>0,05$).

In conclusion; systemic and topical application of halofuginone is equally effective in preventing fibrosis following subglottic trauma. But further studies are required to evaluate the long term results of systemic and topical application of halofuginone, its potential systemic toxicity and effects on mature fibrosis.

IX. KAYNAKLAR

1. Abramovitch, R., Dafni, H., Neeman, M.: Inhibition of Neovascularization and Tumor Growth, and Facilitation of Wound Repair, by Halofuginone, an Inhibitor of Collagen Type I Synthesis. *Neoplasia*,1: 1–9, 1999.
2. Andrews, A.H., Horowitz, S.L.: Bronchoscopic CO₂ Laser Surgery. *Lasers. Surg. Med.*, 1(1): 35-45, 1980.
3. Arbell, D., Udassin, R., Koplewitz, BZ., Ohana, M., Genina, O., Pines, M., Nagler, A.: Prevention of Esophageal Strictures in a Caustic Burn Model Using Halofuginone, an Inhibitor of Collagen Type I Synthesis, *Laryngoscope*, 115: 1632–1635, 2005.
4. Arjmand, E.M.,Spector, J.G.: Airway Control and Laryngotracheal Stenosis, *Otorhinolaryngology*. (Eds) Ballenger J.J.,Snow J.B., Williams & Wilkins, Fifteenth Edition 1996, 27: 478-79.
5. Armstrong, W.B., Netterville, L.J.: Anatomy of the Larynx, Trachea and Bronchi. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, 28(4): 685-93, 1995.
6. Ay, I., Macandie, C., Irvine, B.W.: Nitinol Stents in the Treatment of Benign Proximal Tracheal Stenosis or Tracheomalasia. *J. Laryngol. Otol.*, 120 (1): 32-7, 2006 (abstract).
7. Benoit, J., Roberto, A.: A New Technique for T –tube Insertion in Tracheal Stenosis Located Above the Tracheal Stoma. *Ann. Thorac. Surg.*, 80: 2387-90, 2005.
8. Brown, M.T., Montgomery, W.W.: Microbiology of Tracheal Granulation Tissue Associated with Silicone Airway Prostheses. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 105: 624-7, 1996.
9. Campbell, B.H., Dennison, B.F., Durkin, G.E., Strigenz, M.A., Toohill, R.J.: Early and Late Dilatation for Acquired Subglottic Stenosis. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, 95(5): 566-73, 1986.
10. Carruth, J.A.: The Role of Lasers in Otolaryngology. *World. J. Surg.*, 7(6): 719-24, 1983.

11. Catlin, F, Smith, R.: Acquired Subglottic Stenosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 96: 489-492, 1987.
12. Choi, E.T., Callow, A.D., Sehgal, N.L., Brown, D.M., Ryan, U.S.: Halofuginone, A Specific Collagen Type I Inhibitor, Reduces Anastomotic Intimal Hyperplasia. *Arch. Surg.*,130(3): 257-61, 1995.
13. Cincik, H., Gungor, A., Cakmak ,A., Omeroglu, A., Poyrazoglu, E., Yildirim, S., Cekin, E., Candan, H.: The Effects of Mitomycin C and 5-Fluorouracil / triamcinolone on Fibrosis/scar Tissue Formation Secondary to Subglottic Trauma. *Am. J. Otolaryngol.*, 26: 45–50, 2005.
14. Clark, R.A.F., Henson, P.M.: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York, Plenum Press 1988, 301-477.
15. Cotton, R.T., Management of Subglottic Stenosis in Infancy and Childhood: Review of a Consecutive Series of Cases Managed by Surgical Reconstruction. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 87: 649-57, 1978.
16. Cotton, R.T., Seid, A.B.: Management of the Extubation Problem in the Premature Child: Anterior Cricoid Split as an Alternative to Tracheotomy. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 89: 508-11, 1980.
17. Cotton, R.T., Evans, J.N.: Laryngotracheal Reconstruction in Children, Five-Year Follow-up. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 90: 516-20, 1981.
18. Cotton, R.T.: The Problem of Pediatric Laryngotracheal Stenosis: a Clinical and Experimental Study on the Efficacy of Autogenous Cartilaginous Grafts Placed Between the Vertically Divided Halves of the Posterior Lamina of the Cricoid Cartilage. *Laryngoscope*, 101: 1-34, 1991.
19. Dahm, J.D., Sessions, D.G., Paniello, R.C., Harvey, J.: Primary Subglottic Cancer. *Laryngoscope*, 108: 741-746,1998.
20. DeMeester, S.R., Patterson, G.A.: Diagnosis and Management of Tracheal Neoplasms. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, (Eds) Cummings, C.W., Fredrickson, J.M., Harker, L.A., Krause, J.C., Schuller, D.E., Richardson, M.A., Mosby Year Book, 3rd Edition, St.Louis, Toronto Volume III 1998, 2395-2410.

21. Doolin, E.J., Strande, L.F., Tsuno, K., Santos, M.C.: Pharmacologic Inhibition of Collagen in an Experimental Model of Subglottic Stenosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 107: 275-9, 1998.
22. Dostal, G.H., Gamelli, R.L.: The Differential Effect of Corticosteroids on Wound Disruption Strength in Mice. *Arch. Surg.*, 125: 636-40, 1990.
23. Eliashar, R., Eliachar, I., Esclamado, R., Gramlich, T., Strome, M.: Can Topical Mitomycin Prevent Laryngotracheal Stenosis? *Laryngoscope*, 109: 1594-1600, 1999.
24. Eliashar, R., Ochana, M., Maly, B., Pines, M., Sichel, J.Y., Nagler, A.: Halofuginone Prevents Subglottic Stenosis in a Canine Model. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 115 (5): 382-386, 2006.
25. Elkin, M., Ariel, I., Miao, H.Q., Nagler, A., Pines, M., de-Groot, N., Hochberg, A., Vlodaysky, I.: Inhibition of Bladder Carcinoma Angiogenesis, Stromal Support, and Tumor Growth by Halofuginone. *Cancer Res.*, 59 (16): 4111-8, 1999.
26. Epstein, S.K., Late Complications of Tracheostomy. *Respir. Care.*, 50(4): 542–549, 2005.
27. Granot, I., Bartov, I., Plavnik, I., Wax, E., Hurwitz, S., Pines, M. Increased Skin Tearing in Broilers and Reduced Collagen Synthesis in Skin *in vivo* and *in vitro* in Response to the Coccidiostat Halofuginone. *Poult. Sci.*, 70 (7): 1559-63, 1991.
28. Grillo, H.C.: Primary Reconstruction of Airway After Resection of Subglottic Laryngeal and Upper Tracheal Stenosis. *Ann. Thorac. Surg.*, 33: 3-18, 1982.
29. Gungor, A., Poyrazoglu, E., Cincik, H., Sali, M., Candan, H.: The Effectiveness of Hyperbaric Oxygen Treatment in Tracheal Reconstruction With Auricular Cartilage Grafts. *Am. J. Otolaryngol.*, 24: 390-394, 2003.
30. Gürsan, Ö., Sütbeyaz, Y.: Subglottik Stenozda Trakeal T-tüp Uygulanması. *Turk. Arch. Otolaryngol.*, 30: 234-236, 1992.
31. Halevy, O., Nagler, A., Levi-Schaffer, F., Genina, O., Pines, M.: Inhibition of Collagen Type I Synthesis by Skin Fibroblasts of Graft Versus Host Disease

- and Scleroderma Patients: Effect of Halofuginone. *Biochem. Pharmacol.*, 52 (7): 1057-63,1996.
32. Ham, A.W., Cormack, D.H.: *The Respiratory System In Histology*, Philadelphia, J.B. Lippincott, 1979, 725.
 33. Hardman, J.G., Limbird, L.E.: *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York, McGraw-Hill 1996, 1465-81.
 34. Hately, W., Evison, G., Samuel, E.: The Pattern of Ossification in Laryngeal Cartilages: A Radiological Study. *Br. J. Radiol.*, 38: 585, 1965.
 35. Hawkins, D.B.: Hyaline Membrane Disease of the Neonate, Prolonged Intubation in Management: Effects on the Larynx. *Laryngoscope*, 88: 201-24, 1978.
 36. Hawkins, D.B.: Pathogenesis of Subglottic Stenosis from Endotracheal Intubation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 96: 116-7, 1987.
 37. Healy, G.B.: An Experimental Model for the Endoscopic Correction of Subglottic Stenosis with Clinical Applications. *Laryngoscope*, 92: 1103-15, 1982.
 38. Hommerich, K.W., Flemming, I.: Classification of Laryngotracheal Stenoses. *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 36: 100-6, 1974.
 39. Houghey, B.H.: Total Laryngectomy and Laryngopharyngectomy. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, (Eds) Cummings, C.W., Fredrickson, J.M., Harker, L.A., Krause, J.C., Schuller, D.E., Richardson, M.A., Mosby Year Book, 3rd Edition, St.Louis, Toronto Volume III 1998, 2229-2241.
 40. Ingrams, D.R., Sukin, S.W., Ashton, P, Valtonen, H.J., Pankratov, M.M., Shapshay, S.M.: Does Slow Release 5-fluorouracil and Triamcinolone Reduce Subglottic Stenosis? *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, 118(2);174-7, 1998.
 41. Ingrams, D.R., Ashton, P., Dhingra, J., Shah, R., Shapshay, S.M.: Slow-Release 5-fluorouracil and Triamcinolone Reduces Subglottic Stenosis in a Rabbit Model. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 109: 422-4, 2000.
 42. Jones, R., Bodnar, A., Roan, Y., Johnson, D.: Subglottic Stenosis in Newborn Intensive Care Unit Graduates. *Am. J. Dis. Child.*, 135: 367-8, 1981.

43. Kaya, S.: Larenks Hastalıkları. 1.Baskı, 1.Bölüm, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002, 56-7.
44. Kleinsasser, O.: Microlaryngoscopy and Endolaryngeal Microscopy. Philadelphia, WB Saunders, 1968, 2-8.
45. Levi-Schaffer, F., Nagler, A., Slavin, S., Knopov, V., Pines, M.: Inhibition of Collagen Synthesis and Changes in Skin Morphology in Murine Graft-versus-host Disease and Tight Skin Mice: Effect of Halofuginone. J. Invest. Dermatol., 106: 84,1996.
46. Maddalozzo, J., Holinger, L.: Laryngotracheal Reconstruction for Subglottic Stenosis in Children. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 96: 665-669, 1987.
47. Matt, B.H., Myer, C.N., Harrison, C.J., Reising, S.F., Cotton, R.T.: Tracheal Granulation Tissue: A Study of Bacteriology. Arch. Otol. Head. Neck. Surg., 117: 538-41, 1991.
48. McCaffrey, T.V.: Management of Subglottic Stenosis in the Adult. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 100: 90-4, 1991.
49. McCaffrey, T.V.: Classification of Laryngotracheal Stenosis. Laryngoscope, 102: 1335-40, 1992.
50. McCaffrey, T.V.: Management of Laryngotracheal Stenosis on the Basis of Site and Severity. Otolaryngol. Head Neck Surg., 109: 468-73, 1993.
51. McGaha, T.L., Phelps, R.G., Spiera, H., Bona, C. Halofuginone, an Inhibitor of Type-I Collagen Synthesis and Skin Sclerosis, Blocks Transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in Fibroblasts. J. Invest. Dermatol., 118: 461–470, 2002.
52. McGovern, F.H., Fitz-Hugh, G.S., Edgemon, L.J.: The Hazards of Endotracheal Intubation. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 80:556-64, 1971.
53. Montgomery, W.W.: Surgery of the Upper Respiratory System. Lea and Febiger, Philadelphia.,Vol. 2 1978, 373-435.
54. Montgomery, W.W., Montgomery, S.K.: Manual for Use of Montgomery Laryngeal, Tracheal and Esophageal Prostheses. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 150: 2-28, 1990.

55. Nagler, A., Firman, N., Feferman, R., Cotev, S., Pines, M., Shoshan, S. Reduction in Pulmonary Fibrosis in vivo by Halofuginone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154: 1082-6,1996.
56. Nagler, A., Miao, H.Q., Aingorn, H., Pines, M., Genina, O., Vlodaysky, I. Inhibition of Collagen Synthesis, Smooth Muscle Cell Proliferation, and Injury-induced Intimal Hyperplasia by Halofuginone. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17 (1): 194-202, 1997.
57. Nagler, A., Katz, A., Aingorn, H., Miao, H.Q., Condiotti, R., Genina, O., Pines, M., Vlodaysky, I.: Inhibition of Glomerular Mesangial Cell Proliferation and Extracellular Matrix Deposition by Halofuginone. *Kidney Int.*, 52 (6): 1561-9, 1997.
58. Nagler, A., Rivkind, Al., Raphael, J., Levi-Schaffer, F., Genina, O., Lavelin, I., Pines, M.: Halofuginone - an Inhibitor of Collagen Type I Synthesis- Prevents Postoperative Formation of Abdominal Adhesions. *Ann. Surg.* 227 (4): 575-82, 1998.
59. Nagler, A., Genina, O., Lavelin, I., Ohana, M., Pines, M.: Halofuginone, an Inhibitor of Collagen Type I Synthesis, Prevents Postoperative Adhesion Formation in the Rat Uterine Horn Model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* ,180 (3 Pt 1): 558-63, 1999.
60. Nagler, A., Pines, M.: Topical Treatment of Cutaneous Chronic Graft Versus Host Disease with Halofuginone: a Novel Inhibitor of Collagen Type I Synthesis. *Transplantation.*, 68 (11): 1806-9, 1999.
61. Nagler, A., Gofrit, O., Ohana, M., Pode, D., Genina, O., Pines, M.: The Effect of Halofuginone, an Inhibitor of Collagen Type I Synthesis, on Urethral Stricture Formation: In Vivo and In Vitro Study In a Rat Model. *J. Urol.*; 164:1776–1780. 2000.
62. Nowak, P., Cohn, A.M., Guidice, M.A.: Airway Complications in Patients with Closed-Head Injuries. *Am. J. Otol.*, 8 (2): 91-6, 1987.
63. Nyska, M., Nyska, A., Rivlin, E., Porat, S., Pines, M., Shoshan, S., Nagler, A. Topically Applied Halofuginone, An Inhibitor of Collagen Type I Transcription,

Reduces Peritendinous Fibrous Adhesions Following Surgery. *Connect Tissue Res.*, 34 (2): 97-103, 1996.

64. Olbrich, K.C. , Meade, R., Bruno, W., Heller, L. , Klitzman, B., Levin, L.S.: Halofuginone Inhibits Collagen Deposition in Fibrous Capsules Around Implants. *Ann. Plast. Surg.*, 54: 293–296, 2005.
65. O’Neill, J.A.: Experience with Iatrogenic Laryngeal and Tracheal Stenoses. *J. Pediatr. Surg.*, 19 (3): 235-8, 1984.
66. Ossoff, R.H., Tucker, G.F., Duncavage, J.A., Toohill, R.J.: Efficacy of Bronchoscopic Carbon Dioxide Laser Surgery for Benign Strictures of the Trachea. *Laryngoscope*, 95: 1220-3, 1985.
67. Özçelik, M.F., Pekmezci, S., Sarıbeyoğlu, K., Unal, E., Gumustas, K. , Dogusoy, G.: The Effect of Halofuginone, a Specific Inhibitor of Collagen Type I Synthesis, In the Prevention of Esophageal Strictures Related to Caustic Injury. *Am.J. Surg.*, 187 :257–260,2004.
68. Özkarakaş, H., Poyrazoğlu, E., Candan, H., Erol, H.İ., Özkan, H., Uçmaklı, E.: Effects of Laryngeal Stenting: A Comparison of Two Types of Stents in a Rabbit Model. 15. World Congress of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. *Proceedings*, 2: 725-8, 1993.
69. Park, S.S., Streitz, J.M., Rebeiz, E.E., Shapshay, S.M.: Idiopathic Subglottic Stenosis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 121: 894-7, 1995.
70. Pearson, F.G., Cooper, J.D., Nelems, J.M., Van Nostrand, A.W.: Primary Tracheal Anastomosis After Resection of the Cricoid Cartilage with Preservation of Recurrent Laryngeal Nerves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 70: 806-16, 1975.
71. Pillsbury, H.R., Peerless, S.A., Peerless, A.G.: Treatment of Laryngeal Stenosis. A Conservative New Approach. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 90: 512-515, 1981.
72. Pines, M, Knopov, V, Genina, O, Lavelin, I, Nagler, A.: Halofuginone, a Specific Inhibitor of Collagen Type I Synthesis, Prevents Dimethylnitrosamine-induced Liver Cirrhosis. *J. Hepatol.*, 27(2): 391-8, 1997.

73. Pines, M., Nagler, A.: Halofuginone: a Novel Antifibrotic Therapy. *Gen. Pharmacol.*, 30(4): 445-50. Review (46,48). 1998.
74. Pines, M, Snyder, D, Yarkoni, S, Nagler, A.: Halofuginone to Treat Fibrosis in Chronic Graft-versus-host Disease and Scleroderma. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 9: 417–425, 2003.
75. Prescott, C.A.: Peristomal Complications of Pediatric Tracheostomy. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 23: 141-9, 1992.
76. Putz, R., Pabst, R.: *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Munich, Urban & Schwarzenberg, Twelfth Edition, 1994, Volume 1,130.
77. Rahbar, R., Shapshay, S.M., Healy, G.B.: Mitomycin: Effects on Laryngeal and Tracheal Stenosis, Benefits, and Complications. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 110: 1-6, 2001.
78. Sasaki, C.T., Horiuchi, M., Koss, N.: Tracheostomy-related Subglottic Stenosis: Bacteriologic Pathogenesis. *Laryngoscope*, 89: 857-65, 1979.
79. Schmidt, F.W., Piazza, L.S., Chipman, T.J., Campbell, B.H., Toohill, R.J.: CO₂ Laser Management of Laryngeal Stenosis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 95: 485-90, 1986.
80. Schweinfurth, J., Endoscopic treatment of severe Tracheal Stenosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 115 (1), 30-34, 2006.
81. Sessions, D.G., Ogura, J.H., Fried, M.P.: Carcinoma of the Subglottic Area. *Laryngoscope*, 85: 1417-23, 1975.
82. Shapshay, S.M., Simpson, G.T.: Lasers in Bronchology. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, 16:879-86, 1983.
83. Shapshay, S.M., Beamis, J.F., Hybels, R.L., Bohigian, R.K.: Endoscopic Treatment of Subglottic and Tracheal Stenosis by Radial Laser Incision and Dilatation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 96:661-4, 1987.
84. Simpson, G.T., Strong, M.S., Healy, G.B., Shapshay, S.M., Vaughan, C.W.: Predictive Factors of Success or Failure in the Endoscopic Management of Laryngeal and Tracheal Stenosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 91: 384-8, 1982.

85. Stell, P.M., Watt, J., Stell, I.M.: Squamous Metaplasia of the Human Larynx: The Influence of Sex and Area of Residence in the Non-smoking Population. Clin. Otolaryngol., 7: 335-9, 1982.
86. Stromberg, M.,V., Hebel, R.: Anatomy of the Laboratory Rat. Baltimore, Williams & Wilkins Company,1976, 55-61.
87. Strong, M.S., Vaughan, C.W., Polanyi, G., Wallace, R.: Bronchoscopic Carbon Dioxide Laser Surgery. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 83: 769-76, 1974.
88. Strong, M.S., Healy, G.B., Vaughan, C.W., Fried, M.P., Shapshay, S.: Endoscopic Management of Laryngeal Stenosis. Otolaryngol. Clin. North Am., 12: 797-805, 1979.
89. Ward, R.F., April, M.M.: Mitomycin-C in the Treatment of Tracheal Cicatrix After Tracheal Reconstruction. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol., 44 (3): 221-226, 1998.
90. Whitehead, E., Salam, M.A.: Use of the Carbon Dioxide Laser with the Montgomery T-tube in the Management of Extensive Subglottic Stenosis. J. Laryngol. Otol,106: 829-31, 1992.