



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ,
PROF DR CEMİL TAŐCIOđLU ŐEHİR HASTANESİ
KULAK BURUN BOğAZ HASTALIKLARI**

**KONSANTRE BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN(CGF) SIÇANLARDA
OLUŞTURULAN FARİNGOKUTANÖZ FİŐTL(FKF) MODELİNDE
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Ruslan Hummatov

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2021



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ,
PROF DR CEMİL TAŐCIOđLU ŐEHİR HASTANESİ
KULAK BURUN BOğAZ HASTALIKLARI**

**KONSANTRE BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN(CGF) SIÇANLARDA
OLUŞTURULAN FARİNGOKUTANÖZ FİŐTL(FKF) MODELİNDE
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Ruslan Hummatov

Tez DanıŐmanı:

Doç. Dr. Yavuz Atar

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2021

TEŞEKKÜR

İhtisas sürecim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini bizimle paylaşan, eğitimimiz için çaba gösteren, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi'nin inceliklerini öğreten değerli hocam **Prof. Dr. Yavuz Uyar**'a,

Yine ihtisas sürecimin her anında bana abilik yapan, bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim değerli **Op. Dr. Mehmet Önder Doğan**'a,

Tez danışmanım olan **Doç. Dr. Yavuz Atar**'a ve kliniğimizin değerli hocaları **Doç. Dr. Tolgar Lütfi Kumral, Doç. Dr. Güler Berkiten, Doç. Dr. Deniz Hancı, Doç. Dr. Belgin Tutar, Doç. Dr. Gülpembe Bozkurt, Doç. Dr. Mehmet Emre Dinç**'e,

Kliniğimiz değerli uzmanları **Op. Dr. Kamil Akdağ, Op. Dr. Ayşe Enise Göker, Op. Dr. Hüseyin Sarı, Op. Dr. Ayça Başkadem Yılmaz, Op. Dr. Berk Gürpınar, Op. Dr. Arzu Güngör Doğuşlu, Op. Dr. Hasan Hüseyin Kadehçi**'ye,

Birlikte çalışma şansı bulduğum ve çok şey öğrendiğim **Op. Dr. Ahmet Arslanoğlu, Op. Dr. Erdi Özdemir, Op. Dr. Zeynep Aydoğdu, Op. Dr. Esmail Abdulahi Ahmed', Op. Dr. Onur Üstün, Op. Dr. Semih Karaketir, Op. Dr. Enis Ekincioglu, Op. Dr. Muhammed Fatih Akgün**'e,

Asistan arkadaşlarım **Dr. Onur Tanrıseven, Dr. Sitare Sarıçam, Dr. Elif Aksungur, Dr. Melis Ece Arkan, Dr. Hasan Sami Bircan, Dr. Uğur Uyan, Dr. Ömer Kumaş, Dr. Öykü İzel Onaran, Dr. Cem Celik, Dr. Avni Akın Bayram, Dr. Çağlar Çelik, Dr. Hüseyin Turgut, Dr. Mert Obuz, Dr. Gamze Allahverdi**'ye

Kliniğimizin değerli hemşireleri, personelleri ve sekreterlerine,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, yaşamım boyunca sevgi ve desteklerini hep hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem **Huraman Hummatova**, babam **Nizami Hummatov** ve kardeşim **Mina Hüseyinova**'e,

Ve yoğun temposuna rağmen bana her zaman destek olan, beni en iyi anlayan, en büyük şansım sevgili eşim **Dr. Lab. Gülcan Hummatova** ve cennet kokulu ceylan gözlü kızım **Fecrin Hümmetzadeye**'e sonsuz teşekkürlerimle.

Dr. Ruslan Hummatov

İstanbul, 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	III
TABLO VE GRAFİK LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	V
ÖZET.....	VII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 LARENKS MALİGN NEOPLAZİLERİ	3
2.2.ETYOLOJİ	6
2.3.TOTAL LARENJEKTOMİ	6
2.4.TOTAL LARENJEKTOMİ KOMPLİKASYONLARI	8
2.5 YARA İYİLEŞMESİ	11
2.6 TROMBOSİTLER ve BÜYÜME FAKTÖRLERİ	16
2.7 TROMBOSİTLERDEN ZENGİN KAN ÜRÜNLERİ	17
3. MATERYAL ve METOD	22
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ.....	46
7. KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

Kisaltmalar	Açıklamalar
CGF	Konsantre büyüme faktörü (Concentrated growth factor)
FBF	Fibroblast büyüme faktörü
FKF	Faringokutanöz fistül
GH	Büyüme hormonu
İBF	İnsulin benzeri büyüme faktörü
KRT	Kemoradyoterapi
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PRF	Trombositten zengin fibrin (Platelet rich fibrin)
PRP	Trombositten zengin plazma(Platelet rich plazma)
RT	Radyoterapi
TGF α ve β	Transforme edici büyüme faktörü alfa ve beta
TKBF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TKEBF	Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü
TL	Total larenjektomi
VEBF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TABLO VE GRAFİK LİSTESİ

Tablo 1. Larenks kanserinde TNM evrelenmesi.....	4
Tablo 2. Büyüme faktörleri kaynak aldıkları hücreler ve fonksiyonları.....	18
Tablo 3. Makroskopik apse, ülser, fistül gruplara göre dağılım sonucu.....	33
Tablo 4. Gruplara göre inflamasyon şiddeti.....	35
Tablo 5. Gruplara göre granülasyon dokusunun varlığı.....	36
Tablo 6. Gruplara göre kollajen miktarı.....	38
Tablo 7. Gruplara göre fibroblast miktarı.....	40
Grafik1. Gruplara göre fistül ve apse dağılımı.....	34
Grafik 2. Gruplara göre inflamasyon şiddetinin dağılımı.....	35
Grafik 3. Gruplara göre granülasyon doku varlığının dağılımı.....	37
Grafik 4. Gruplara göre kollajen oluşum şiddetine göre dağılım.....	38
Grafik 5. Gruplara göre fibroblast yoğunluğu.....	40

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil 1-4: Total larenjektomi cerrahi aşamaları.....	7
Resim 1. CGF elde edilmesi sırasında, santrafuj sonrası tüpte oluşan dört ayrı tabaka ..	20
Resim 2. Sprague Dawley dişi sıçan.....	22
Resim 3. Özel santrifuj cihazı (Medifuge; SilfradentSrl, Sofia, İtalya).....	23
Resim 4. Santrifuj sonunda elde edilmiş tüp içinde CGF materyali.....	24
Resim 5. Santrifuj sonunda elde edilmiş tüp içinde PRF materyali.....	25
Resim 6. Servikal özofagusa kadar ince nazogastrik sonda geçirildikten sonra boyun orta hatta yapılan 3 cm dikey bir insizyon.....	26
Resim 7. Deri ve deri altı dokuları geçildikten sonra, kaba diseksiyon kullanılarak sternohyoid kasın bulunması ve sternohyoid kasın lateralizasyonu ile hipofarenks ve servikalözofagusun ortaya konulması.....	26
Resim 8a. Hipofarenks ile servikalözofagus arasına 15 numara bisturiyle yapılan yaklaşık 1,5 cm vertikalinsizyon.....	27
Resim 8b. Vertikal insizyonun genişletilmesi ve kanama kontrolü.....	27
Resim 9. Kontrollü FKF oluşturabilmek için insizyonların 8.0 vikril suture ile gevşek şekilde suture edilmesi.....	28
Resim 10. Cilt insizyonunun 4.0 ipek suture ile suture edilerek kapatılması.....	28
Resim 11. Türk lokumu gibi dilimlenmiş CGF membranının insizyon üzerine yayılması	29
Resim 12a. Hazırlanmış blok PRF materyali.....	30
Resim 12b. Türk lokumu şeklinde dilimlenmiş PRF parçaları.....	30

Resim 13a. Araştırmacı tarafından servikal bölgede gösterilen geniş ülser alanı.....	32
Resim 13b. Makroskopik olarak apse, fistül ağzı ve ülserin yakından görünümü.....	33
Resim 14. Hematoksilen-eozin boyamada ülser, yoğun inflamasyon alanı ve iltihabi granülasyon dokusuna ait mikroskop altındaki görüntü.....	34
Resim 15. Dekapitasyon sonrası CGF kullanılan bir sıçanda yara iyileşmesi ve granülasyon dokusuna ait görsel.....	36
Resim 16. İltihabi granülasyon dokusuna ait mikroskopik görüntü.....	37
Resim 17. şiddetli derecede kollajenizasyon ve orta derecede fibroblast varlığının olduğu bir kesite ait mikroskopik görüntü.....	39
Resim 18. Orta derecede kollajenizasyon ve az sayıda fibroblast varlığının olduğu bir kesite ait mikroskopik görüntü.....	39
Resim 19. Orta derecede fibroblast varlığını gösteren mikroskopik görüntü.....	41

ÖZET

KONSANTRE BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN (CGF) SIÇANLARDA OLUŞTURULAN FARİNGOKUTANÖZ FİSTÜL(FKF) MODELİNDE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Arka plan: Faringokutanöz fistül özellikle total larenjektomiden sonra akut dönemde görülen ciddi komplikasyonlardan birisidir. Tedavisi güç olup hastanede kalış süresini uzatabilir ve yaşam kalitesini düşürür.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, deneysel faringokutanöz fistül modeli üzerinde konsantre büyüme faktörü (CGF) ve trombositten zengin fibrin'in (PRF) iyileşme üzerine etkilerini makroskobik ve histopatolojik olarak karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 35 sağlıklı Sprague Dawley sıçan (200-240 gr) çalışmaya dahil edildi. Sıçanlar randomize şekilde donör (n=5), CGF grubu (grup I) (n=10),PRF grubu (grup II) (n=10) ve kontrol grubu (grup III) olarak ayrıldı. Tüm deney gruplarına açık vertikal faringotomi yapıldı ve ardından sütüre edildi. Donörlerden alınan intrakardiyak kan ile santrifüj cihazında CGF ve PRF materyalleri hazırlandı.Membranöz materyaller eşit plaklar halinde kesilerek faringotomi insizyonu üzerinde tespit edildi. Deney sonuna kadar CGF ve PRF santrifüje serum insizyon bölgesine 0.5 cc enjekte edildi. 14 gün sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek hazırlanan örnekler makroskobik ve histopatolojik yönden incelendi.

Bulgular: Makroskobik değerlendirmelerinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Ancak hem apse formasyonu hem de fistül ağzı en az CGF grubunda görüldü (n=1).Granülasyon dokusu, fibroblast yoğunluğu ve düşük inflamasyon şiddeti yönünden kontrol grubuna göre CGF lehine anlamlı fark bulundu (sırasıyla; $p=0.023$, $p=0.034$, $p=0.021$). Diğer ikili grup karşılaştırmalarında anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$).

Sonuç: Deneysel CGF uygulaması faringokutanöz fistül gelişimini azaltmada ve yara iyileşmesinde olumlu etkiye sahiptir. Sıçanlarda faringokutanöz fistül modelinin yaratılması teknik olarak kolay bir işlemdir. CGF'nin faringokutanöz fistülü

önlemeye ve tedavisine yönelik etkinliğinin prospektif klinik çalışmalarla araştırılması yararlı olabilir.

Anahtar kelimeler: Faringokutanöz fistül, konsantre büyüme faktörü, trombositten zengin fibrin, total larenjektomi, yara iyileşmesi.



ABSTRACT

COMPARISON OF THE EFFECTS OF CONCENTRATED GROWTH FACTOR (CGF) ON WOUND HEALING IN THE EXPERIMENTAL PHARYNGOCUTANEOUS FISTULA (PKF) MODEL IN RATS

Background: Pharyngocutaneous fistula is one of the serious complications seen especially after total laryngectomy in acute period. It is difficult to treat and can prolong hospital stay and reduce quality of life.

Aim: The aim of this study is to compare the effects of concentrated growth factor (CGF) and platelet-rich fibrin (PRF) on healing, macroscopically and histopathologically, on an experimental pharyngocutaneous fistula model.

Material and Method: A total of 35 healthy Sprague Dawley rats (200-240g) were included in the study. Rats were randomly divided into donor (n=5), CGF group (group I) (n=10), PRF group (group II) (n=10) and control group (group III). Open vertical pharyngotomy was performed in all experimental groups and then they were sutured. CGF and PRF materials were prepared in a centrifuge device with intracardiac blood taken from donors. The membranous materials were cut into equal plates and fixed on the pharyngotomy incision. By the end of the experiment, the CGF and PRF centrifuge serum were injected 0.5 cc into incision site. At the end of 14 days, the rats were sacrificed and the prepared samples were examined macroscopically and histopathologically.

Results: There was no significant difference between the groups in their macroscopic evaluations ($p > 0.05$). However, both abscess formation and fistula finding were seen at least in the CGF group (n=1). There was a significant difference in favor of CGF compared to the control group in terms of granulation tissue, fibroblast density and low inflammation severity (respectively; $p = 0.023$, $p = 0.034$, $p = 0.021$). No significant difference was observed in the other pair wise comparisons ($p > 0.05$).

Conclusion: Experimental CGF application has a positive effect on reducing the development of pharyngocutaneous fistula and wound healing. Creating a pharyngocutaneous fistula model in rats is technically an easy process. Creating a pharyngocutaneous fistula model in rats is technically an easy process. It may be useful to investigate the efficacy of CGF in the prevention and treatment of pharyngocutaneous fistula with prospective clinical studies.

Keywords: Pharyngocutaneous fistula, concentrated growth factor, platelet-rich fibrin, total laryngectomy, wound healing.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Larenks kanserleri(LK) tüm kanserlerin %1'ini oluştururken baş boyun bölgesi kanserlerinin yaklaşık %25'ini meydana getirmektedirler¹.Sağlık Bakanlığı verilerine göre sıklık olarak %9,7 ile ülkemizde 6. en sık görülen kanserlerdir¹.Genellikle hayatın 6-7. Dekadlarında görülür.Kadın erkek oranı yaklaşık 1:4'tür.LK'nin %90'dan fazlası skuamöz hücreli karsinomdur¹.Larenks subglottis,glottis ve supraglottis olarak üç ayrı anatomik bölümde incelenirken kanserlerinin yaklaşık %50-75'i glottik bölgede %30-40'ı supraglottik bölgede ve en az sıklıkla %4 subglottik bölgede görülürler.

LK'nin medikal ve cerrahi olarak farklı birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Tedavi şeklinin seçiminde hastanın genel durumu ve tümörün lokalizasyonu göz önüne alınarak belirlenir.¹Daha önce parsiyel larenjektomi yapılan ya da radyoterapi aldıktan sonra tümör nüksü gelişen hastalarda ve ileri evre larenks kanserlerinde kurtarma cerrahisi olarak total larenjektomi (TL) güçlü bir seçenektir^{1,2}.TL ameliyatı sonrası faringokutanöz fistül (FKF),erken ve geç flep nekrozu,juguler ven ve karotis rüptürü, üst özofageal stenoz ve peristomal nüks gibi majör ve hayatı tehdit eden komplikasyonlar görülebilir^{1,3,4,5}.

FKF,hipofarengeal bölgeyi içine alan diğer tüm solunum ve sindirim sistemi cerrahileri sonrası oluşabilen ve sonuçları itibariyle ciddiye arzededen bir komplikasyondur.TL'den sonra genelde ilk 4-10. günlerde görülen FKF, en sık görülen majör komplikasyon olup insidansı değişik serilerde %3-15 olarak bildirilmektedir^{1,3,6,7,8,9}.Böyle önemli bir komplikasyonun risk faktörleri içerisinde önemli bir predispozan faktör olan boyun bölgesine yönelik alınmış radyoterapi (RT) olup, FKF sıklığı RT almayanlara göre yaklaşık 2.6 kat daha fazladır¹⁰.Ganly et al.⁴ yapmış olduğu bir çalışmada kemoradyoterapi(KRT) alan hastalarda sadece RT alan hastalara göre daha sık FKF oluştuğu gösterilmiştir. FKF kapanma süreci 2-3 ayı bulabilmekte ve hastanın oral beslenmesini geciktirerek yeterli kalori alamamasına neden olmanın yanında hastane yatış süresini de uzatarak hastanın psikolojik ve sosyal açıdan kötü etkilenmesine neden olabilmektedir.Uzayan iyileşme süreci postoperatif RT'nin de ertelenmesine neden olup tedavi sürecini aksaması dışında iyileşmeyen FKF karotis rüptür riskine neden olabilir¹.FKF tedavisinde hastanın oral alımı kesilmesi,nazogastrik sonda ile beslenme, parenteral beslenmeye

geçilmesi,tükürüğün yara yerine temasının engellenmesi ve düzenli yara debridmanı kabul gören uygulamalardır.Uzun dönemde kapanmayan geniş defektli fistüller için flep (deltopektoral flep, radial ön kol flebi, pektoralis majör kaslı cilt flepleri vb.) ile onarım yapılması gerekebilir.

Son beş dekatta hem genel tıp uygulamalarında, hem diş hekimliği hem de KBB uygulamalarında yara iyileşmesini etkileyen ve hızlandıran faktörlerden faydalanmak adına büyüme faktörleri gibi biyomateryalların etki mekanizması araştırılmaya ve kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmelerin bir parçası olarak insan kanında santrifüj işlemi yapılarak, Trombositten Zengin Plazma (PRP), Trombositten Zengin Fibrin (PRF) ve Konsantre Büyüme Faktörü (CGF) elde edildi¹¹.

Trombositten zengin fibrin (PRF) ilk olarak 2001 yılında Choukrounet al.¹² tarafından geliştirilmiş ikinci jenerasyon trombosit konsantrasyonudur. Elde edilirken tüp içinde her hangi bir kimyasal ajan gerekmemektedir¹³. PRF sitokinler,büyüme faktörleri içeren bir fibrin ağı deposu oluşturur¹⁴.

CGF ise ilk defa, 2006 yılında Sacco¹⁵ tarafından kemik dokuda uygulanmıştır.PRF'den farklı olarak venöz kanın farklı hızlarda santrifüje edilmesiyle elde edilir. CGF daha yüksek gerilme kuvvetine, daha çok büyüme faktörüne, yüksek viskoziteye ve adheziviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Oluşan fibrin ağının daha iyi rejenerasyon ve daha yüksek verimliğe sahip olduğu da bildirilmiştir^{16,17}.CGF enfeksiyon taşıma riskinin az olması ve bağ dokusuna uygulandığı zaman ağrı, kanama ve enfeksiyon riskinin daha az olduğu gösterilmiştir¹⁶.

FKF ilgili çok az sayıda çalışma olup bu çalışmalarda risk faktörleri üzerinde durulmuştur. Bu çalışmada sıçanlarda deneysel FKF modeli oluşturulması ve model üzerinde CGF uygulamasının iyileşme üzerine etkilerinin makroskopik ve histolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 LARENKS MALİGN NEOPLAZİLERİ

LK baş boyun kanserlerinin %25'i,tüm kanserlerin %1,2'si,kanserden ölümlerin ise %0,73'ünün sebebidir¹³. Erkeklerde kadınlardan 5 kat sık görülmekle birlikte 7.dekadda pik yapar.En sık glottik bölgede görülür. Beş yıllık sürvi bütün tedavi modalitelerine rağmen %68 civarındadır¹.Klinik perspektiften bakıldığı takdirde larenks; supraglottis, glottis ve subglottis olmak üzere üç ana anatomik bölge olarak incelenir, kanser evrelemesi de bu anatomik bölgeler esas alınarak yapılır (Tablo 1).

LK'nin %50-75'i glottis kaynaklı olup bunların %57-80'i erken evrede tespit edilmekte ve %90'mın patolojisi iyi diferansiye skuamöz hücreli kanserdir. Glottik kanserlerde başlıca semptom disfoni iken supraglottik kanserlerde vokal rezonansta bozulma (sıcak patates konuşması), dispne,disfaji,odinofaji,otalji,stridor,hemoptizi şikayetleri ya da belirgin bir larengeal semptom olmadan boyunda kitle şikayeti ile tanınabilir.Glottik tümörlerde ön planda ses kısıklığı şikayeti olduğu için tanısı diğer bölge larenks kanserlerinden nispeten daha erken konulmaktadır.Glottis diğer larenks bölgeleriyle kıyaslandığında lenfatik ağ bakımından daha zayıftır.Bu da bölgesel metastazların diğer larenks kanserlerine göre daha az olmasını açıklamaktadır.

Supraglottik kanserlere %30-40 sıklıkta rastlanırken daha nadir olan subglottik kanserlerin sıklığı yaklaşık %4 civarındadır. Subglottik tümörler uzun süre sessiz kalma eğiliminde olup dispne ve stridor ile kendini gösterir ve uzun süre astım veya pulmoner bir hastalık varmış gibi takip edilerek gözden kaçırılabilir. Tanı anında hastaların 3/4'ünde krikotiroid membran, yarısında krikoid kıkırdak infiltrate olduğu bildirilmiş olup tek cerrahi tedavi seçeneği TL'dir.

Primer Tümör (T) Evresi

Supraglottis

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, vokal kord hareketleri normaldir.
T2	Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını veya glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı mukozası vb.) tutmuştur, kord hareketleri normaldir.
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya post- krikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invazedir ve/veya tiroid kıkırdak iç korteksi invazedir.
T4	
T4a	Tümör tiroid kıkırdağın dış korteksini invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Glottis

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör vokal kordlara sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir).
T1a	Tümör tek bir vokal korddadır.
T1b	Her iki vokal korda da tümör mevcuttur.
T2	Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmakta ve/veya kord hareketleri kısıtlanmaktadır.
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır veya tiroid kartilajın iç korteksine invazyon vardır.
T4	
T4a	Tümör tiroid kıkırdağın dış korteksini invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Subglottis

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör subglottise sınırlıdır.
T2	Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır veya tiroid kartilajın iç korteksine invazyon vardır.
T4	
T4a	Tümör krikoid ya da tiroid kıkırdağı invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Rejyonel Lenf Nodları (N) Evresi Klinik N (cN)

N Kategorisi	Koşul
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.
N1	En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N2a	En büyük çapı 3cm üzerinde ancak 6 cm.yi geçmeyen, tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N2b	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır ve ENE(-)*
N2c	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontrateral lenf nodlarında metastaz vardır ve ENE(-)*
N3	
N3a	En büyük çapı 6cm.nin üzerinde olan bir lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N3b	Klinik olarak aşikar ENE(+)* herhangi bir lenf nodu mevcuttur.

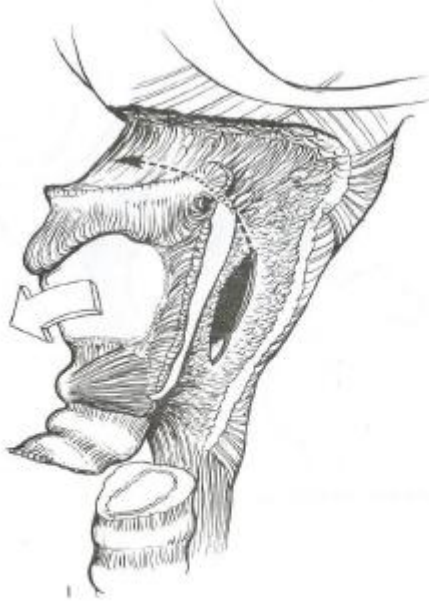
Tablo 1.Larenks kanserinin TNM evrelenmesi

2.2.ETYOLOJİ

Sigara,alkol,radyasyon, meslek (boyacılık, asbest maruziyeti, nikel maruziyeti,metal sanayii çalışanları, benzin buhar maruziyeti , polisiklik aromatik hidrokarbonlarla temas vd.)¹⁸, gastroözofageal reflü hastalığı, immünolojik sebepler (immün mekanizmalardaki bozukluğun kanser gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmekte olup kötü prognoz göstergesi olarak metastaz varlığında IgA düzeyleri yükselmektedir, immun sistemi baskılanmış hastalarda malignensi sıklığının arttığı gösterilmiştir)¹⁹,viral risk faktörleri (HPV-16 varlığı;popülasyonda %3-85 arasında değişir ancak hastalısız larenkslerde de %12-25 düzeyinde HPV DNA saptandığı için HPV-16'nın larenks kanseri oluşmada rolü tam net belirlenmemiştir)^{20,21},diyette taze sebze ve meyvelerin az tüketilmesi,salamura et ve balık ürünlerinin yoğun tüketimi de literatürde bildirilmektedir.¹⁹

2.3.TOTAL LARENJEKTOMİ

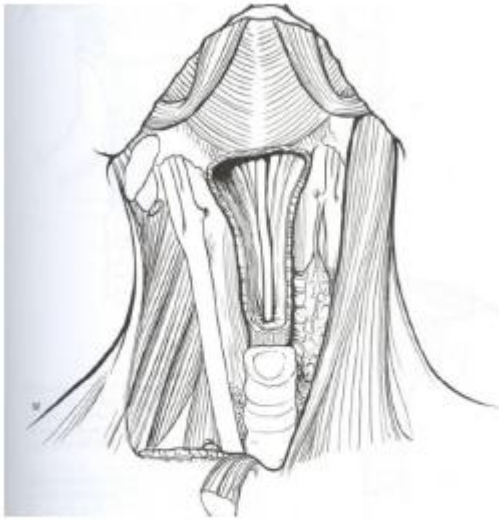
LK nedeniyle parsiyel larenjektomi sonrası veya RT sonrası nüks olan hastalarda ve ileri evre LK'lerde yapılmaktadır. TL'de, larenksin tamamı ile birlikte hyoid kemik,strep kaslar,tiroid ve krikoid kartilajlar, 1. ve 2. trakea halkaları çıkartılır (Şekil 1 ve 2).Hipofarenks ve üst özofageal bakiye dokusu bir tüp oluşturacak şekilde ve üstte dil kökü ile sütüre edilir,trakea cilde ağzılaştırılıp trakeostoma oluşturulur(Şekil 3 ve 4).



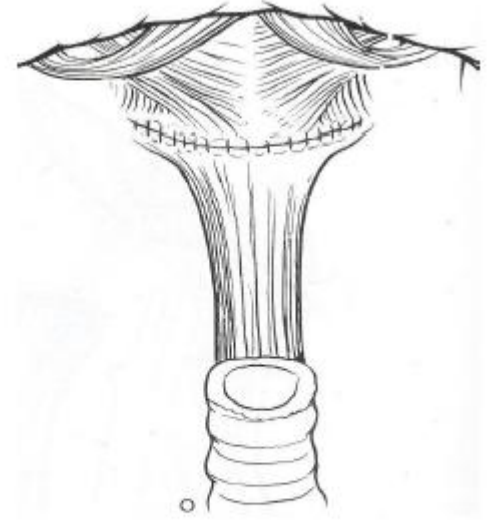
Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3



Şekil 4

Total Larenjektomi Endikasyonları:

- Bilateral vokal kord fiksasyonuna neden olan tümörler
- Kartilaj destrüksiyonu yapan ve ekstralarengeal yayılım olan ileri evre tümörler
- Subglottik uzanım (longitudinal veya annuler tarzda, önde >10mm,arkada>5mm)
- Subglottik tümörler
- Postkrikoid tutulum olan tümörler
- Nüks
- Uygun tedaviye yanıt vermeyen radyonekroz
- Parsiyel cerrahi sonrası önlenemeyen aspirasyon
- Akciğer fonksiyonlarının parsiyel larenjektomi için yetersiz oluşu.

2.4.TOTAL LARENJEKTOMİ KOMPLİKASYONLARI

Erken ve geç dönem olmak üzere iki büyük başlık altında toplanır.

I-Erken Dönem Komplikasyonlar

- Kanama (hemoraji)
- Trakeada krut oluşumu
- Trakeit
- Yara yeri enfeksiyonu
- Faringokutaaanöz fistül

II-Geç Dönem Komplikasyonlar

- Farenks stenozu
- Trakeostoma stenozu
- Disfaji
- Tiroid fonksiyon bozukluğu
- Karotis rüptürü
- Psikolojik bozukluklar

Kanama (Hemoraji)

Kaynak çoğunlukla deri flebindeki venler veya tiroid çevresidir. Cilt flebi açılıp ligasyon yapılmalıdır.

Trakeal Krut Oluşumu

Havanın burun ve boğazın nemlendirici etkisinden mahrum kalması nedeniyle sekresyonların aşırı kurumasına bağlı meydana gelir. Ortamın nem oranı ayarlanmalı ve krutlar temizlenmelidir.

Trakeit

Trakea mukozasının enflamasyonu sonucu oluşur. Oluşan pürülan akıntılar sonucu kanül, trakea ve bronşlar tıkanabilir. Uygun antibiyoterapi, buhar inhalasyonu ve sık aspirasyon gereklidir.

Yara Yeri Enfeksiyonu

Ameliyattan 8-12 saat önce profilaktik antibiyotik verilmesi önerilir.

Hipofarenks Stenoza

Farenks lümeninin stenoza özofagoplasti tekniğine bağlıdır (yeterli genişlikte mukoza bırakılmalıdır). "T" şeklinde özofagoplastide darlık daha sık görülür. Stenoza sonucu disfaji meydana gelebilir. Hastanın uykusu dahil hayat kalitesi bozulabilir. Yutma sırasında faringoözofageal segmentte negatif basınç oluşamaz ve bolus dilin itme kuvveti ile ilerletilir. Normalde dilin itme gücü 18mmHg iken larenjektomi sonrası 32mmHg'ya kadar yükselmektedir. Sonuç olarak bolusun özofagusa geçiş süresi uzar, disfaji meydana gelir.

Trakeostoma Stenoza

Daha sık postoperatif 3 ay-1 yıl arasında görülür. Hafif ve orta derecedeki stenozlarda dilatasyon, giderek artan boyutta kanül kullanımı ve steroid injeksiyonu önerilir. İleri derecedeki stenozlarda ise skar eksize edilip lokal deri flepleri kullanılarak revizyon yapılır.

Tiroid Fonksiyon Bozukluğu

Tiroid rezeksiyonuna, enfeksiyona veya RT'ye bağlı hipotiroidi ortaya çıkabilir. Hormon replasmanı yapılması gerekebilir.

Karotis Rüptürü

FKF, preoperatif radyoterapi uygulanmış olması, cilt nekrozu predispozan faktörlerdir. Cerrahi sırasında boyun diseksiyonu da yapılmışsa risk artar.

Psikolojik Bozukluklar

Hastalarda postoperatif değişik derecede depresyon ortaya çıkabilir, psikiyatrik değerlendirme ve tedavi gerekebilir.

Faringokutanöz Fistül

FKF, boyun cildi arasındaki doku bütünlüğünün bozulup farenksle cilt arasında bir yol oluşumunu ifade eder. Tükürüğün cilde sızması ile tanınır. FKF solunum ve sindirim sistemi cerrahilerinden sonra ortaya çıkabilen, hayati öneme sahip olabilen bir komplikasyondur. TL sonrası görülen en sık majör komplikasyon FKF olup insidansı %3-15'tir^{1,3,6,7}.FKF belirtileri yara yerinde eritem,dem,sütürlerde açılma,pürülan materyal ve tükrük gelişi ile başlar.Genellikle postoperatif erken dönemde 4-10.günler arasında grlmektedir^{32,33}.Fistül oluşumunda rol oynayan faktörler arasında daha önce radyoterapiye maruz kalma,larenjektomiye boyun diseksiyonunun eklenmesi,preoperatif trakeotomi açılması,farengal mukozanın kapatılma biçimi,cerrahi sınır pozitifliği,enfeksiyon,yetersiz kalori alımı,diyabet,anemi sayılabilir^{3,4,22}. FKF oluşmasında başlıca etkenlerden biri hastanın RT almasıdır.Ayrıca RT alan hastanın tedavisine KT'de eklenirse fistul riski daha da artacaktır. Önceden RT almış TL'li hastalarda, RT almamışlara göre 2.6 kat daha fazla FKF oluşma riski vardır¹⁰.Fistül oluşumunu önlemek için intraoperatif olarak farenks kapatılması sırasında teknik hatalardan kaçınılması gerekirken postoperatif olarak uygun protein ve mineral desteği sağlanmasının yanında varsa diyabet ve anemi gibi zemin hazırlayan faktörler kontrol altında tutulmalıdır.FKF başlangıç tedavisi, oral alımın durdurulmasıyla antiseptik gazlarla fistül traktının tamponajı,uygulanan antibiyoterapi ve yara iyileşmesinde granülasyon dokusunu artırmaya yönelik işlemlerdir. Hastaların%30'unda bu önlemlere rağmen FKF primer olarak

kapanmamakta ve cerrahi müdahale ihtiyacı doğmaktadır^{23,24}. Primer kapanma sağlanamadığı zaman farenksle cilt defektinin arası pediküllü kas flebiyle kapatılabilir ve böylece kanlanma artırılıp dokuların ihtiyacı olan dolaşım sağlanmış olur.

2.5 YARA İYİLEŞMESİ

Yara, çeşitli sebepler sonucu dokunun normal anatomik yapı ve fonksiyon tamlığının bozulmasıdır²⁵. Yara hasarı oluştuktan sonrası kısa zaman diliminde sıvı kaybını önlemek ve enfeksiyonu minimuma indirmek gerekir^{26,27}. Klinik olarak yara iyileşmesi akut ve kronik olarak ikiye bölünür^{25,28}. Onarım süreci ve bu zaman içinde baş veren olaylar hemen hemen tüm dokular için aynı olup, immunolojik ve biyolojik sistemlerin koordineli çalışmasıyla olur²⁹.

Yara iyileşmesinde dört aşama vardır^{30,31}:

- Hemostaz ve koagülasyon fazı
- İnflamasyon
- Proliferasyon (Granülasyon dokusu oluşumu, Anjiogenez)
- Olgunlaşma (Skar formasyonu, Remodelling)

Hemostaz ve Koagülasyon Fazı

Yaralanmadan sonra yara bölgesinde, kan kaybını engellemek amacıyla hemostaz ve koagülasyon mekanizmaları hızlı bir şekilde çalışmaya başlar²⁵. Yaralanmanın ardından endotelin etkisiyle damar düz kas hücrelerinde ani ve geçici bir vazokonstriksiyon meydana gelir. Refleks vazokonstriksiyon sonucunda kanama azalır veya durur. Endotelyal hasar sonrası subendotelyal ekstraselüler matriks açığa çıkarak trombositlerin yapışmasına açık hale gelir ve ardından trombosit aktivasyonu gerçekleşerek agregasyon sağlanır. Trombosit agregasyonu ile birlikte damardaki defekt alanı doldurulur. Bu olay birincil hemostatik tıkaç olarak tanımlanır³². Fibrin tıkaç oluşumu için hemostatik mekanizma tek başına yeterli değildir^{25,33}. Hemostatik olaylar ile beraber, koagülasyon kaskadı kan kaybını sınırlamak amacıyla pıhtı oluşumuna yol açan intrinsek ve ekstrinsek yollar aracılığıyla aktive edilir³⁴. Kan yara bölgesine sızarken kan bileşenleri ve trombositler açığa çıkan ekstraselüler matriks bileşenleri ve kollajenle temasa geçer. Bu temas sonucunda bazı mediatörler

aracılığıyla kan pıhtısının oluşumu ve trombositlerden pıhtılaşma faktörlerinin salınımı sağlanmış olur ki böylece ikincil hemostatik tıkaç oluşumu gerçekleşmiş olur²⁵. Kan pıhtısı ve trombositler sadece hemostaz için değil aynı zamanda hemostatik ve inflamatuvar fazların sonraki aşamalarında hücre migrasyonu için geçici bir matriks sağlar. Trombositlerde bulunan alfa granüller platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), epidermal büyüme faktörü ve insülin-benzeri büyüme faktörü gibi sitokin ve büyüme faktörlerini içerir. Bu moleküller yara onarım kaskadında ilk olarak nötrofilleri daha sonra da makrofajları, endotel hücrelerini ve fibroblastları aktive ederek yara bölgesine çeker³⁵. Ayrıca trombositler serotonin gibi vasküler geçirgenliği yüksek vazoaaktif aminler aracılığıyla inflamasyon sırasında sıvının ekstrasvaze olmasını sağlar³⁶.

İnflamatuvar Faz

Humoral ve hücrel mikroorganizmalara karşı immün bariyer oluşturur. Erken ve geç inflamatuvar faz olarak iki bölümde incelenir³⁷.

a) Erken İnflamatuvar Faz

Erken inflamatuvar faz koagülasyon fazından hemen sonra başlar. Asıl işlevi enfeksiyonu önlemek ve nötrofillerin yara bölgesine infiltrasyonunu sağlayarak devamında kompleman kaskadını aktive eden moleküler olayların başlamasını sağlamaktır³⁵. Nötrofillerin görevi hasarlı dokuyu, yabancı partikülleri, bakterileri fagositoz yoluyla parçalamak ve ortamdan uzaklaştırmaktır. Fagositik etkide herhangi bir zafiyet durumunda iyileşme süreci gecikir^{25,37}. Nötrofiller bazı sitokinler ve trombosit ürünleri gibi kemotaktik ajanlarla 24-36 saat içerisinde yara bölgesine çekilir²⁵. Yüzey adezyon moleküllerinin düzenlenmesine ait değişimler başlar ve nötrofiller yara çevresinde bulunan post kapiller venüllerdeki endotel hücrelerine bağlanmaya başlarlar. Daha sonra nötrofiller sırasıyla kan akışı boyunca yuvarlanma hareketi, güçlü adezyon ve diapedez olarak bilinen süreç ile de endotel hücrelerinin arasından geçerler^{37,38}. Hücre kalıntıları ve apoptotik cisimler son olarak makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılırlar^{25,31,35}.

b) Geç Inflatuvar Faz

Geç inflamatuvar fazda 48-72 saat sonra makrofajlar görülür ve fagositoz işlemine devam edilir^{36,37}. Damar dolaşımındaki monositler, yara yerine geldiği zaman etkinleşerek makrofajlara dnşrlr, bakterilerin yok edilmesini ve yara yerinin sıyrılıp atılmasını sağlarlar. Monositler için en güçlü kemotaktik maddelerden birisi de aktive trombosit ve nötrofillerden salınan TGF- β 'dir. Makrofajlar hücrenel ve biyokimyasal olayları etkileyen birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılayarak yara iyileşmesinde önemli bir rol stlenirler³⁹. Geç inflamatuvar fazda yani yaralanmadan 72 saat sonra interlökin-1'in (IL-1) etkisi ile yara bölgesine gelen son hücreler lenfositlerdir. IL-1 kollajen şekillenmesi, hücre dışı matriks bileşenlerinin üretimi ve parçalanması için gerekli olan kollajenaz enziminin regülasyonunda önemli bir role sahiptir³⁷.

Çoğalma Fazı (Proliferasyon)

Doku hasarı sonrası hemostaz, koagülasyon ve inflamasyon süreçleri tamamlanmış bağışıklık cevabı oluşturulmuştur ve akut yara artık doku onarımına doğru ilerlemektedir^{36,37}. Çoğalma fazı yaralanma sonrasında nc gün başlar ve yaklaşık 2 hafta kadar devam eder. Proliferatif faz, geçici bir ağ olarak işlev gören yeni sentezlenmiş ekstraselüler matriks birikimi (fibrin ve fibronektinden oluşur) ve fibroblastların g ile karakterizedir. Bu fazda granülasyon dokusu oluşmaya başlamış ve makroskopik olarak görülebilecek düzeye ulaşmıştır. Proliferatif fazda yer alan basamaklar fibroblast g, kollojen sentezi, anjiogenez ve granülasyon dokusunun oluşumu olarak sıralanabilir³¹.

a) Fibroblast G

Yaralanma sonrası ilk üç gün dokunun etrafındaki fibroblast ve miyofibroblastlar çoğalmaları için uyarıldıktan sonra inflamatuvar hücreler ve trombositler tarafından salınan TGF- β ve PDGF gibi faktörler tarafından yara bölgesine ynlendirilirler^{40,41}. nc günden itibaren yara bölgesinde sayıları artan fibroblastlar matriks proteinleri, hyaluran, fibronektin, proteoglikan, tip1 ve tip3 prokollajen üretimini sağlarlar^{25,41}. İlk haftanın sonuna kadar hücre gn destekleyen ve onarım süreci için gerekli olan ekstraselüler matriks birikir ve

fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşürler⁴¹. Miyofibroblastların etkisi ile meydana gelen yara kontraksiyonu yara kenarlarını birbirine yaklaştırır⁴¹. Daha sonra gereksiz fibroblastlar apoptoz ile ortamdan uzaklaştırılır⁴².

b) Kollajen Sentezi

Yara iyileşmesinin tüm aşamalarının önemli bir bileşeni olan ve fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajenler yara içerisinde hücre içi matriks oluşumu için temel unsur olmanın yanında özellikle onarımın proliferatif ve remodelling aşamalarında dokulara bütünlüğünü ve gücünü kazandırmak için anahtar bir rol de üstlenmektedirler³⁴. Yaralanmamış dermiste %80 tip1 ve %25 tip3 kollajen bulunurken, yara granülasyon dokusunda %40 oranında tip3 kollajen bulunmaktadır²⁵.

c)Anjiogenez ve Granülasyon Dokusu Oluşumu

Anjiogenez sonrasında meydana gelen ve onarım sürecinin tüm aşamalarında gerçekleşen yeni kan damarlarının oluşumu yara onarımında kritik bir öneme sahiptir. Hemostaz aşamasında salgılanan birçok anjiogenik faktör angiogenezi teşvik eder⁴³. Endotel hücreleri FGF, VEGF, PDGF, anjiogenin, TGF- α ve TGF- β gibi birçok anjiogenik faktöre cevap verir. Bu olay anjiostatin ve steroid gibi inhibitör faktörlerin etkisi ile dengede tutulur⁴⁴.

İnhibitör ve uyarıcı ajanlar endotel hücrelerinin çoğalmasında doğrudan görev alırlarken aynı zamanda indirekt olarak da EGF'yi serbest bırakmak için konak hücreleri uyarır ve mitozu aktive ederler⁴⁵.

Hipoksik koşullar altında, proliferasyonunu ve endotelial hücrelerin büyümesini teşvik eden moleküller yarayı çevreleyen dokudan salgılanırlar. Bu moleküllere cevap olarak dört adımlı bir mekanizma gerçekleşir. İlk olarak eksraselüler matriks boyunca ilerleyebilmek için ana damarda bazal laminanın bozunması amacıyla endotelial hücreler tarafından proteaz üretilir. Bu aşamayı FGF ve VEGF'nin anahtar rol oynadığı kemotaksis, çoğalma, yeniden yapılanma ve farklılaşma izler. Başlangıçta yara merkezinde damar kaynağı yoktur, beslenme yara

kenarındaki kan damarlarından olur. Birkaç gün içerisinde yara etrafında kılcal damarlardan oluşan mikrovasküler ağ meydana gelir⁴³.

Hücre iskeleti organizasyonu, sinyal iletimi ve hücre adezyonu ile ilişkili migrasyon, damar sistemindeki fiziksel ve kimyasal faktörler tarafından düzenlenir. Düzenleme üç mekanizma ile gerçekleşir; kemotaksis (kemoatraktif maddelerin konsantrasyon gradienti boyunca hareketi), mekanotaksis (mekanik kuvvetlerin neden olduğu migrasyon) ve haptotaksis (hareketsiz ligand gradientine cevap olarak migrasyon). Migrasyon kemotaktik aktivitenin bir sonucudur ve anjiogenez için gereklidir^{46,47}.

Kemotaktik ajanlar, hücre hareketinde ve yara iyileşmesi boyunca anjiogenezde görev alırlar. Hücre büyümesi ve farklılaşmasının önemli modülatörlerinden olan EGF, TGF-alfa, VEGF, anjiopietin-1, fibrin ve lipid büyüme faktörleri ayrıca yara bölgesinde yeniden damarlanma ve damar onarımı için de medyatör olarak hareket ederler.

Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı

Epitelizasyon

Yaralanma sonrası yara etrafındaki epitelyal hücrelerde yoğun mitotik aktivite meydana gelir ve epitelyal hücrelerin göçü birkaç saat içerisinde yara kenarından başlar, epitelyal hücrelerin bir araya gelmesi ile de göç durur ve bazal membran oluşmaya başlar^{31,34}.

Yara iyileşiminin son fazı yeni epitel ve skar doku oluşumu ile karakterize olan yeniden şekillenmedir. Remodelling fazı 1-2 yıl veya daha uzun sürebilir⁴¹. Akut yaralarda, normal iyileşme sürecinde sentez ve bozunma arasında hassas dengeyi korumak için yeniden şekillenme fazı düzenleyici mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Hücre içi matriksin olgunlaşması ile birlikte, kollajen demetlerinin çapı artarken hyaluronik asit ve fibronektin parçalanır. Yaranın gerilme kuvveti aşamalı olarak artar³⁴.

Yaralanmış dokuda orijinal gücün yaklaşık %80'i yeniden kazanılabilir. Edinilen son güç lokalizasyon ve onarım süresine bağlıdır fakat doku

orijinal gücünü tam manasıyla kazanamaz²⁵. Kollajenin sentezi, yıkımı, ekstraselüler matriksin yeniden yapılanması devamlılığı olan olaydır ve yaralanmadan 3 hafta sonra kararlı duruma gelme eğilimindedirler³⁴. Matriks metalloproteinaz (MMP) enzimleri yarada fibroblast, makrofaj ve nötrofiller tarafından üretilir ve kollojenin bozunmasından sorumludur. Aktiviteleri inhibitörler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir^{49,50}. Kollajen demetlerinin ilk birikimi düzensiz olmasına rağmen, yeni kollajen matriksi daha iyi organizasyona sahiptir ve zamanla çarpaz bağlantılar gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks ile fibroblast etkileşimleri nedeniyle altta yatan bağ dokunun boyutları küçülür, yara boşlukları birbirine yakınlaşır. Bu süreç PDGF, TGF- β ve FGF gibi bir dizi faktörlerle düzenlenir. Yara iyileşirken, fibroblast ve makrofajların yoğunluğu apoptoz ile giderek azaltılır⁴². Zamanla kılcal damarların büyümesi durur, yara bölgesinde kan akışı ve metabolik aktivite azalır³⁴. Son durumda, kan damarları ve hücrelerin sayısı azalırken mukavemeti artmış skar doku oluşmuş olur³⁷.

2.6 TROMBOSİTLER ve BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Trombositler, çapı 2-4 μ m arasında değişen, çekirdeği olmayan sadece sitoplazmadan oluşan, megakaryositler olan dev hücrelerden köken alan, 10 güne kadar sınırlı ömre sahip olan hücrelerdir. Trombositlerin morfolojileri farklı olup, pseudopoidal sapsız uzantıları, internal aygıtları ve deniz süngerini andıran görüntüye sahipler⁵¹. Trombosit zarının dış yüzeyinde adezyondan sorumlu glikozaminglikanlar ve glikoproteinler bulunurken, iç kısmında ise glikojen proteinler, mitokondri ve alfa, delta, lamda granülleri bulunur.

Alfa granüller inflamasyondan, hemostazdan ve doku iyileşmesinden esas görevli granüller olup, ışık mikroskopuyla gözlenebilen granüllerdir^{52,53}. Diğer granüllerden daha büyük çapa sahip olup, fibrinojen, faktör V, çözülebilir adezyon molekülleri (vitronektin, vonwillebrand faktör), trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (trombosit kaynaklı büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, insülin benzerli büyüme faktörü, fibroblast benzeri büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü) ve proteinler bakımından zengindir.

İnasan vücudunda kırık, patoloji ya da operatif olarak herhangi bir sebepten trombositler aktifleşerek şekil değişikliğine uğrar, pıhtı oluşumunu aktifleştirir aynı

zamanda yara iyileşmesinde önemli rol oynayan eksositoz yoluyla büyüme faktörleri ile zengin granülleri hücre dışına salar, yara iyileşmesini başlatır ve destekler.

Büyüme faktörleri yara iyileşmesini kontrol eden biyoaktif materyaller olup, doku rejenerasyonu için hücre göçünü, hücresel mitotik aktivitesi, anjiogenezisi, kemotaksisi, yeni damar oluşumunu ve diferansiyasyon gibi anabolik prosesin artımında önemli rolü vardır. Büyüme faktörleri lokal yolla da etki ederek yara yerinin hızlı ve daha iyi iyileşmesini sağlar^{54,55,56,57,58}. (Tablo 2)

2.7 TROMBOSİTLERDEN ZENGİN KAN ÜRÜNLERİ

Doku mühendisliğinin ve ideal bir biyomateryal araştırılmasının temel hedefi, yara iyileşmesini hızlı bir şekilde öncelik edecek bir doku reaksiyonu oluşturabilen, defekli bölgenin rejenerasyonunu hızlandırabilecek, doku beslenmesini artıran ve farklı mekanizmalarla endotel hücreleri aktive eden biyomateryaller elde etmektir. Bu ürünler basit, kolay ve hızlı uygulamalarla elde edilmesi de önemli şartlardandır. Moleküler düzeyde trombositlerin hemostatik sürece tam etkisi tartışmalı olsa da, yara iyileşmesine farklı mekanizmalarla etki ettiği bilinmektedir. Trombositlerin yara iyileşme etkisini iyi anlayabilmek için yapılan çalışmalar trombositten zengin plazma, trombositten zengin fibrin, fibrin yapıştırıcı ve trombositlerin farklı formlardaki terapötik uygulamalarda kullanımında artışa neden olmuştur⁵⁹.

Trombositten zengin plazma temrinini ilk dafa 1954 yılında Kingsley kullanmış ve kan pıhtılaşmada önemli rolü olduğunu bildirmiştir. İlk olarak 50 yıl önce, kandan elde edilen fibrinojen içeren fibrin yapıştırıcılar yara kapatılması ve yara iyileşmesi için uygulanmağa başlanmıştır⁶⁰. 1994 yılında Gibble ve Ness^{61,62} güçlü hemostatik ve adeziv özeliğe sahip fibrin yapıştırıcılar geliştirmişler, daha sonra ise fibrin jelin otolog bir modifikasyonu olan trombositten zengin plazma jel tamamlanmış ve başarılı şekilde klinik uygulamalara başlanmıştır.

Trombositten zengin ürünler farklı santrifüj işlemleri geçirilerek elde edilen: Trombositten zengin plazma (PRP), Trombositten zengin fibrin (PRF) ve Konsantre büyüme faktörü (CGF) ürünlerdir.

Büyüme Faktörleri	Moleküler Özellikler	Kaynak Hücreler	Hedef Hücreler	Etkileri
TKBF –Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	Katyonik polipeptid	Trombositler, makrofajlar, monositler, endotelial hücreler, düz kas hücreleri	Fibroblastlar düz kas hücreleri, glial hücreler, makrofajlar, nötrofiller	Hedef hücrelerde kemotaksis ve mitotik aktiviteyi uyarma, kollajen sentezi ve salgılanması
TBF –Transforme edici büyüme faktörü	2 zincirli polipeptid, insanda 3 farkı gen ürünü: TBF-beta 1,2,3	Trombositler, makrofajlar, T lenfositleri, monositler, nötrofiller	Trombositler, endotelial ve epitelyal hücreler, kemik iliği kök hücreleri, preosteoblastlar	Endotelial, fibroblastik ve osteoblastik mitozu uyarma/baskılama, kollajen sentezi ve salgılanması, diğer büyüme faktörlerinin mitojenik etkilerini düzenleme, endotelial kemotaksis ve anjiogenezi uyarma
VEBF –Vasküler endotelial büyüme faktörü	Homodimerik polipeptid	Makrofajlar, keratinositler	Endotelial hücreler, fibroblastlar, inflamatuvar hücreler	Damar geçirgenliğini artırma, anjiogenezi artırma
TKEBF - Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü	Polipeptid	Trombositler, makrofajlar, monositler	Fibroblastlar, endotelial ve epitelyal hücreler	Endotelial kemotaksis ve anjiogenezi uyarma, kollajen sentezi ve salgılanması, epitelyal/mezenkimal mitozu uyarma
FBF-Fibroblast büyüme faktörü	Asidik ve bazik polipeptid	Endotelial hücreler, makrofajlar	Endotelial hücreler, fibroblastlar, keratinositler	Mezodermal kökenli hücrelerde, fibroblastlarda kemotaksis, çoğalma ve anjiogenezi artırma, yara iyileşmesi, kan hücrelerinin farklılaşması
İBF –İnsulin benzerli büyüme faktörü	Tek zincirli polipeptid	Osteoblastlar, makrofajlar, monositler, kondrositler	Fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler	Kıkırdak büyümesini uyarma, kemik matriks formasyonunu, preosteoblastların ve osteoblastların replikasyonu, otokrin ve parakrin etkiler, TKBF ile kombine edildiğinde yara iyileşmesini artırma

Tablo 2. Büyüme faktörleri kaynak aldıkları hücreler ve fonksiyonları^{57,58}

Trombositten zengin plazma(Platelet rich plazma-PRP)

PRP, birinci nesil konsantrasyon ürünü olarak yüksek miktarda trombosit ve büyüme faktörü ile birlikte, fibronektin, vitonektin, fibrinojen gibi kemik-bağ-epitel migrasyonu için gerekli matriks, aynı zamanda yara iyileşmesini hızlandıran elemanları içeren üründür^{95,96}.

Öztürk ve ark.⁶⁵ yaptığı çalışmada, PRP kullanarak cerrahi sahada normale kıyasla 2-3 kat daha fazla iyileşme sağladığını belirtmişler.

PRP, hem greft hem de tampon özeliği taşıması KBB hekimlerinin ilgisini çekmiş, Stavrakaset al. ⁶⁶ tarafından yapılan bir meta-analizde bu ürünün değerini ortaya koymaya çalışılmıştır ama yeteri kadar kanıt olmadığını belirten yayın, gelecekte bu ürünün tedavide payının artacağını öngörmüştür.

Trombositten zengin fibrin(Plateletrich fibrin-PRF)

PRF, popüler bir fibrin yapıştırıcı olup yaklaşık 50 yıl önceden beri tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Yara iyileşmesini hızlandırırken, asıl görevi hemostaz sırasında trombosit agregasyonunu sağlamaktır. Fibrinojen koagülasyon zamanı trombin sayesinde çözülmez bir yapı olan fibrine dönüşür⁶⁷. PRP nin detaylı biokimyasal analizinde polimerize fibrin ağı ile sarılmış sitokinler, glikalik zincirler, yapısal glikoproteinler bulunduğunu ve bu yapıların yara iyileşmesinde iyi bilinen sinerjik etkinin olduğunu Dohan et al. ⁶⁸ rapor etmişlerdir.

PRP özellikleri şu şekilde sıralanabilir

- Biyokimyasal eklemeye (sığır trombinini, Ca, anti-koagulan) gerek olmaması
- Kolay ve efektif hazırlanabilir
- Hücre migrasyonu ve proliferasyonunu hızlandırır
- Hemostaza yardımcı destek rolü oynar
- İmmun sistem üzerinde destek etkisi mevcuttur⁶⁹

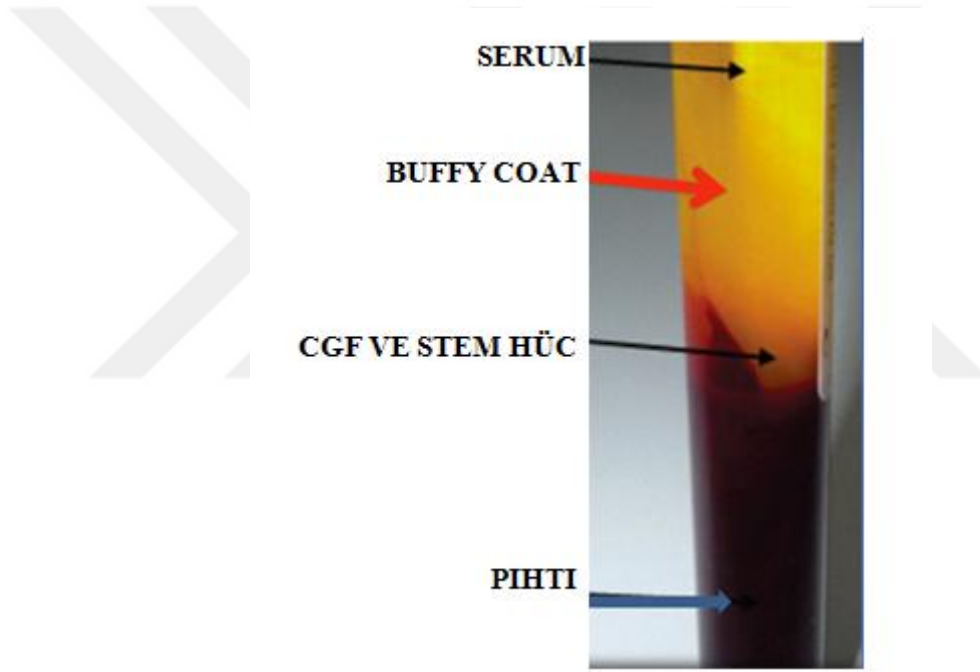
KBB hekimleride PRF'yi çok geniş şekilde kullanmakta olup, Gür ve ark ile Habeşoğlu ve ark. ^{70,71} timpanik membran perfarasyonlarının daha erken kapanmasını, yileşmenin daha hızlı olduğunu ve bu ürünün kolay elde edilmesi, uygulanma kolaylığını bildirmişlerdir.

Konsantre büyüme faktör (Concentrated growth factor-CGF)

CGF,2006 yılında İtalya'da Sacco Luigi tarafından geliştirilmiş, ikinci nesil trombosit konsantrasyonlarından olup, içeriği PRF'ye benzer, ancak farklı santrifüj yöntemi sayesinde daha fazla büyüme faktörlerinden zengin, daha yoğun bir fibrin matriksi olduğu ve bu içerliklerin kemik ve yumuşak doku iyileşmesini artırma özellikleri olduğunu göstermiştir⁷².

Hastanın kendi venöz kanından elde edilen ve %100 otolog bir fibrin olan CGF antikoagülan içermeyen tüplerden kanın santrifüje edilmesiyle alınır. Santrifüj işlemi sonrası tüpte dört bölge görülür. (Resim 1)

1. Serum: en üstte yer alan kan plazması olup fibrinojen ve koagülasyon faktörleri içermez
2. Fibrin buffy coat: yoğun ve geniş polimerize fibrin blok
3. Litikfaz: CGF, büyüme faktörleri, stem hücreleri ve fibrin blok ile koagülasyon tabakası arasında kalan faz
4. Pıhtı: en alt tabaka kırmızı, beyaz kan ürünleri ve pıhtılaşma faktörü içeren tabaka



Resim1.CGF elde edilmesi sırasında, santrifüj sonrası tüpte oluşan dört ayrı tabaka

CGF nin yara iyileşmesine etkileri ve sağladığı faydalar:

1. Hemostaza trombin ve fibrin içerlik sayesinde yardımcı olur
2. Yumuşak doku, kemik ve yara iyileşmesini hızlandırır, çok sayıda büyüme faktörleri, sitokin içerir
3. Fibrin yapıya sahip olmasıyla adheziv özellik gösterir
4. Jel yapıya sahip olmasıyla tampon özeliği gösterir

5. Enfeksiyon ve immün yanıt riski oluşturmaz, hastanın kendi kanından alınır ve herhangi bir kimyasal katkı kullanılmaz
6. Ucuz ve kolay elde edilir
7. Son zamanlarda kullanım alanı genişlemektedir⁷³

Rodella et al. CGF'nin biyolojik karakteristik özelliklerini elektron mikroskopunda incelemiş, doku rejenerasyonunda önemli rol oynayan CD34 pozitif kök hücreleri görüntülemiş aynı zamanda CGF'nin trombosit, lökosit ve büyüme faktöründen zengin fibrinden oluşan karmaşık bir üç boyutlu yapıya sahip olduğunu tespit etmişlerdir⁷².

Literatürde bildiğimiz kadarıyla diş hekimliği ve KBB uygulamalarında CGF'nin tedavi amacıyla kullanıldığı bildirilmekle birlikte FKF riskine karşı ya da tedavisinde trombosit konsantre ürünlerinin etkisi ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Biz sıçanlarda deneysel FKF modeli oluşturarak CGF'yi PRF ve kontrol grubu ile karşılaştırmayı amaçladık.

3. MATERYAL ve METOD

Deney hayvanları

Bu çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (02.12.2019 – Karar no:258). 35 adet sağlıklı dişi ve/veya erkek Sprague Dawley cins sıçan (200-240 gr) çalışmaya dahil edildi. (Resim 2) Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 21C° ±1 sıcaklıkta, serbest yemek ve su alabildikleri bir ortamda barındırıldı. Sıçanların gerek kendine gerekse diğer sıçanlara zarar verme durumu mümkün olmayacak şekilde bir kafeste dört sıçan olacak şekilde ve her bir sıçan için 250 cm2 olarak tasarlanmış kafeslerde tutuldu. Sıçanlara Ulusal Laboratuvar Hayvanlarını Koruma ve Kullanma Yönetmeliği'ne uygun şekilde yaklaşıldı. Çalışma gruplarına kör bir araştırmacı tarafından grup adlarının yazdığı 30 ve donör yazılı beş karttan rastgele seçilerek sırayla gelen sıçanlarla eşleştirme yapıldı. Donör hayvan grubu olmak üzere beş sıçan, her bir grupta 10 sıçan olmak üzere CGF çalışma grubu (grup I), PRF çalışma grubu (grup II) ve kontrol grubu (grup III) olarak gruplandırılarak çalışıldı. Yeteri kadar CGF ve PRF hazırlayıp elde edebilmek amacı ile donör hayvan grubunda intrakardiyak yolla kan alındı.



Resim2.Sprague Dawley dişi sıçan

CGF hazırlama protokolü

CGF hazırlama protokolü; sıçanlardan steril antikoagülan içermeyen kan tüpleri içine donör hayvan grubundan intra-kardiyak yolla 10 cc kan alındı. Bu tüpler

daha sonra özel bir santrifüj cihazında (Medifuge; SilfradentSrl, Sofia, İtalya) 13 dakika boyunca hemen santrifüj edildi(2 dakika 2700 pm , 4 dakika 2400 pm , 4 dakika 2700 pm ve 3 dakika 3000 pm).⁷⁴(Resim 3)Santrifüjleme sonunda tüp içerisinde 4 katman oluştu; en üst katman fibrinojen içermeyen kan plazması ve koagülasyon faktörlerini içeren tabaka, 2. katman yoğun fibrin tabakası, 3. katman büyüme faktörlerini, kök hücreleri ve lökositleri içeren tabaka, en alt katman ise eritrositleri içeren tabaka idi. 2. ve 3. katman bu çalışmada kullanıldı. Bu tabakalar diğerlerinden cerrahi makas yardımıyla ayrıldı.(Resim 4)



Resim 3. Özel santrifüj cihazı (Medifuge; SilfradentSrl, Sofia, İtalya)



Resim 4.Santrifüj sonunda elde edilmiştirüp içinde CGF materyali

PRF hazırlama protokolü

PRF hazırlama protokolü; steril antikoagulan içermeyen kan tüpleri içine donör hayvanlardan intrakardiyak yolla 10 cc kan alındı. Bu tüpler daha sonra özel bir santrifüj cihazında (Medifuge; SilfradentSrl, Sofia, İtalya) 8 dakika boyunca 1300 pm santrifüj edildi. Santrifüjlemenin sonunda tüp içerisinde 3 katman oluştu: en üst katman fibrinojen içermeyen kan plazması ve koagülasyon faktörlerini içeren tabaka, 2. katman yoğun fibrin tabakası ve 3. katman büyüme faktörlerini, kök hücreleri ve lökositleri içeren tabaka idi. 3. katman bu çalışmada kullanıldı⁷⁴. (Resim 5)



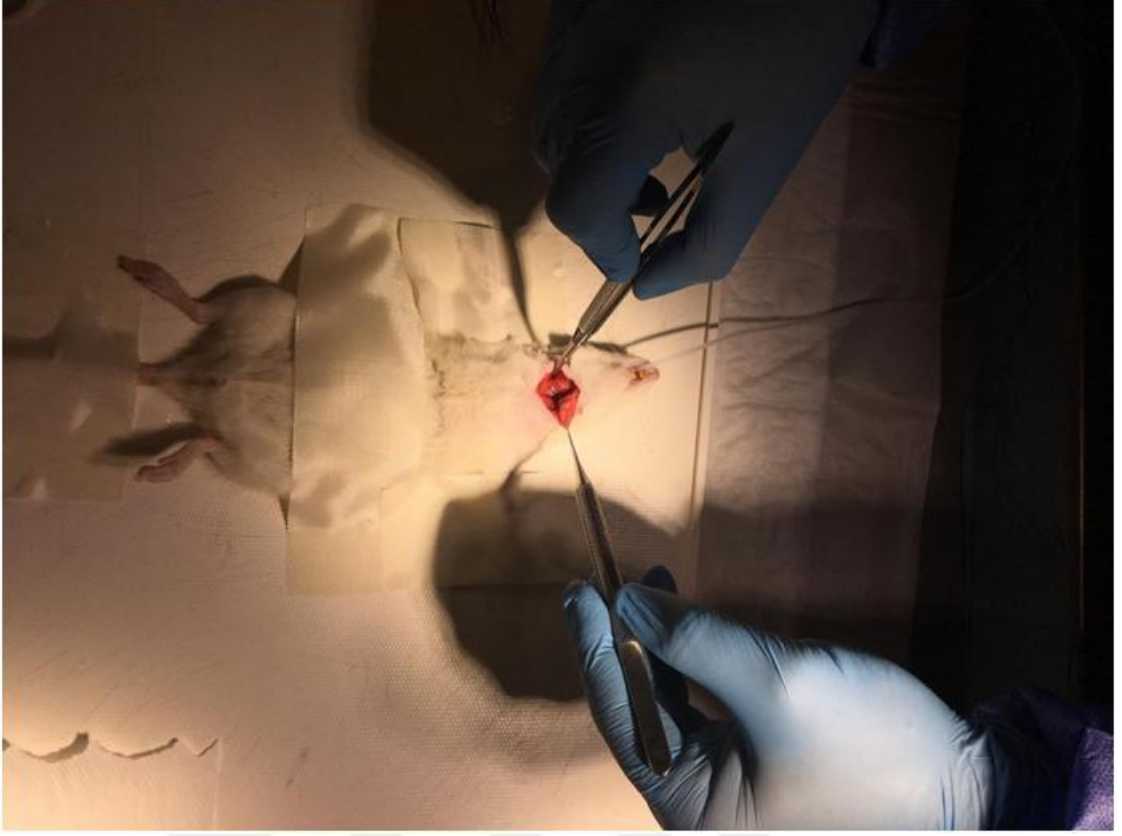
Resim 5. Santrifüj sonunda elde edilmiş tüp içinde PRF materyali

Hazırlanan CGF yalnız grup I'deki hayvanlarda, hazırlanan PRF yalnız grup II'deki hayvanlarda deri altına enjekte edildi. Grup III hayvanlarda ise sadece primer sütür kullanıldı.

Sıçanların hazırlanması ve deneysel işlem

Çalışmanın başında tüm sıçanlara 25 gauge iğne ile 40mg/kg Ketamin hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı; İstanbul, Türkiye) ve 5mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer; Leverkusen, Almanya) anestezi ilaçları hazırlandı ve intraperitoneal yol ile verilerek anestezi induksiyonu sağlandı. Anestezi sonrası trans oral yolla servikal özofagus kadar ince pediatrik nazogastrik sonda geçirildi.

Sıçanların boyun orta hattına 15 numara bisturiyle 3 cm dikey bir insizyon yapıldı (Resim 6). Deri ve deri altı dokuları geçtikten sonra, kaba diseksiyon kullanılarak sternohyoid kas görüldü ve ardından sternohyoid kasın lateralizasyonu ile hipofarenks ve servikal özofagus ortaya koyuldu (Resim 7). Hipofarenks ile servikal özofagus arasında 15 numara bisturiyle yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda vertikal insizyon yapıldı (Resim 8a ve 8b). FKF oluşturabilmek için bu insizyonlar 8.0 vikril sütür ile gevşek şekilde kapatıldı (Resim 9). Cilt insizyonu 4.0 ipek ile sütüre edildi (Resim 10).



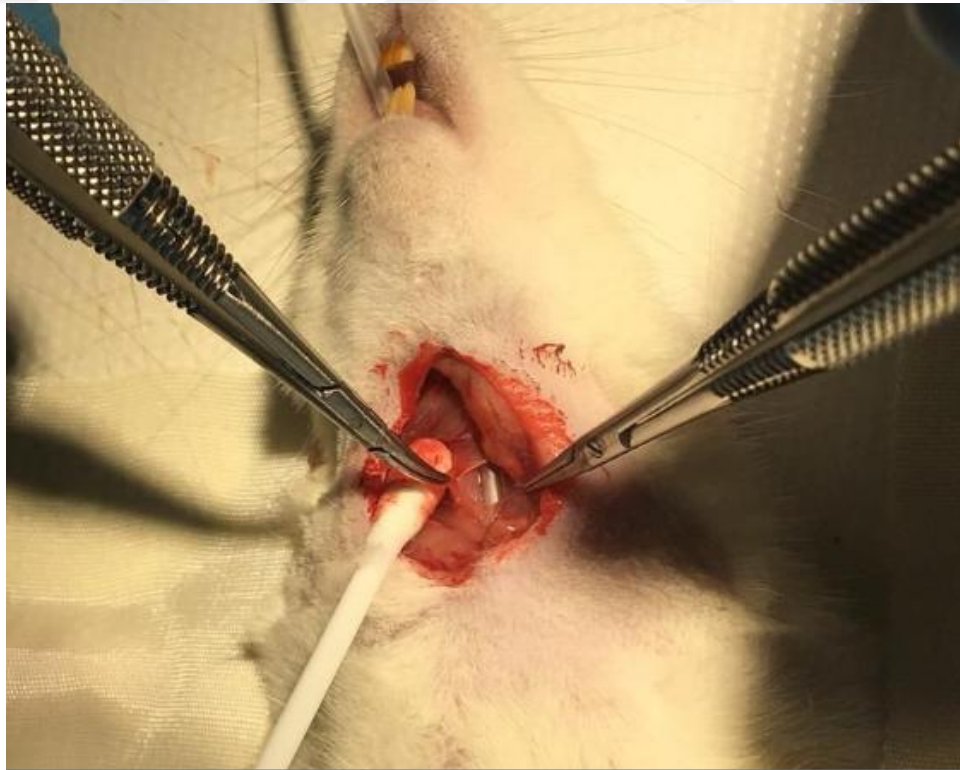
Resim 6. Servikal özofagusa kadar ince nazogastrik sonda geçirildikten sonra boyun orta hattayapılan 3 cm dikey bir insizyon.



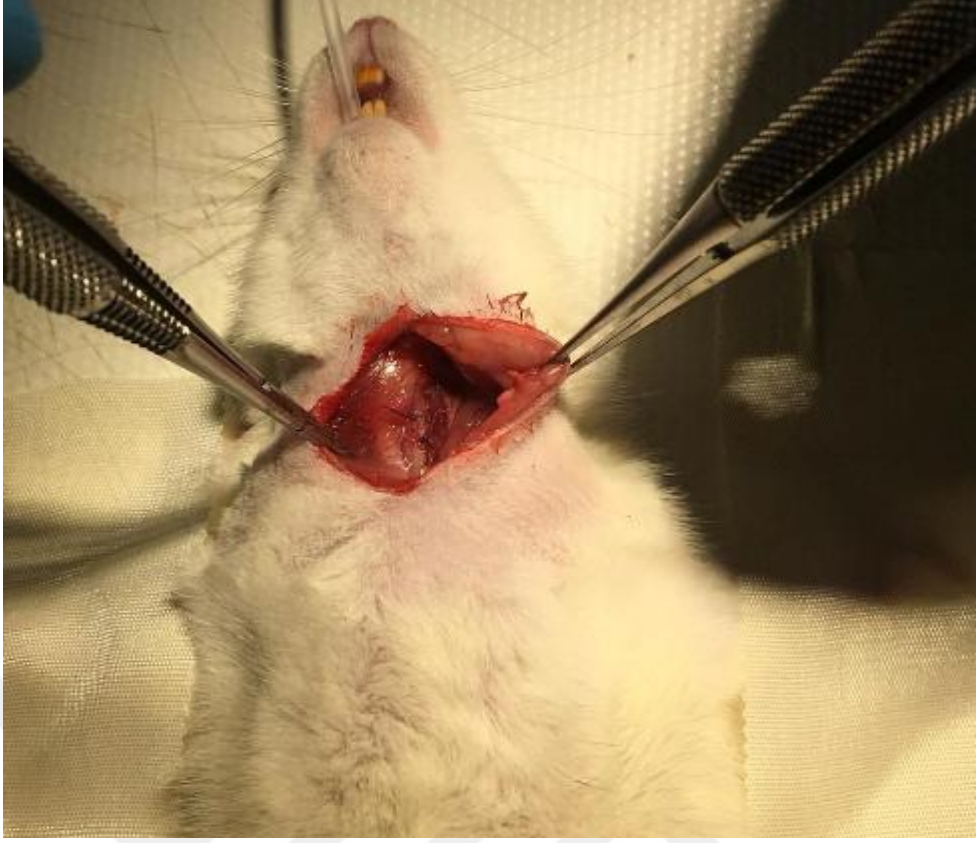
Resim 7. Deri ve deri altı dokuları geçildikten sonra, kaba diseksiyon kullanılarak sternohyoid kasın bulunması ve sternohyoid kasın lateralizasyonu ile hipofarenks ve servikal özofagusun ortaya konulması.



Resim 8a. Hipofarenks ile servikal özofagus arasına 15 numara bisturiyle yapılan yaklaşık 1,5 cm vertikal insizyon.



Resim 8b. Vertikal insizyonun genişletilmesi ve kanama kontrolü



Resim 9. Kontrollü FKF oluşturabilmek için insizyonların 8.0 vikril suture ile gevşek şekilde suture edilmesi.



Resim 10. Cilt insizyonunun 4.0 ipek suture ile suture edilerek kapatılması

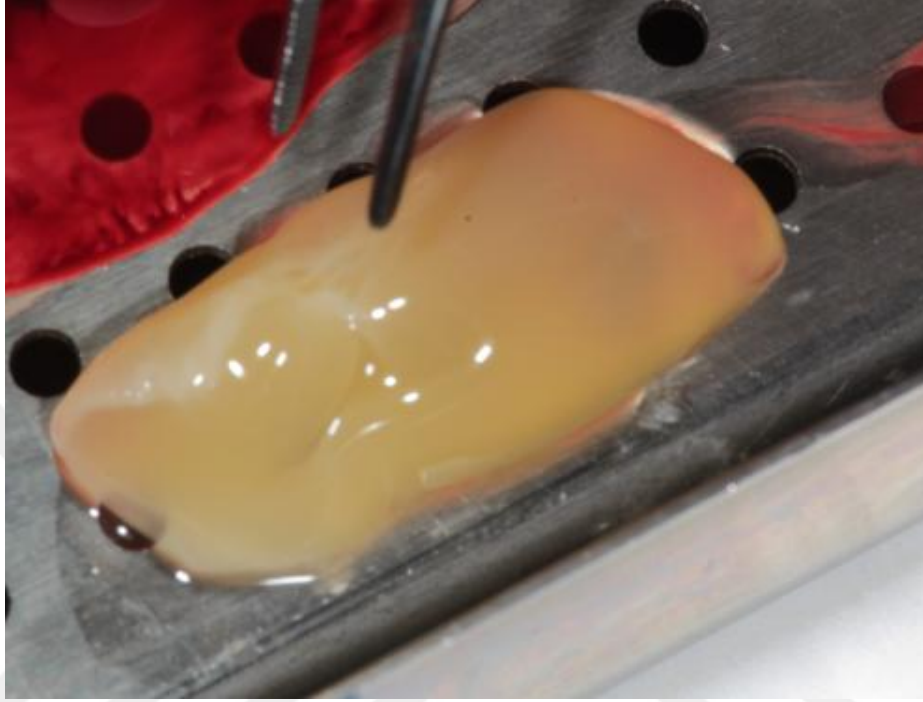
Grup I (Çalışma grubu-I): Sıçanların boyun orta hattına yaklaşık 3 cm, 15 numara bisturiyle dikey bir insizyon yapıldı. Deri ve deri altı dokuları geçildikten sonra, kaba diseksiyon kullanılarak sternohyoid kas görüldü ve ardından sternohyoid kasın lateralizasyonu ile hipofarenks ve servikal özofagus ortaya koyuldu. Ardından hipofarenks ve servikal özofagus arasında 15 numara bisturiyle yaklaşık 1,5cm dikey insizyon yapıldı. FKF oluşturabilmek için bu insizyon yeri 8.0 vikril suture ile gevşek şekilde kapatıldı ve üzerine Türk lokumu şeklinde dilimlenmiş CGF membranı yerleştirildi (Resim 11). Cilt 4.0 ipek ile suture edildi. FKF oluşturulan 10 sıçan, ameliyattan bir gün sonra başlanarak 14 gün boyunca deri altına 2 mg /kg /gün CGF enjekte edildi. Çalışma sürecinde grup I'de bir sıçan ex oldu ve çalışma sonu analizlere dahil edilmedi.



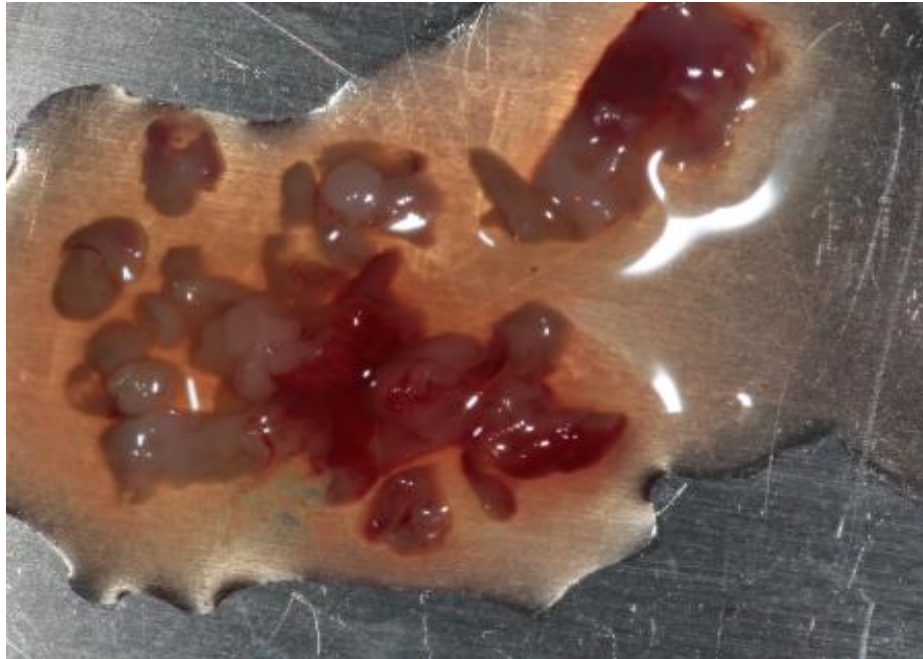
Resim 11. Türk lokumu gibi dilimlenmiş CGF membranının insizyon üzerine yayılması

Grup II (Çalışma grubu-II): Sıçanların boyun orta hattına 3 cm 15 numara bisturiyle dikey bir insizyon yapıldı. Deri ve deri altı dokuları geçtikten sonra, kaba diseksiyon kullanılarak sternohyoid kas içinden ve ardından sternohyoid kasın lateralizasyonu ile servikal özofagus ortaya koyuldu. Ardından hipofarenks ve

servikal özofagus arasında 15 numara bisturiyle 1,5cm dikey insizyon yapıldı.FKF oluşturabilmek için bu insizyon yeri 8.0 vikril sütün ile gevşek şekilde kapatıldı ve üzerine Türk lokumu şeklinde dilimlenmiş PRF parçası yerleştirildi. Cilt 4.0 ipek ile sütün edildi (Resim 12a ve 12b).FKF oluşturulan 10 sıçan, ameliyattan bir gün sonra başlanarak 14 gün boyunca deri altına 2 mg /kg /gün PRF enjekte edildi.



Resim 12a. Hazırlanmış blok PRF materyali



Resim 12b. Türk lokumu şeklinde dilimlenmiş PRF parçaları

Grup III(Kontrol grubu-III): Sıçanların boyun orta hattına 3 cm 15 numara bisturiyle dikey bir insizyon yapıldı. Deri ve deri altı dokuları geçildikten sonra, kaba diseksiyonkullanılarak sternohyoid kas görüldü ve ardından sternohyoid kasın lateralizasyonu ile özofagus ortaya koyuldu. Ardından hipofarenks ve servikalözofagus arasında 15 numara bisturiyle yaklaşık 1,5 cm dikey insizyon yapıldı. FKF oluşturabilmek için bu insizyon yeri 8.0 vikril suture ile gevşek şekilde kapatıldı. Cilt 4.0 ipek ile suture edildi. FKF oluşturulan 10 sıçan, 14 gün boyunca takip edildi. Çalışma sürecinde bu grupta 3 sıçan ex oldu ve çalışma analizine dahil edilmedi.

Uygulama başlangıcından 14 gün sonra tüm sıçanlara ötenazi uygulandı. Ötenazi sonrası hangi sıçana ne işlem yapıldığını bilmeyen, gruplara kör tutulan bir araştırmacı tarafından yara yeri kozmetik açıdan Vancouver Scar Scale kullanılarak değerlendirildi. Ardından sıçanlarda oluşan fistül bölgesi total eksize edilerek %10'luk formaldehit ile fikse edildi. Numuneler parafin bloklara alınarak 4 mm kalınlıkta bölünüp elde edilen spesimenler Hematoksilen-eozin ve Giemsa boyama ile daha önce sıçan larenksi üzerinde çalışması olan bir patoloğ tarafından mikroskopik incelemeye tabi tutuldu. Farenks, özofagus ve cilt arası fistül oluşumu makroskopik olarak fibroblast konsantrasyonu, kollajen oluşumu ve yüzey epitelizasyonu değerlendirildi ve skorlandı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için NCSS (NumberCruncher Statistical System) Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, medyan, sıklık, oran) yanısıra değişkenlerin normal dağılıma uygunluklarında ShapiroWilk test ve boxplot grafikler kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Dunn test, ikili grup karşılaştırmalarında Mann Whitney test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher Freeman Halton test kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

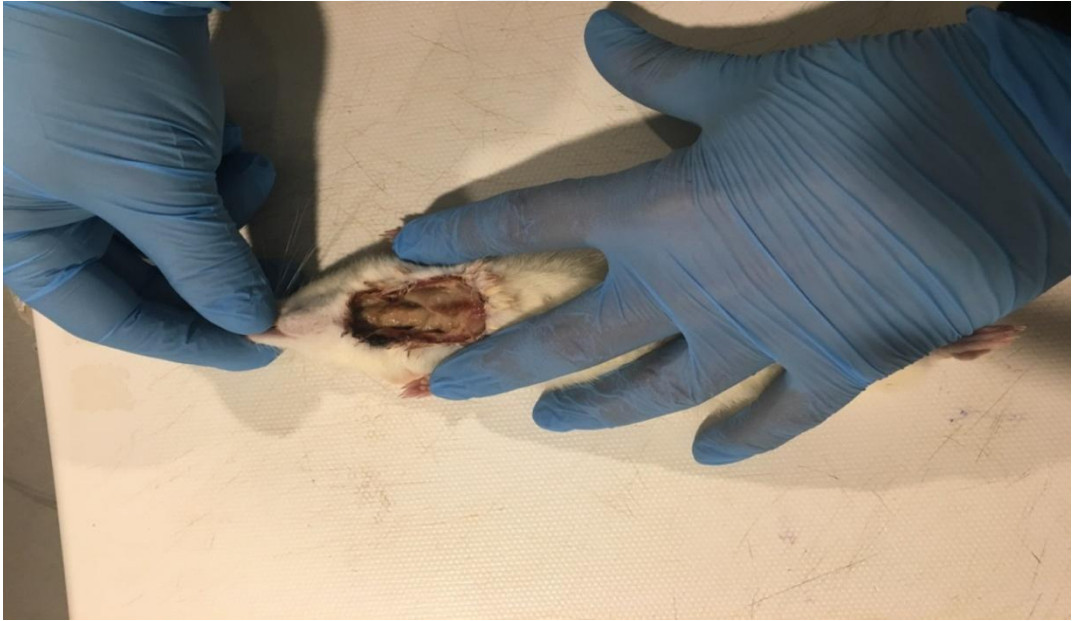
4. BULGULAR

Bu çalışmada histolojik değerlendirmede üç farklı grup dört mikroskobik parametre ile karşılaştırıldı. 14 gün sonunda makroskopik olarak apse, ülser ve fistül ağzının iyileşmesinin ve mikroskobik olarak granülasyon dokusunun varlığı, kollajen oluşumu, fibroblast miktarı ve inflamasyon şiddeti bakımında fark olup olmadığına bakılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

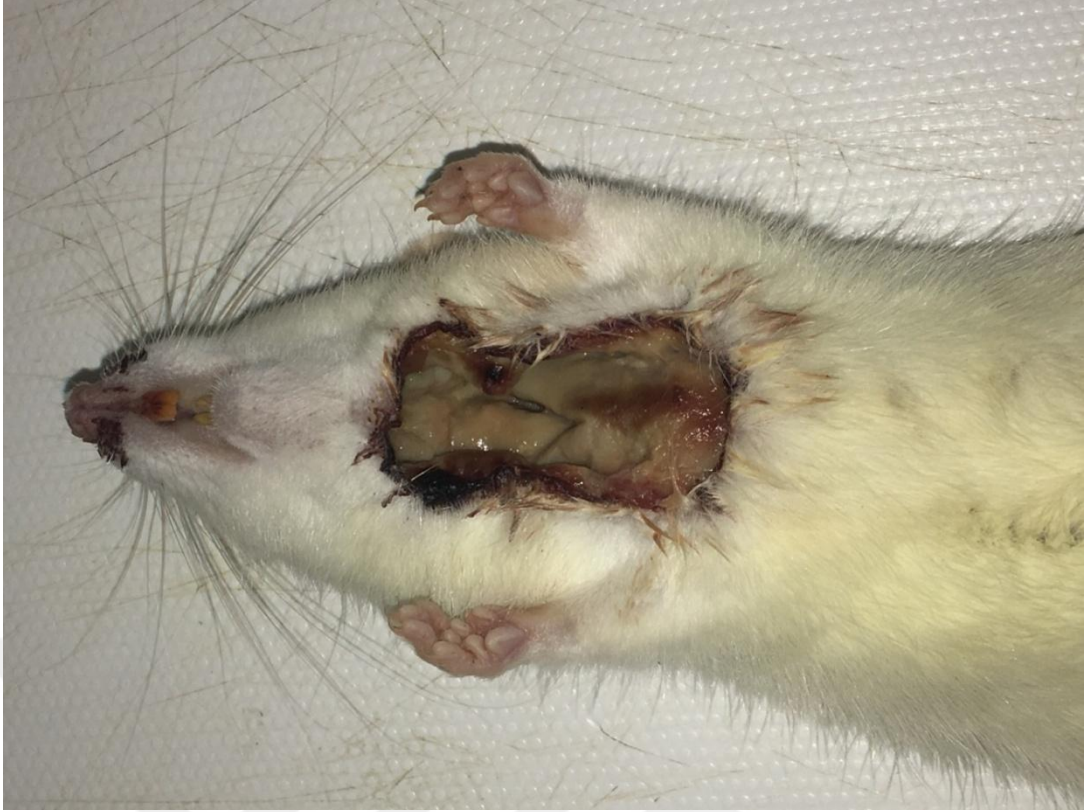
Makroskopik FKF değerlendirmesi

Her bir sıçanda boyunda açıklık, tükürük ve gıda artıklarına dikkat edilerek makroskopik değerlendirilme not edildi.

Grup I'de 10 sıçandan yalnız birinde, grupII'de üç ve kontrol grubunda beş sıçanda fistül ağzı gözlemlendi. Fistül olan hayvanlarda ülser, apse ve yemek artıkları izlendi. Makroskopik değerlendirmelerinde apse, ülser ve fistül ağzı görülme oranlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). Ancak CGF grubunda hem toplam apse formasyonu hem de fistül ağzının az görülmesi ($n=1$) dikkat çekicidir (Tablo 3)(Resim 13a ve 13b).



Resim 13a. Araştırmacı tarafından servikal bölgede gösterilen geniş ülser alanı

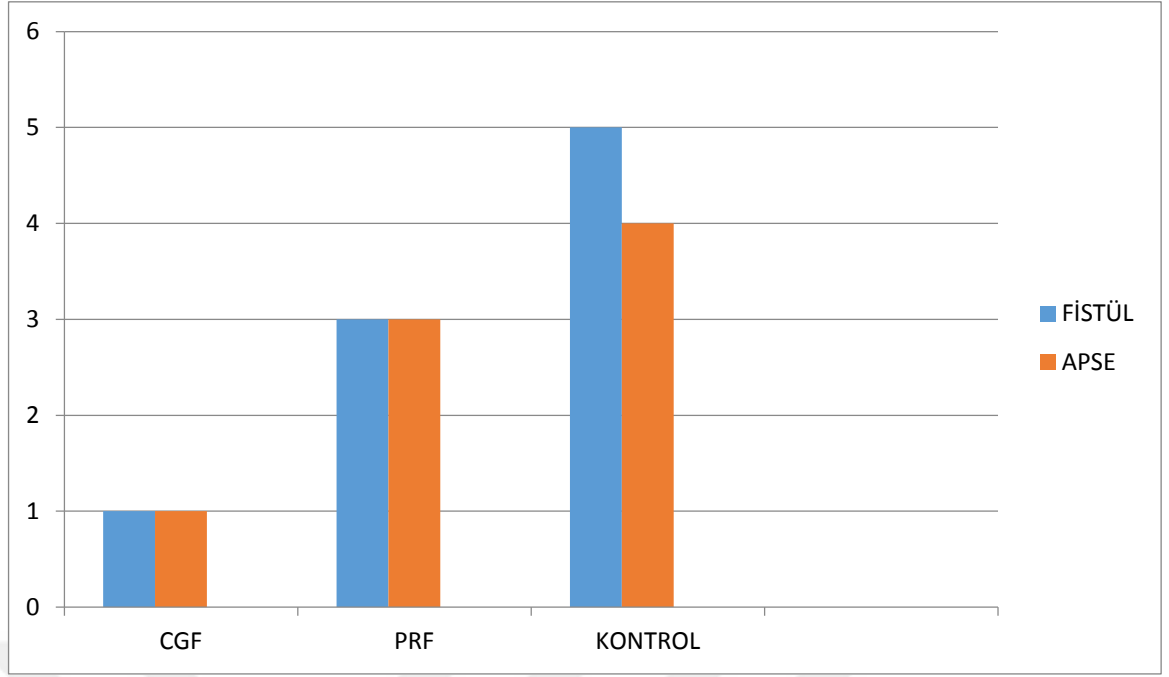


Resim 13b. Makroskopik olarak apse, fistül ağzı ve ülserin yakından görünümü

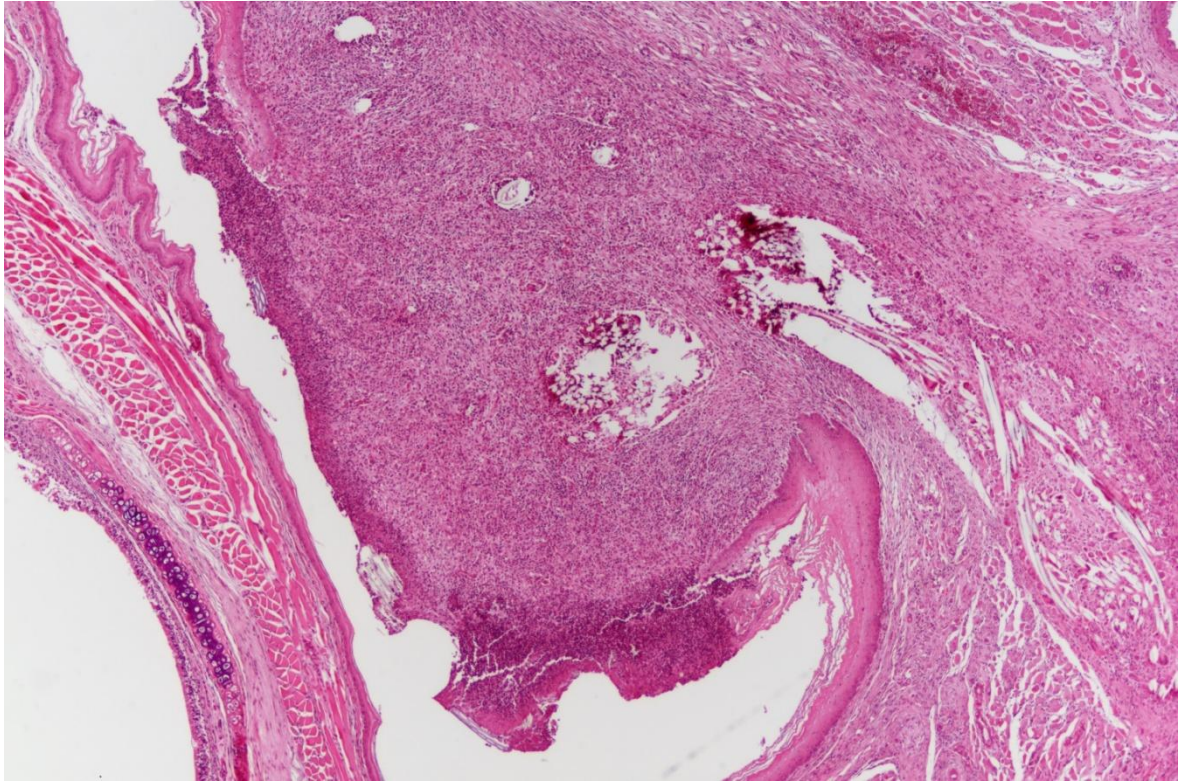
Tablo 3.Gruplara göre makroskopik değerlendirme sonuçları

		CGF	PRF	Kontrol	p
Makroskopik	Apse	1(10)	3(30)	4(50)	^a 0.196
Değerlendirme	Ülser	4(40)	4(40)	5(62.5)	^a 0.707
n(%)	Fistül Ağzı	1(10)	3(30)	5(62.5)	^a 0.081

^aFisher Freeman Halton test, CGF Concentrated growth factor, PRF Platelet-rich fibrin



Grafik 1.Gruplara göre fistül ve apse dağılımı



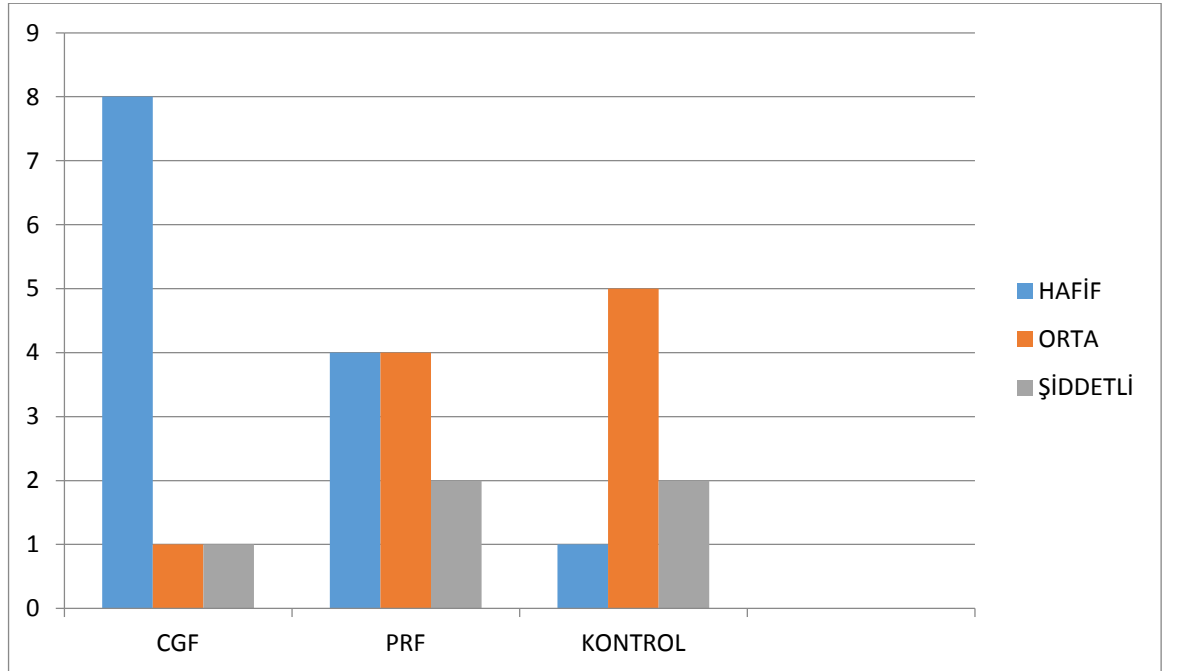
Resim 14. Hematoksilen-eozin boyamada ülser, yoğun inflamasyon alanı ve iltihabi granülasyon dokusuna ait mikroskop altındaki görüntü

Mikroskobik FKF değerlendirmesi

İnflamasyon şiddeti: Mikroskobik incelemede, iltihabın her üç grup arasında yoğunluğuna bakıldı. (Resim 16) İltihap yoğunluğu üç derece üzerinden değerlendirildi. 1. derece hafif inflamasyon, 2. derece orta inflamasyon ve 3. derece ise şiddetli inflamasyon değeri olarak yorumlandı. Her üç grupta inflamasyon şiddetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0.05$). Bu anlamlı farkın CGF deneklerindeki düşük inflamasyon sayısının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde fazla olmasından kaynaklanmaktadır ($p=0.021$). Diğer grupların ikili değerlendirmeleri arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). (Tablo 4) (Grafik 2)

Tablo 4. Gruplara göre inflamasyon şiddeti

		CGF	PRF	Kontrol	<i>p</i>
İnflamasyon şiddeti(%)	Hafif	8(80.0)	4(20.0)	1(13.5)	
	Orta	1(10.0)	4(30.0)	5(62.5)	
	Şiddetli	1(10.0)	2(50.0)	2(25.0)	
	<i>Medyan (IQR)</i>	1 (0.25)	2.0 (1.25)	2 (0.75)	^b 0.032*



Grafik 2. Gruplara göre inflamasyon şiddetinin dağılımı

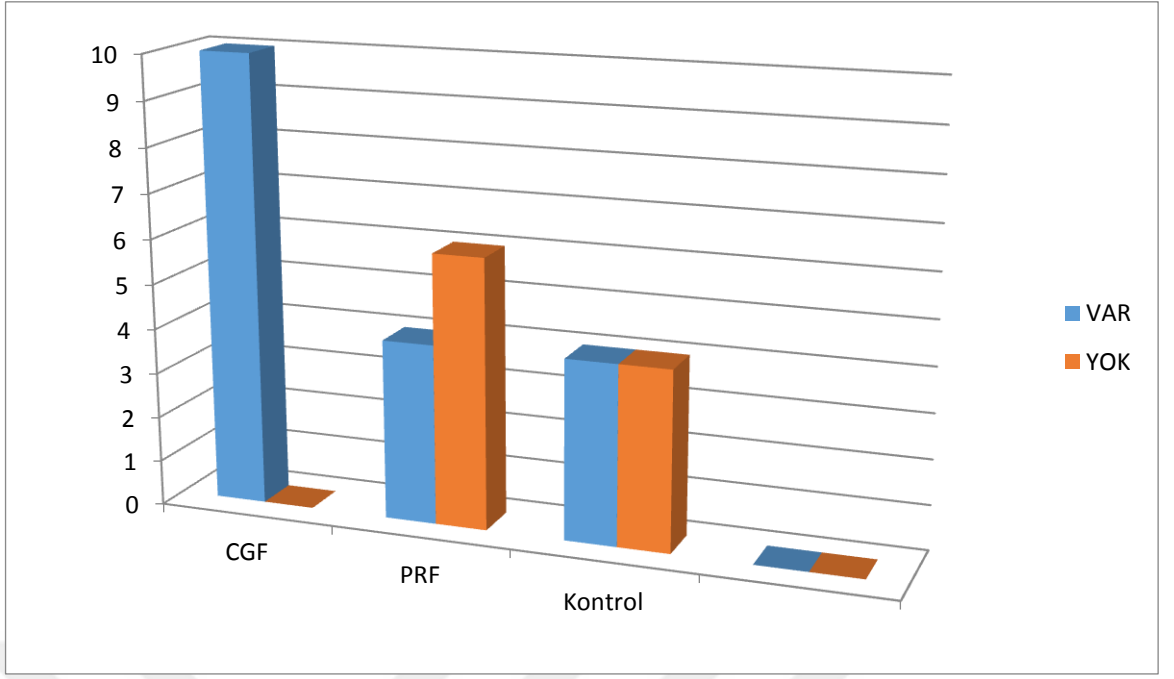
Granülasyon dokusu: Histopatolojik incelenmede granülasyon dokusu görülüp görülmemesine göre iki kategoride değerlendirildi. Gruplara göre granülasyon doku oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p < 0.05$). İkili karşılaştırmalara bakıldığında bu anlamlı farkın, CGF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde fazla sayıda granülasyon varlığı görülmesinden kaynaklandığı görüldü ($p = 0.023$). Diğer grupların ikili değerlendirmeleri arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p > 0.05$). Ayrıca grup I'de tüm deneklerde granülasyon dokusu görülmesi de dikkat çekicidir. (Tablo 5) (Grafik 3) (Resim 15 ve 16)



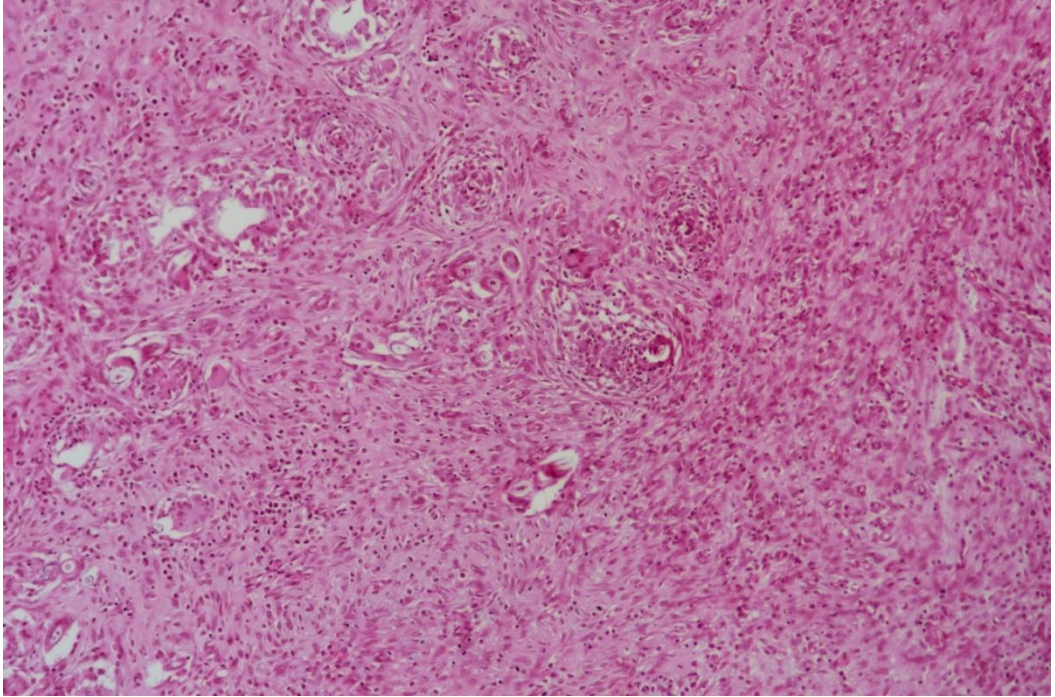
Resim 15. Dekapitasyon sonrası CGF kullanılan bir sıçanda yara iyileşmesi ve granülasyon dokusuna ait görsel

Tablo 5. Gruplara göre granülasyon dokusunun varlığı

		CGF	PRF	Kontrol	p
Granülasyon Dokusu (%)	Yok	0(0)	4(40.0)	4(50.0)	<i>0.036*</i>
	Var	10(100)	6(60.0)	4(50.0)	



Grafik 3. Gruplara göre granülasyon doku varlığının dağılımı

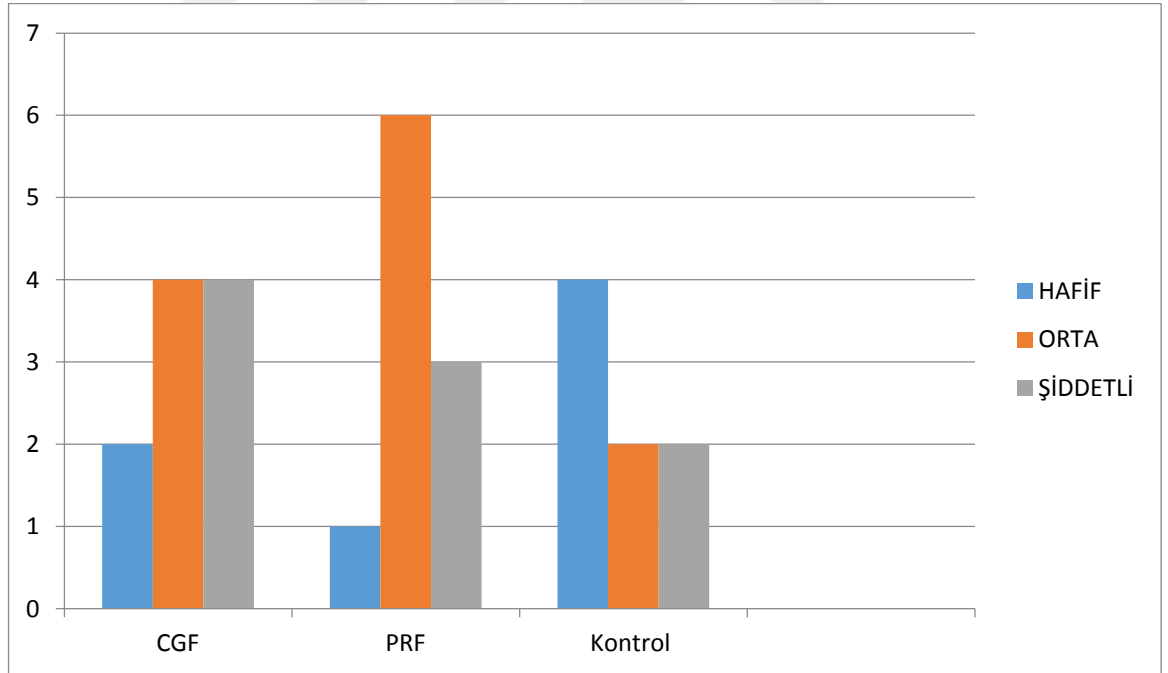


Resim 16.İltihabi granülasyon dokusuna ait mikroskopik görüntü

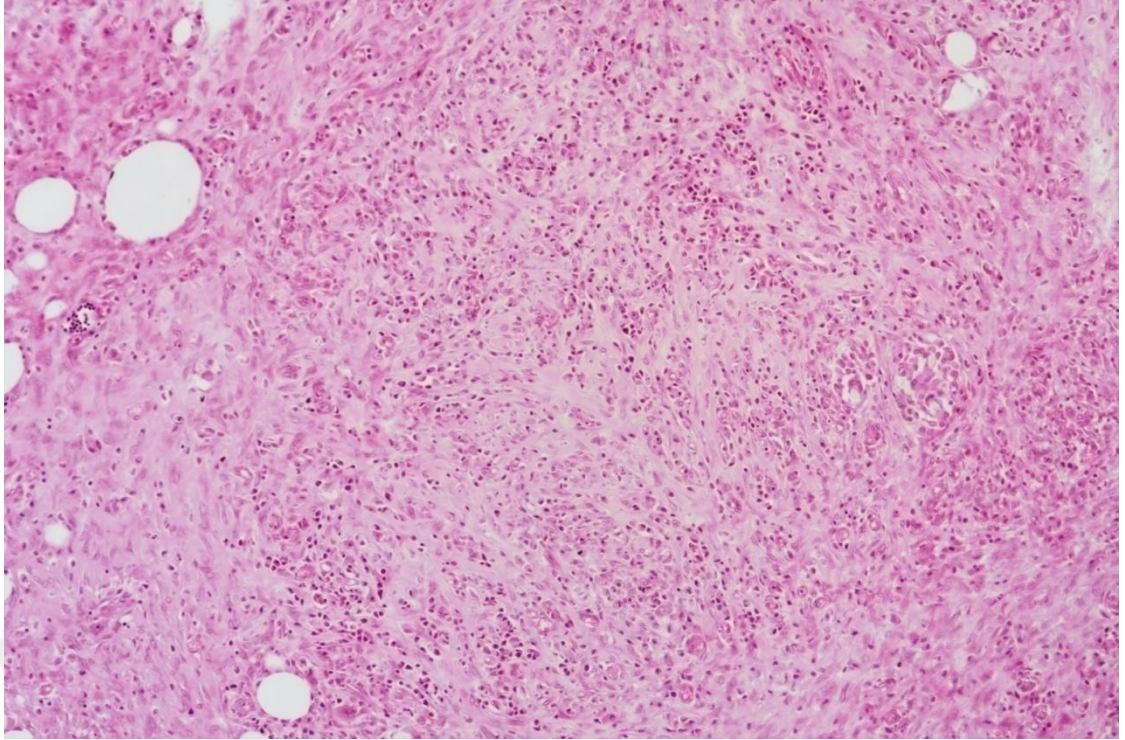
Kollajen miktarı: Kollajen dağılımı üç derece üzerinden değerlendirildi. 1.derece hafif kollajen oluşumu, 2 derece orta düzey kollajen oluşumu ve 3. derece şiddetli kollajen oluşumu şeklinde değerlendirildi. (Şekil 21 ve 22) Gruplara göre kollajen miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Ancak CGF ve PRF gruplarında kontrol grubuna göre orta ve şiddetli derecedeki kollajen bulgusundaki artış dikkat çekmektedir. (Tablo 6) (Grafik 6) (Resim 17 ve 18)

Tablo 6. Gruplara göre kollajen miktarı

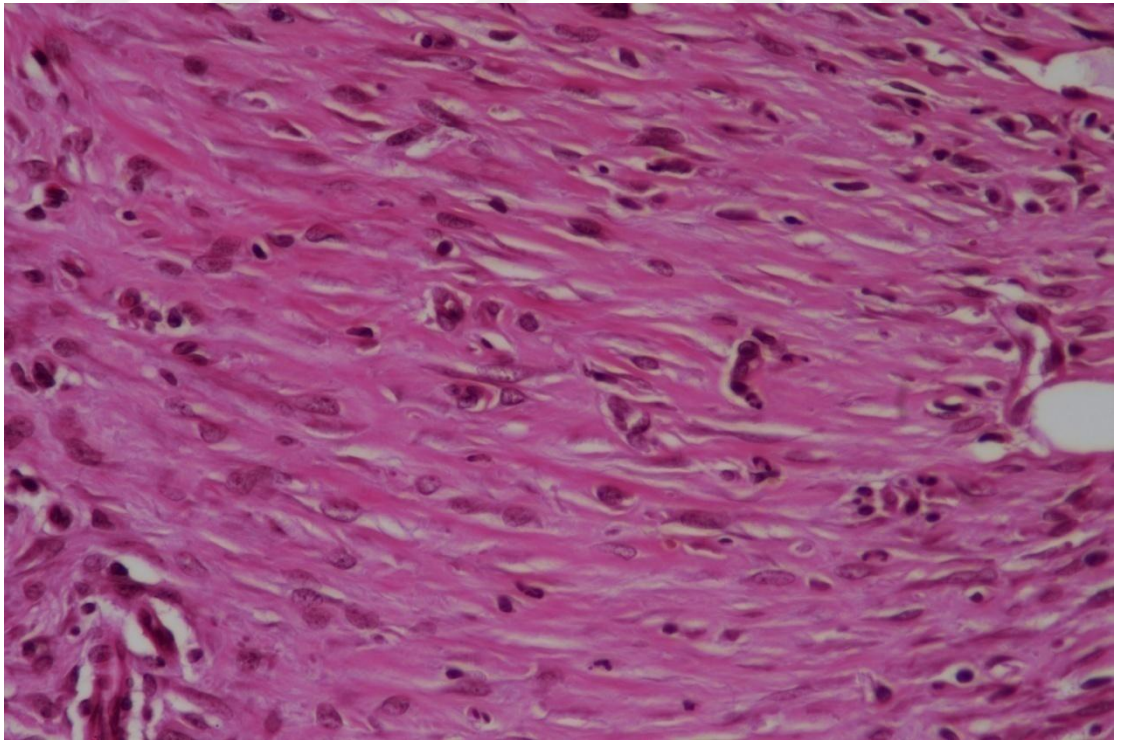
		CGF	PRF	Kontrol	p
Kollajen Miktarı(%)	Hafif	2(20.0)	1(30.0)	4(25.0)	^b 0.396
	Orta	4(40.0)	6(60.0)	2(50.0)	
	Şiddetli	4(40.0)	3(10.0)	2(25.0)	
	<i>Medyan (IQR)</i>	2 (1.25)	2(1)	2 (1.5)	



Grafik 6. Gruplara göre kollajen oluşum şiddetine göre dağılım



Resim 17. Şiddetli derecede kollajenizasyon ve orta derecede fibroblast varlığının olduğu bir kesite ait mikroskopik görüntü



Resim 18.Orta derecede kollajenizasyon ve az sayıda fibroblast varlığının olduğu bir kesite ait mikroskopik görüntü

Fibroblast miktarı: Fibroblast yoğunluğu üç kategori üzerinden değerlendirildi. 1. derece az fibroblast oluşumu, 2. derece orta fibroblast oluşumu ve 3. derecede çok yoğun miktarda fibroblast oluşumu olarak değerlendirildi. Gruplara göre fibroblast miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Ancak ikili karşılaştırmalarda CGF ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p=0.034$). (Tablo 7) (Grafik 5) (Resim 19)

Tablo 7. Gruplara göre fibroblast miktarı.

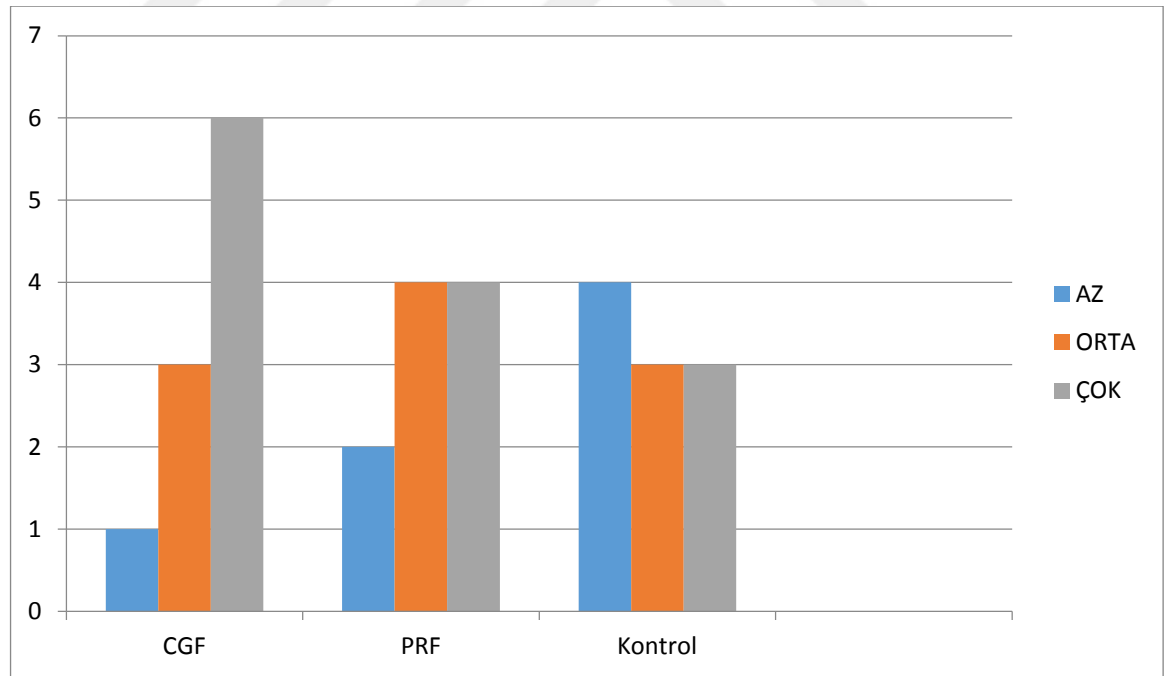
		CGF	PRF	Kontrol	p
Fibroblast Miktarı(%)	Az	1(10.0)	2(20.0)	4(50.0)	
	Orta	3(30.0)	4(40.0)	3(37.5)	
	Çok	6(60.0)	4(40.0)	1(12.5)	
	<i>Medyan (IQR)</i>	3 (1)	2 (1.25)	1.5 (1)	^b 0.070

^aFishe rFreeman Halton test
** $p<0,01$

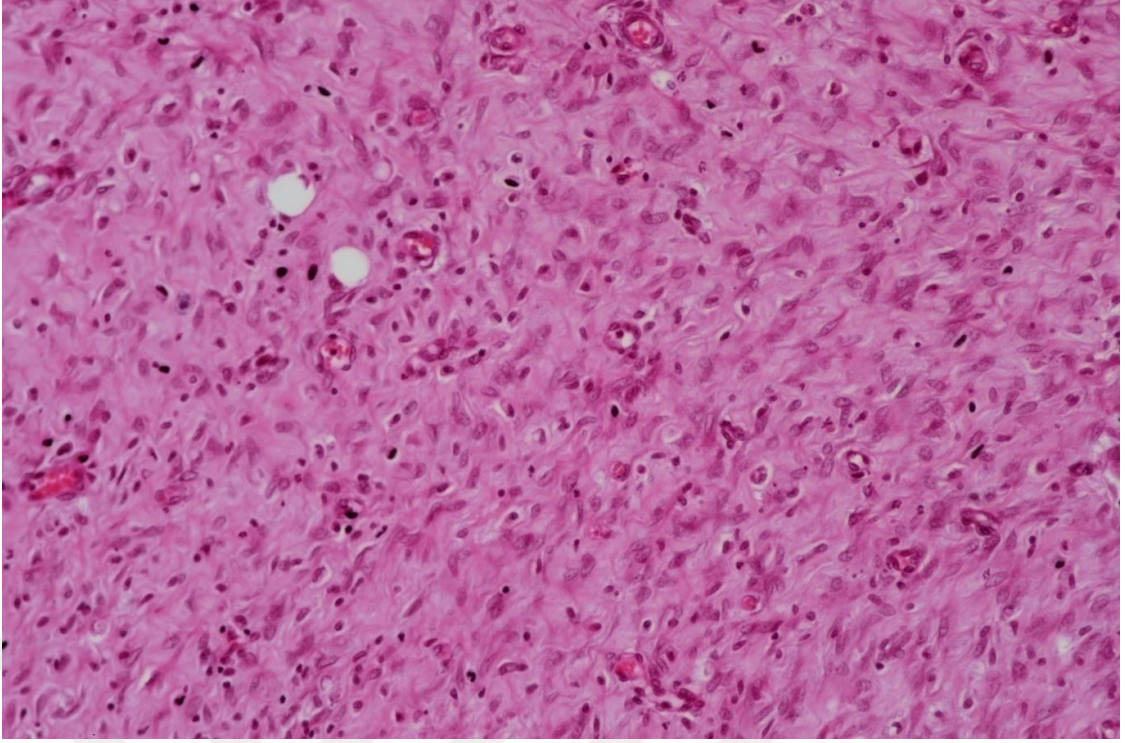
^bKruskal Wallis test

IQR interquartilerange, * $p<0,05$

CGF Concentrated growth factor, PRF Platelet-rich fibrin



Grafik 5.Gruplara göre fibroblast yoğunluğu



Resim 19.Orta derecede fibroblast varlığını gösteren mikroskopik görüntü

5. TARTIŞMA

Son iki dekatta LK hastalarında organ koruyucu tedavi yöntemlerin artış göstermesi yönünde ilerleme görülmüş ve hastalara daha çok KT, RT ayrı ya da KT+RT tedavi yöntemleri seçilmeye başlanmıştır. Ancak bu tedavilerin sonrasında gelişen nükslerde kurtarma cerrahisi olarak yapılan TL komplikasyonları daha ağır olup agresif seyir göstermekte ve FKF insidansında artış görülmektedir⁷⁵. TL sonrası en sık görülen komplikasyon da FKF'dir⁷⁶. Yara iyileşmesinde ve FKF kapanmasında gecikmeye bir çok faktörün neden olduğu iddia edilmektedir, bu faktörler: hastanın diyabetik olması, KT ve RT öyküsü, ağır anemi, postoperatif hipovolemi gelişmesi, pozitif cerrahi sınır bırakılması, kötü yara bakımı, boyun diseksiyonu yapılmış olması olarak bildirilmiştir¹. Amilaz artışının da FKF için prediktif bir rol oynadığı gösterilmiştir⁷⁷

TL sonrası Jeannon et al.⁷⁸ tarafından yapılan bir çalışmada FKF olan hastalarda metisilin dirençli Staf. Aureus arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Genellikle TL sonrası FKF oluşumunun azaltılması için birçok klinisyen oral beslenmenin 7-10. günler arasında veya daha geç başlanmasını tercih eder. Ancak Saydam ve ark. ile Soylu ve ark.^{79,80} ameliyat sonrası ilk günden itibaren hastalarda oral beslenmeye başlanmış ve fistül gelişmediğini bildirmişlerdir. Souse ve ark.⁸¹ da erken oral beslenmenin FKF insidansının etkisinin olmadığını savunmuştur. Bununla birlikte FKF oluşumu ve oral beslenme arasında ilişkiye yönelik 2007 yılında National Otolaryngology sempozyumunda sunulan bir çalışmada ameliyat sonrası 2.ve 3. günlerde başlanan oral beslenme ile 7.gün oral beslenme arasında hiçbir farkın olmadığı hipotezi öne sürülmüştür⁸². Stephenson ve ark.⁸³ ameliyat öncesi proton pompa inhibitörü kullanımının FKF insidansını azalttığını öne sürmüşlerdir.

FKF tedavisinin standart bir yöntemi olmamasına rağmen iv antibiyotik tedavisi, oral beslenmenin kesilmesi, yara yerinin debridmanı, bununla birlikte tükürüğün yara yerine temasının azaltılması için tükürüğün ağızdan dışarı atılması, botulinum toksin, anti kolinerjik kullanımı, montgomery salivaj tüpü kullanılması gibi yaklaşımlarla iyileşme hızlandırılmaya çalışılır^{4,5}. Bütün bu çabalara rağmen, hastaların %30'unda FKF kapanmaz, persiste olur ve cerrahi yöntemlerle

rekonstrüksiyon gerekebilir^{23,24}. Bu yöntemler içinde pektoralis major, deltopektoral kas-cilt flepleri ya da serbest flepler kullanılarak FKF kapatılmasına çalışılır^{86,87,88,89}.

Literatür araştırıldığında, Galli ve ark.⁹⁰ oral faringokutanoz sintigrafi kullanarak FKF kapatılmasında başarılı sonuçlar bildirmişlerdir. FKF kapatılmasında Wisman ve ark.²³ fibrin glue kullanarak hastalarda fistülün tamamen kapandığını bildirmişlerdir. FKF'nin kapatılmasına yönelik sınırlı çalışmalardan birinde rekombinan PDGF-BB olan beçplerini iki hastada topikal olarak kullanılmış⁹¹ ve bir diğerinde Weisset al.⁹² fibrin-trombin kaplı kollajen yama olan TachoSİL kullanarak üç hastada FKF kapanmasının ve yara yeri iyileşmesinin tüm hastalarda daha hızlı ve kolay olduğunu göstermişlerdir.

Yara iyileşme çalışmalarında ana hedef ilk olarak yara iyileşmesini hızlandırmak aynı zamanda skar oluşumunu azaltmak, ikincisi yeni cilt derisini eski cilt derisi kalitesine yakın kalitede oluşturmak ve üçüncüsü rejenerasyon sürecini tetikleyen sinyalleri artırmaktır. Bu üç hedefe ulaşmak için, yara enfeksiyonu ve sıvı kaybına karşı bariyer sağlayarak epidermal rejenerasyon için uygun ortam olması gerekmektedir. Bu ortamın oluşması için farklı biyolojik ve sentetik yara pansumanları geliştirilmiştir^{93,94}.

Çalışmamızda daha az invaziv bir yöntem ile fistülün kapatılması için rejenerasyon, epitelizasyon, kollajen ve granülasyon dokularının artışı sağladığı bildirilen trombosit kaynaklı faktörlerden olan CGF ve karşılaştırmak için de PRF kullanarak FKF iyileşmesindeki etkilerini karşılaştırdık. FKF ile ilgili sürdürülmüş çok az çalışma içinde çalışma metodolojimize yakın bulduğumuz deneysel bir çalışmada, Küçük ve ark.⁹⁵ sıçanlarda FKF kapatılmasında rekombinant human growth hormon (GH) enjeksiyon etkinliğini araştırmışlardır. Bilindiği gibi GH'nun kollajen, granülasyon üretimini ve aynı zamanda rejenerasyonun ve epitelizasyonu artırdığı gösterilmiştir^{96,97,98,99,100,101}. Çalışma gruplarımızda da bu çalışmayla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda, FKF iyileşmesinde CGF ve PRF verilen gruplarda kollajen oluşumu kontrol grubuna göre anlamlı olmasa da yüksek olduğu görüldü. CGF ve PRF kullanılan grupta şiddetli ve orta derecede kollajen oluşumu fazla görüldüğü halde kontrol grubunda hafif derece kollajen oluşumu fazla görüldü. Kollajen oluşumu yara iyileşmesinin ve FKF kapatılmasının önemli göstergelerinden biri olarak, kontrol grubunda iyi ölçüde olmadığı görüldü.

Çalışmamızda denekler sakrifiye edildikten sonra boyun bölgesinde tükürük ve yemek artıkları, apse, ülser ve fistül ağzının olup olmadığı değerlendirildi. CGF kullanılan grupta yalnız bir sıçanda fistül ağzı görülürken PRF grubunda üç ve kontrol grubunda ise beş sıçanda fistül ağzı görüldü. Apsenin oluşumu da paralel bir şekilde CGF grubunda yine yalnız bir sıçanda, PRF kullanılan grupta üç ve kontrol grubunda ise dört sıçanda görüldü. Bu veriler CGF'nin yara iyileşmesinde olumlu rol oynadığını düşündürmektedir.

Bilindiği gibi granülasyon fazı yara yerinin iyileşmesinin ortalama 4.gününde başlamaktadır. Granülasyonun başlamasıyla birlikte fibroblast ve fibronektin miktarlarında da anlamlı şekilde artış gerçekleşir^{102,103}. Çalışmamızda granülasyon dokusu CGF kullanılan tüm sıçanlarda görüldü ancak PRF grubunda altı ve kontrol grubunda ise yalnız dört sıçanda görüldü. Granülasyon dokusunun artışı fibroblast aktivitesini tetikler ve yara kavitesinin kapanmasını sağlar^{102,103}. Bizim çalışmamızda da fibroblast miktarına göre kontrol grubu ile CGF grubu ile anlamlı ve PRF grubu ile dikkat çekici bir fark olması trombosit kaynaklı faktörlerin yara iyileşmesinde farklı düzeylerde ama olumlu etkisine işaret etmektedir.

Yara iyileşmesinde 4.gün sonunda kronik iltihabi hücre sayısında artış görülmeye başlanır ve yeterli kan akımı gerçekleşmez ise yara bölgesinde inflamasyon ve ülserasyon artar¹⁰². Bizim çalışmamızda CGF ve PRF gruplarında inflamasyon şiddetinin düşük olması dikkat çekicidir ancak kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Denek sayısı anlamlı bir sonuç elde etmek için yetersiz kalmış olabilir.

FKF ile ilgili çalışmalardan biri olan Shih An Liuet al.¹⁰³ yaptığı çalışma dikkat çekicidir. Bu çalışmada deneysel FKF oluşturulduktan sonra bir grup sıçana vikril, ikinci gruba prolen, üçüncü grup ise vikril ile sütüre edilip eş zamanlı sütür üzerine fibrin glu enjekte edilmiştir. Yedi gün sonra prolen kullanılan grupta, vikril kullanılan gruba oranla daha az fistül oluştuğunu göstermiştir. Bu çalışmada Sprague-Dawley sıçanları kullanılmış ve ortalama üçüncü gün fistül oluşmuştur. Çalışmamızda da Sprague-Dawley sıçanları kullandık ve ilk FKF oluşumunu yaklaşık üçüncü günde gözlemledik. Bu çalışmada yapılan FKF oluşturma modeli vesütür teknikleri bizim yaklaşımımız ile oldukça benzerdir. Küçük ve ark.⁹⁵ yaptığı çalışmada sıçanlarda özofagusun büyük anatomili memelilere göre çok ince ve dar

olması nedeni ile cerrahi işlem sırasında özafagusun bulunması, tam kat dikilmesi ve post operatif beslenme zorlukları yaşandığına dikkat çekmişlerdir. Ancak Liu et al.¹⁰³ yöntemlerinin pratik bir model olduğunu belirtmekle birlikte kendi çalışmamızda da cerrahi işlemlerle hipofarenks ve servikal özafagusun bulunması, insizyon ve sütürlerin yapılması,CGF ve PRF hazırlanmasıyla ilgili daha önce sıçan larenksi ile ilgili farklı birkaç çalışma tecrübesine sahip olmamıza rağmen cerrahi işlemler kısa sürede ve işleme bağlı perop ve erken postop hayvan kaybı yaşanmadan çalışma tamamlanmıştır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, sıçanlarda FKF üzerine yapılacak çalışmalarda kullandığımız metodolojinin başka çalışmalar için teşvik edici bir özelliğe sahip olduğunu düşünmekteyiz.



6. SONUÇ

1. Sıçanlardan intrakardiyak yolla alına kandan doğru santrifüj protokolü seçilerek yeterli CGF ve PRF elde edilebilir.
2. Sıçanlarda FKF modelinin yaratılması kolay ve maliyeti düşük olan bir işlemdir.
3. CGF ve PRF elde edilmesi kolay, maliyeti düşük ve komplikasyon riski azdır.
4. Deney hayvanlarında CGF ve PRF nin jel kıvamında olması bu ürünlerin yara yerine manipule edilmesi ve yerleştirilmesi kolaydır.
5. FKF modelinde makroskopik olarak CGF grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olumlu sonuç görülmüştür.
6. CGF grubunda granülasyon dokusu kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü.
7. Kollajen ve fibroblast oluşumu CGF grubunda kontrol grubuna oranda daha fazla olduğu izlendi.
8. İnflamasyon açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi.
9. Komplikasyon riskinin, maliyetinin, elde edilmesinin pratik oluşu ve uygulanma şeklinin kolay olması aynı zamanda rejenerasyonu doğal ve sağlıklı şekilde gerçekleştirmesi CGF’yi ve trombositten zengin ürünlerin fistül ve yara yeri iyileşmesinde başarılı sonuçlar verebildiğini göstermiştir.
10. Baş boyun cerrahisinde, rekonstrüksiyon cerrahisinde, defekt onarım cerrahisinde trombositlerden zengin ürünler başta CGF olmak üzere klinik uygulamalarla kullanım alanı bulabilecek yöntemler olabileceğini düşünmekteyiz.

Trombositten zengin ürünlerden özellikle CGF’nin biyouyumlu oluşu ile birlikte FKF oluşumunun azaltılması ve yara iyileşmesinde yararlı bir alternatif olarak umut vaat ettiğini düşünmekteyiz.

CGF’nin FKF önlenmesi ve tedavisinde etkinliğinin prospektif klinik çalışmalarla da araştırılması yararlı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Aslam M. J., Ahmed Z., Aslam M.A. Complications of total laryngectomy. *Pak J MedSci*. 2006; 22(1):33-7.
2. Gallo A, Moi R, Simonelli M, Vitolo D, Fiorella ML, Marvaso V et al. Salvage resection after previous laryngeal surgery: total laryngectomy with en bloc resection of the overlying cervical skin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 127(7):786-9.
3. 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(5):587-92.
4. Ganly I, Patel S, Matsuo J, Singh B, Kraus D, Boyle J et al. Postoperative complications of salvage total laryngectomy. *Cancer*. 2005;103(10):2073-81.
5. Áwengen DF, Donald PJ Complications of radical Neck dissection. In: Shockley WW, Pillsbury III HC (eds) *The neck. Diagnosis and Surgery*. Missouri: Mosby, 1994:483-509.
6. Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, Hirvikoski PP, Johansson RT, Kosma VM. The incidence and etiology of postlaryngectomy pharyngocutaneous fistulae. *HeadNeck*. 2001;23(1):29-33.
7. Volling P, Singelmann H, Ebeling O. Inzidenz von Speichelfisteln in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der oralen Ernährung nach Laryngektomie [Incidence of salivary fistulas in relation to timing of oral nutrition after laryngectomy]. *HNO*. 2001 ;49(4):276-82.
8. Palomar-Asenjo V, Sarroca Capell E, Tobías Gómez S, Pérez Hernández I, Palomar-García V. Fístula faringocutánea tras laringectomía total. Estudio de casos y controles de los factores de riesgo implicados en su aparición [Pharyngocutaneous fistula following total laryngectomy. A case-control study of risk factor 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;10(1):283-302.
10. 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. *HeadNeck*. 2003;25(9):711-6.
11. Eren G, G. Atilla G. Lökosit ve trombositlerin zengin fibrinin özellikleri ve diş hekimliğinde kullanım alanları. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2014; 48(2): 73-83.
12. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001;42(55): 62.
13. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101(3):37-44.
14. Farzaneh Lal Alizade, Mustafa Kazemi, Sahar Irani, Mehdi Sohrabi, "Biologic characteristics of platelet rich plasma and platelet rich fibrin: A review," *Int J Contemp Dent Med Rev*, vol. 2016, Article ID: 030516, 2016. doi: 10.15713/ins.ijcdmr.104

15. Sacco, L. Lecture. In: International Academy of Implant Prosthesis and Osteoconnection, April 12th 2006.
16. Sohn D-S. Theeffect of concentrated growth factors on ridge augmentation. *DentalInc.* 2009;34-40.
17. Corigliano M, Sacco L, Baldoni E. CGF-una propostaterapeuticaper la medicinarigenerativa. *Odontoiatria.* 2010;1:69-81
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 2005: 108-62.
19. Kaya S. Larenks Kanseri; Bölüm:17. In: Larenks hastalıkları. Bilimsel tıp yayın evi, 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 LaryngolOtol.* 1994;108(4):319-20.
21. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjänen S. Prevalence of human papilloma virus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol.* 1994;114(3):348-51.
22. Chee N, Siow JK. Pharyngocutaneous fistula after laryngectomy--incidence, predisposing factors and outcome. *SingaporeMed J.* 1999;40(3):130-2.
23. Redaelli de Zinis LO, Ferrari L, Tomenzoli D, Premoli G, Parrinello G, Nicolai P. Postlaryngectomy pharyngocutaneous fistula: incidence, predisposing factors, and therapy. *HeadNeck.* 1999;21(2):131-8.
24. Wiseman S, Hicks W Jr, Loree T, Al-kasspooles M, Rigual N. Fibrin glue- reinforced closure of postlaryngectomy pharyngocutaneous fistula. *Am J Otolaryngol.* 2002 ;23(6):368-73.
25. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *CurrProblSurg.* 2001;38(2):72-140.
26. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J InvestDermatol.* 2007 ;127(3):514-25.
27. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999 ;341(10):738-46.
28. Bischoff M, Kinzl L, Schmelz A. DiekomplizierteWunde [The complicated wound]. *Unfallchirurg.* 1999 ;102(10):797-804.
29. Attinger CE, Janis JE, Steinberg J, Schwartz J, Al-Attar A, Couch K. Clinical approach to wounds: débridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *PlastReconstrSurg.* 2006 ;117(7 Suppl):72S-109S.
30. Kaya E. Yara İyileşmesi. *Travma.* Editörler: Ertekin Taviloğlu K, Güloğlu R, Kurtoğlu M. İstanbul Medikal Yayıncılık. 1.baskı,İstanbul. 2005, 488-501.
31. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-9.
32. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *ThrombRes.* 2012;129(3):220-4.
33. Strecker-McGraw MK, Jones TR, Baer DG. Soft tissue wounds and principles of healing. *EmergMedClin North Am.* 200 ;25(1):1-22.
34. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with Cellular and molecular events. *DermatolSurg.* 2005;31(6):674-86.

35. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *PlastReconstrSurg.* 2006 ;117(7 Suppl):12S-34S.
36. Richardson M. Acute wounds: an overview of the physiological healing process. *Nurs Times.* 2004;100(4):50-3.
37. Hart J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J WoundCare.* 2002;11(6):205-9.
38. Flanagan M. The physiology of wound healing. *J WoundCare.* 2000;9(6):299-300.
39. Alves CC, Torrinhas RS, Giorgi R, Brentani MM, Logullo AF, Arias V et al. Short-term specialized enteral diet fails to attenuate malnutrition impairment of experimental open wound acute healing. *Nutrition.* 2010;26(9):873-9.
40. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care.* 2004;17(1):24-35.
41. Ramasastry SS. Acute wounds. *ClinPlastSurg.* 2005;32(2):195-208.
42. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 30(9):1019-30.
43. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic limb model. *J ClinInvest.* 1993;93(2):662-70.
44. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y, Akao M et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood.* 2004;103(10):3760-5.
45. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *RecentProgHormRes.* 2000;55:15-35.
46. Li S, Huang NF, Hsu S. Mechano transduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem.* 2005;96(6):1110-26.
47. Krizbai IA, Bauer H, Amberger A, Hennig B, Szabó H, Fuchs R et al. Growth factor-induced morphological, physiological and molecular characteristics in cerebral endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 2000 ;79(9):594-600.
48. Hsu S, Thakar R, Li S. Haptotaxis of endothelial cell migration underflow. *MethodsMolMed.* 2007;139:237-50.
49. Toy LW. Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair. *J WoundCare.* 2005;14(1):20-2.
50. Mulder GD, VandeBerg JS. Cellular senescence and matrix metalloproteinase activity in chronic wounds. Relevance to debridement and new technologies. *J AmPodiatrMedAssoc.* 2002 ;92(1):34-7.
51. Marx RE, Garg AK. Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma: *Quintessence Publishing; Illinois* 2005, 35-36.
52. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji.* Aytekin Y, Solakoglu S, editors: Nobel Tıp Kitapevleri; Ankara, 2006.
53. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet xocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood.* 2000;96(10):3334-42.

54. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J OralMaxillofacSurg.* 2004;62(4):484-8.
55. Caffesse RG, Quiñones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000.* 1993;1(1):69-79.
56. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y AcadSci.* 2001;936:355-67.
57. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral MaxillofacImplants.* 2003;18(1):93-103.
58. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg OralMed Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 1998 ;85(6):638-46.
59. Varghese MP, Manuel S, Kumar L K S. Potential for Osseous Regeneration of Platelet-Rich Fibrin-A Comparative Study in Mandibular Third Molar Impaction Sockets. *J Oral MaxillofacSurg.* 2017;75(7):1322-9.
60. KINGSLEY CS. Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature.* 1954;173(4407):723-4.
61. Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion.* 1990;30(8):741-7.
62. Hood AG, Hill A, Reeder G, Potter P, Iverson L, Keating R, editors. Perioperative autologous sequestration III: A new physiologic glue with wound healing properties. *Proc Am Acad Cardiovasc Perfusion;* 1993.
63. Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J AmDentAssoc.* 2002 ;133(10):1383-6.
64. Tözüm TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can DentAssoc.* 2003 ;69(10):664.
65. Bozkurt FY, Öztürk MK, Periodontal rejenerasyonda yeni bir yaklaşım: Trombositten zengin plazma. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2005;8(2):119-27.
66. Stavrakas M, Karkos PD, Markou K, Grigoriadis N. Platelet-rich plasma in otolaryngology. *J LaryngolOtol.* 2016 ;130(12):1098-102.
67. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 2006;101(3):e45-50.
68. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 2006 ;101(3):e37-44.
69. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J ConservDent.* 2013;16(4):284-93.
70. Gür ÖE, Ensari N, Öztürk MT, Boztepe OF, Gün T, Selçuk ÖT et al. Use of a platelet-rich fibrin membrane to repair traumatic tympanic membrane perforations: a comparative study. *ActaOtolaryngol.* 2016;136(10):1017-23.

71. Habesoglu M, Oysu C, Sahin S, Sahin-Yilmaz A, Korkmaz D, Tosun A et al. Platelet-rich fibrin plays a role on healing of acute-traumatic ear drum perforation. *J CraniofacSurg.* 2014;25(6):2056-8.
72. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, Buffoli B, Labanca M, Scari G et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *MicroscResTech.* 2011;74(8):772-7.
73. Sohn DS, Moon JW, Moon YS, Park JS, Jung HS, Theuse of concentrated growth factors (CGF) for sinus augmentation. *Journal Oral Implant.* 2009; 38(1): 25-38.
74. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J ImplantDent.* 2016;2(1):19.
75. Bohannon IA, Carroll WR, Magnuson JS, Rosenthal EL. Closure of post- laryngectomy pharyngocutaneous fistulae. *HeadNeckOncol.* 2011;3:29.
76. Mäkitie AA, Irish J, Gullane PJ. Pharyngocutaneous fistula. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 ;11(2):78-84.
77. Aydoğan LB, Kiroğlu M, Tuncer U, Soylu L. The wound amylase concentration in the prediction of pharyngocutaneous fistula. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(4):414-6.
78. Jeannon JP, Orabi A, Manganaris A, Simo R. Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Infection as a causative agent of fistula formation following total laryngectomy for advanced head&neck cancer. *Head Neck Oncol.* 2010 28;2:14.
79. Saydam L, Kalcioğlu T, Kizilay A. Early oral feeding following total laryngectomy. *Am J Otolaryngol.* 2002 ;23(5):277-81.
80. Soylu L, Kiroglu M, Aydogan B, Cetik F, Kiroglu F, Akçali C et al. Pharyngocutaneous fistula following laryngectomy. *HeadNeck.* 1998;20(1):22-5.
81. Sousa AA, Porcaro-Salles JM, Soares JM, de Moraes GM, Silva GS, Sepulcri RA et al. Does early oral feeding increase the likelihood of salivary fistula after total laryngectomy? *J LaryngolOtol.* 2014;128:1-7.
82. O'Hara J, Lock C, Paleri V, Wight R. Oral feeding regimes following laryngectomy--a qualitative study of consultants' opinions in the North of England. *Oral Oncol.* 2009;45(8):727-30.
83. Stephenson KA, Fagan JJ. Effect of perioperative proton pump inhibitors on the incidence of pharyngocutaneous fistula after total laryngectomy: a prospective randomized controlled trial. *HeadNeck.* 2015;37(2):255-9.
84. Gu Y, Wu ZH, Xie JX, Jin DY, Zhuo HC. Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. *ClinNutr.* 2001;20(2):159-66.
85. Guntinas-Lichius O, Eckel HE. Temporary reduction of salivation in laryngectomy patients with pharyngocutaneous fistulas by botulinum toxin A injection. *Laryngoscope.* 2002 ;112(1):187-9.

86. Küçük B, Yorulmaz İ. Farengo-Kutanöz fistüle bağlı geniş cilt ve mukoza defektlerin pektoralis major kas –deri flebi ve deltopektoral flep ile onarımı; KBB ve Baş Boyun Cer. Derg. 2000;8(2):108-14.
87. Mathes JS, Nahai F: Pectoralis majör flap. Mathes JS, NAHAI F (Eds): Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique. Churchill Livingstone. New York 1997;2(4): 441-65.
88. Mathes JS, Nahai F: Deltopektoral flap. Mathes JS, Nahai F (Eds): Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique. Churchill Living- Stone. New York 1997; 2(4):411-24.
89. 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.
90. Galli J, Valenza V, Parrilla C, Galla S, Marchese MR, Castaldi P et al. Pharyngocutaneous fistula onset after total laryngectomy: scintigraphic analysis. Acta OtorhinolaryngolItal. 2009;29(5):242-4.
91. Jakubowicz DM, Smith RV. Use of becaplermin in the closure of pharyngocutaneous fistulas. Head Neck. 2005;27(5):433-8.
92. Weiss BG, Ihler F, Matthias C, Canis M. Coated collagen patches for closure of pharyngocutaneous fistulas. Am J Otolaryngol. 2014;35(2):246-50.
93. Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes: a review. Burns. 2001;27(5):534-44.
94. Walker M, Hobot JA, Newman GR, Bowler PG. Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethyl cellulose (AQUACEL)and alginate dressings. Biomaterials. 2003;24(5):883-90.
95. Kucuk N, Sari M, Midi A, Yumusakhuylu AC, Findik O, Binnetoglu A.Effectiveness of Recombinant Human Growth Hormone for Pharyngocutaneous Fistula Closure. Clin Exp Otorhinolaryngol. 2015;8(4):390-5.
96. Gu GS, Ren JA, Li N, Li JS. Effects of recombinant human growth hormone on enterocutaneous fistula patients. World J Gastroenterol. 2008 ;14(44):6858-62.
97. Jeschke MG, Herndon DN, Finnerty CC, Bolder U, Thompson JC, Mueller U et al. Theeffect of growth hormone on gut mucosal homeostasis and cellula rmediato rsafter severe trauma. J SurgRes. 2005;127(2):183-9
98. Dunaiski V, Belford DA. Contribution of circulating IGF-I to wound repair inGH-treatedrats. GrowthHorm IGF Res. 2002;12(6):381-7.
99. Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. Thee ffect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. J PlastReconstrAesthetSurg. 2010;63(4):e364-9.
- 100.Jeschke MG, Herndon DN, Finnerty CC, Bolder U, Thompson JC, Mueller U et al. Theeffect of growth hormone on gut mucosal homeostasis and cellular mediators after severe trauma. J SurgRes. 2005;127(2):183-9.
- 101.Dunaiski V, Belford DA. Contribution of circulating IGF-I to wound repair in GH-treated rats. Growth Horm IGF Res. 2000;12(6):381-7.

102. Guyton AC, Hall JE. Medical Physiology; 10. Edition; Publisher W.B. Saunders, Philadelphia. 2000, 849-54.
103. Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(4):e364-9.

