

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ  
KULAK BURUN BOĞAZ  
ANABİLİM DALI

**RATLARDAKİ AKUT KORD VOKAL  
HASARINDA YARA İYİLEŞMESİ VE BU  
SÜRECE PENTOKSİFİLİNİN ETKİSİ**

**DR. MURAT BELGİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2006**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ  
KULAK BURUN BOĞAZ  
ANABİLİM DALI

**RATLARDAKİ AKUT KORD VOKAL  
HASARINDA YARA İYİLEŞMESİ VE BU  
SÜRECE PENTOKSİFİLİNİN ETKİSİ**

**DR. MURAT BELGİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. ATAMAN GÜNERİ**

**İZMİR-2006**

## İÇİNDEKİLER

<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	3
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	5
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	7
4.1. Kord Vokal Yapısı.....	7
4.1.1. Anatomik Yapı.....	7
4.1.2. Histolojik Yapı.....	8
4.1.2.1.Epitel Tabakası.....	9
4.1.2.2. Lamina Propria.....	9
4.1.2.3. Kas Tabakası.....	12
4.2. Kord Vokalde Yara İyileşmesi Ve Skar Oluşumu.....	12
4.3. Pentoksifilin.....	14
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	15
5.1. Kord Vokal Cerrahisi.....	16
5.2. Çalışma Grupları.....	21
5.3. Patolojik İnceleme.....	23
5.4. İstatistiksel Analiz.....	27
<b>6. BULGULAR</b> .....	28
6.1. Kollajen Ölçümü.....	29
6.2. Lamina Propriada Enflamasyon.....	31
6.3. Epitelde Enflamasyon.....	31
6.4. Vasküler Proliferasyon.....	32
<b>7. TARTIŞMA</b> .....	33
<b>8. SONUÇ</b> .....	40
<b>9. KAYNAKLAR</b> .....	42

## TABLO LİSTESİ

<b>TABLO 1</b> .....	28
Çalışma Verilerinin Dökümü	
<b>TABLO 2</b> .....	29
Gruplardaki Kollajen Ortalamaları ve Standart Sapmaları	
<b>TABLO 3</b> .....	31
Lamina Propriadaki Enflamasyon Şiddetine Göre Gruplardaki Dağılım	
<b>TABLO 4</b> .....	31
Epiteldeki Enflamasyon Şiddetine Göre Gruplardaki Dağılım	
<b>TABLO 5</b> .....	32
Vasküler Proliferasyon Derecesinin Gruplardaki Dağılımı	

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>ŞEKİL 1</b> .....	7
Larenksin Bölgeleri	
<b>ŞEKİL 2</b> .....	9
Kord Vokalin Tabakalı Yapısı	
<b>ŞEKİL 3</b> .....	30
Gruplarda Ölçülen Kollajen Değerleri Ortalamaları	

## RESİM LİSTESİ

<b>RESİM 1a</b> .....	16
Operasyon Tespit Platformu	
<b>RESİM 1b</b> .....	16
Operasyon Tespit Platformu	
<b>RESİM 2a</b> .....	17
Ekartör Olarak Kullanılan Materyal	
<b>RESİM 2b</b> .....	17
Hazırlanan Materyalin Yandan Görünüşü	
<b>RESİM 3</b> .....	18
Platforma Vertikale Yakın Bir Pozisyonda Yerleştirilen Rat	
<b>RESİM 4a</b> .....	19
Ağız İçine Yerleştirilen Ekartör	
<b>RESİM 4b</b> .....	19
Sol El İle Yapılan Manipülasyon	
<b>RESİM 4c</b> .....	20
Ekartör İçinden Rat Larenksi Görünümü ( Rat Mikrolaringoskopisi)	
<b>RESİM 4d</b> .....	20
Mikroskop Altında Sağlanan Görüş	
<b>RESİM 5</b> .....	22
K Grubundan Bir Ratın Larenjektomi Spesmeni	
<b>RESİM 6a</b> .....	24
Kontrol Grubundan Bir Larengeal Kesit	
<b>RESİM 6b</b> .....	24
S Grubundan Örnek Kesit	
<b>RESİM 6c</b> .....	24
S+P Grubundan Örnek Kesit	
<b>RESİM 6d</b> .....	24
K Grubundan Örnek Kesit	

<b>RESİM 6e</b> .....	24
K+P Grubundan Örnek Kesit	
<b>RESİM 7a</b> .....	26
Sirius Red İle Boyanmış Örnek Kesit	
<b>RESİM 7b</b> .....	26
Bu Kesitin Polarize Işık Altındaki Görüntüsü	
<b>RESİM 7c</b> .....	26
Seçili Alanın Görüntüsü	

## **KISALTMALAR**

<b>ECM</b> .....	Ekstraselüler Matriks
<b>TGF-<math>\beta</math></b> .....	Transforming Growth Faktör Beta
<b>HA</b> .....	Hyaluronik Asit
<b>S</b> .....	Stripping
<b>K</b> .....	Kas Hasarı
<b>P</b> .....	Pentoksifilin
<b>BAY</b> .....	Boyalı Alan Yüzdesi
<b>VLS</b> .....	Videolaringostroboskopi
<b>HGF</b> .....	Hepatosit Growth Faktör
<b>MMC</b> .....	Mitomisin C



## 1. ÖZET

### **RATLARDAKİ AKUT KORD VOKAL HASARINDA YARA İYİLEŞMESİ VE BU SÜRECE PENTOKSİFİLİNİN ETKİSİ**

**Dr. Murat Belgi**

Kord vokal cerrahisi sonrasında ortaya çıkan fonksiyonel ses kaybının en önemli nedeni skar oluşumudur. Lamina propria, ekstraselüler matriks (ECM) ve bu matriksin bileşenlerini sentezleyen hücrelerden oluşmaktadır. Kord vokalin biyomekanik özellikleri ECM bileşenleri tarafından belirlenir. Bu bileşenlerin dengeli dağılımı, ses oluşumunda kord vokale ideal viskoelastikiyeti kazandırır. Lamina propria sesin oluşması açısından oldukça önemli bir bölgedir ve benign kord vokal lezyonları da genellikle lamina propria içinde oluşurlar. Polip ve kist gibi benign non neoplastik lezyonlar vokal kordların kapanışını etkileyerek ve/veya mukozal dalga hareketini etkileyerek disfoni yaratırlar. Ancak bu lezyonların cerrahi eksizyonu da fonksiyonel kaybı tamamen düzeltmeye yetmez. Yara iyileşme sürecinde sağlıklı dokunun yerini fibröz doku almaktadır. Değişen ECM kompozisyonu mukozal dalga hareketini etkileyerek kord vokal fonksiyonunu bozmaktadır.

Yara iyileşmesi ve skar oluşum sürecinin iyi bilinmesi ona karşı etkili tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından bir avantajdır. Bu alanda yapılan çalışmalarda birçok madde denenmiştir. Metil ksantin derivativesi olan pentoksifilin, vasküler perfüzyon üzerine olan olumlu etkileri yanında klinik uygulamalardaki düşük yan etki profili nedeniyle hasta tedavilerinde geniş kullanım endikasyonu bulan antiproliferatif, antienflamatuar, antifibrotik etkileri ispatlanmış güvenilir bir ilaçtır. Birçok dokudaki yara iyileşmesinde olumlu etkileri gösterilmiş ancak kord vokal üzerinde çalışılmamıştır.

Çalışmamızda yirmi adet Wistar rat kullanılmıştır. Hayvanların 10 tanesinde cerrahi prosedür olarak kord vokale stripping uygulanmış, kalan 10 tanesinde ise kord vokalde kas hasarı oluşturulmuştur. Her iki grupta da beşer havyan tedavisiz izlenirken, kalan beş hayvan ilk dozu preoperatif olmak üzere 14 gün boyunca intraperitoneal yoldan 100 mg/kg/Gün pentoksifilin kemoprofilaksisi almıştır. Cerrahi işlemler her ratın sol kord vokaline

uygulanmış, karşı kord intakt bırakılarak kontrol olarak kullanılmıştır. On dört günlük iyileşme periyodu sonrasında hayvanlar sakrifiye edilmiş ve larengeal spesmenler çıkarılmıştır. Yapılan patolojik incelemede kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyanarak ışık mikroskobu altında enflamasyon ve vasküler proliferasyon skorlarına bakılmıştır. Kesitler kollajen içeriğini göstermek amacıyla Sirius Red ile boyanmış, görüntüler imaj analiz programı yardımıyla değerlendirilip boyalı alanın total alana piksel olarak yüzdesi alınarak kollajen dansitesi hesaplanmıştır.

Pentoksifilin hem S+P hem de K+P grubunda, yapılan hasara cevap olarak oluşan enflamasyonu baskıladığı görülmüştür. S grubunda K grubuna kıyasla daha yoğun bir enflamatuvar cevap gözlenmesine rağmen iki grubun kollajen değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Gruplar arası kollajen ortalamaları karşılaştırıldığında kollajen düzeyi K+P grubunda K grubuna göre anlamlı ölçüde düşük seviyede kalmıştır. S+P grubunda kollajen seviyesi S grubuna göre düşüş göstermesine rağmen iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı ortaya konmuştur. Hem K+P hem de S+P grubunda ölçülen kollajen miktarı kontrole kıyasla anlamlı olarak yüksek kalmıştır.

Çalışmamız pentoksifilin, diğer dokularda gösterilen antiinflamatuvar ve antifibrotik davranışını kord vokal dokusundaki yara iyileşmesi sürecinde de sergilediğini ortaya koymuştur. Ancak bu getirinin fonksiyonel anlamda ne kazandırdığı konusunda geniş olgu serileriyle yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

## **2. SUMMARY**

### **WOUND HEALING PATTERNS OF VOCAL CORD ACUTE INJURIES IN RATS AND THE PROTECTIVE EFFECT OF PENTOXIFYLLINE IN THE PROGRESS**

**Murat Belgi, M.D.**

Scar formation is the major cause of dysphonia following the vocal cord surgery. Lamina propria consists of extracellular matrix (ECM) and cells producing the components of the matrix. Components of ECM determines the biomechanical properties of the vocal cord. A balanced distribution of this components provides an ideal viscoelasticity to vocal cord. Lamina propria is the basic part of the glottic structure for the generation of voice and the benign vocal cord lesions generally originate in this region. The benign non-neoplastic lesions such as polyps or cysts cause dysphonia by disturbing closure of the vocal cords and the mucosal wave generation. Surgical excisions of this sort of lesions are not fully efficient to tolerate the functional incompetence. Within the wound healing process, fibrotic tissue replaces the original tissue. Changes in the composition of ECM disturbs the vocal cord function by impeding the mucosal wave movement.

A well known healing and scar formation process enables to improve the effective treatment regimes. Different substances have been studied to assess this subject. Pentoxifylline is a reliable drug with its low side effect profile and proven antiproliferative, antiinflammatory and antifibrotic effects, that has clinical indications on circulatory disturbances. Its investigatory effects on wound healing process was shown on many tissues but hasn't studied on vocal cords yet.

Twenty Wistar rats was used in the study. Stripping of the vocal cord performed on 10 of the rats as a surgical procedure and muscle defect created on the rest of the animals. Five rats followed without treatment while 100 mg/kg/day pentoxifylline was given intraperitoneally for 14 days in the rest of groups. Surgical procedures was performed to the left vocal cords while the opposite cords remained intact as control subjects. The rats

sacrificed and the laryngeal specimens obtained on the 14 th day of follow up period. Sections were stained with Hematoxylin-Eosin and inflammation and vascular proliferation scores obtained on light microscopic examination. Tissue sections were stained with Sirius-Red to visualize the collagen matrix and the whole images were examined with image analyse program to rationale the percentage of collagen density in terms of pixels on the stained area.

It's shown that pentoxifylline suppresses the inflammation which arouse as a response to the tissue damage in both groups S+P and K+P. Although a more intense inflammatory response was seen in group S than group K, no significant difference between collagen matrix levels was detected. As collagen matrix levels compared between two groups, the levels were found significantly lower in group K+P than group K. Collagen levels were found to be lower in group S+P than group S, but no statistically significant difference were detected. The amount of collagen matrix was measured significantly higher in group K+P and S+P than control levels.

In the study; it is undoubtly shown that pentoxifylline has an antiinflammatory and antifibrotic effect in the wound healing of the vocal cord tissue as it has on the other tissue sites. However new clinical studies needed to provide the effect of the findings to the functional outcomes.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kord vokal cerrahisi sonrasında ortaya çıkan fonksiyonel ses kaybının en önemli nedeni skar oluşumudur (1). Kord vokal histolojisinde subepitelyal planda yer alan lamina propria, ekstraselüler matriks (ECM) ve bu matriksin bileşenlerini sentezleyen hücrelerden (fibroblast, myofibroblast, makrofaj) oluşmaktadır (2). Glikoproteinler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, kollajen ve elastin bu matriksin ana bileşenlerini oluşturur (3,4). Kord vokalin biyomekanik özelliklerini belirleyen bu bileşenlerin dengeli dağılımı, ses oluşumunda kord vokale ideal viskoelastikiyeti kazandırır. Yara iyileşme sürecinde sağlıklı dokunun yerini fibröz doku almaktadır. Değişen ECM kompozisyonu mukozal dalga hareketini etkileyerek vokal kord fonksiyonunu bozmaktadır (5).

Kord vokalde yara iyileşmesi sürecini inceleyen birçok yayın mevcuttur. Tateya ve ark.'nın (6) yapmış oldukları çalışmada akut kord vokal hasarı yaratılan ratlarda reepitelizasyonun 14 günde tamamlandığı ve skar dokusunun ana bileşeni olan kollajenin anlamlı oranda arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi diğer çalışmalarda da kord vokalde yaratılan doku hasarı epitel ve lamina propria ile sınırlıdır. Ancak kord vokale yönelik uygulanan standart tanımlı cerrahiler arasında , “stripping” olarak bilinen bu yöntem dışında, tiroaritenoid kasın kısmen ya da tamamen eksizyona dahil edildiği uygulamalar da mevcuttur. Literatürde, kord vokale yapılan girişimlerde oluşan iki farklı derecedeki doku hasarının histolojik olarak iyileşme süreçlerini araştırıp karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Yara iyileşmesi hakkındaki bilgilerimizin artması araştırmacıları skar oluşumunu azaltmayı amaçlayan çalışmalara yöneltmiştir. Bu amaçla yapılan in-vitro ve in-vivo araştırmalarda hepatosit growth faktör (7,8,9), echinacoside (10), Mitomisin-C (11), mezenkimal kök hücrelerinin (12) etkinliği denenmiş ve olumlu sonuçlar bildirilmiştir.

Metil ksantin derivativesi olan pentoksifilin, vasküler perfüzyon üzerine olan olumlu etkileri yanında klinik uygulamalardaki düşük yan etki profili nedeniyle hasta tedavilerinde geniş kullanım endikasyonu bulan bir ilaçtır. Non-spesifik bir fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilinin antiproliferatif, antienflamatuar, antifibrotik etkileri laboratuvar kanıtlarıyla bildirilmiştir (13). Yağmurlu ve ark. (14) ratlarda oluşturulan pyelonefrit modelinde intraperitoneal yoldan 100 mg/kg/gün dozunda verilen pentoksifilinin renal skar formasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Karaciğer, böbrek, akciğer, periton dokusunda

antifibrotik etkisi gösterilen pentoksifilin kord vokaldeki yara iyileşme sürecine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, ratlarda farklı iki derinlikte oluşturulan akut kord vokal hasarının iyileşme sürecini izlemeyi ve bu sürece pentoksifilin etkisini araştırmayı amaçladık.

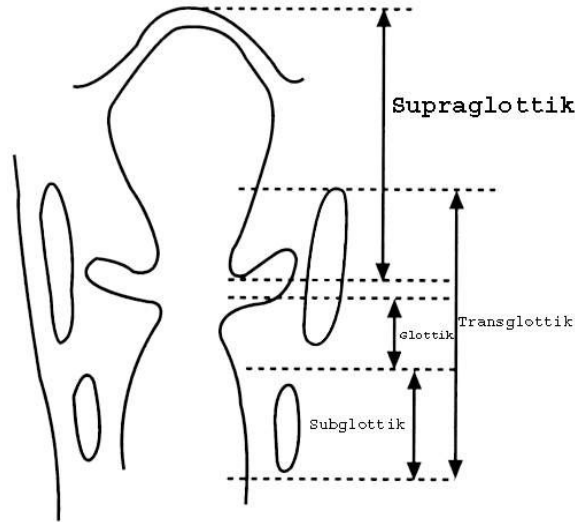
## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. KORD VOKAL YAPISI

#### 4.1.1. Anatomik Yapı

Larenks kompleks bir organdır ve aspirasyondan korunmada, solunumda ve fonasyonda aktif rol oynar (15,16). Öksürük ve yutmada ise yardımcı rol oynamaktadır. Fonasyon sırasında larenksin iç ve dış kaslarının yanı sıra, larenksin kıkırdak yapısı da şeklini ve duruşunu değiştirmektedir (16). Larenks birbirlerine ligamentlerle bağlanan, üzeri kas ve mukoza ile örtülü kıkırdak bölümlerden meydana gelmiştir (16,17,18).

Larenksin iç yüzeyinde sağlı sollu ve birbiri üzerinde yerleşmiş iki çift plika yer alır. Üsttekilere ventriküler bantlar (yalancı vokal kordlar), alttakilere ise kord vokal ( vokal fold, vokal plika ) adı verilir. Bu plikalar larenks boşluğunu 3 bölüme ayırır. Üst bölüm supraglottik bölge, orta bölüm kord vokallerin bulunduğu glottik bölge, alt bölüm ise kord vokallerin altındaki subglottik bölgedir.



Şekil 1. Larenksin bölgeleri

Ventriküler bantlar supraglottik bölgede yanlardan larenks vestibülüne doğru uzanan kabartılardır; önde petiolusa, yanlarda tiroid kıkırdığa, arkada ise aritenoide yapışırlar. Ventriküler bantlar ve kord vokaller arasında, ventrikül adı verilen bir çukurluk vardır. Tiroid

kıkırdak ön açısı ile aritenoid arasında uzanan ventriküler kavitenin görevi, içerdiği bol salgı bezleri nedeniyle kord vokallerin lubrikasyonunu sağlamaktır.

Glottik bölge (glottis), kord vokallerin bulunduğu bölgedir. Kord vokaller arasındaki açıklık rima glottis ya da glottik açıklık olarak adlandırılır (17). Rima glottis larinksin en dar kısmıdır. Kord vokaller mukoza ile örtülü elastik dokular olup, tiroid kıkırdak ile aritenoidin vokal çıkıntısı arasında uzanırlar. Kord vokaller önde tiroid kıkırdağa yapıştıkları noktada ön komissürde fiksedirler; arkada ise kord vokallerin aritenoid kıkırdakların vokal proseslerine tutunması ile oluşan ve hareketli olan posterior komissür yer alır. Lateral kenarları ventrikül tabanına bitişik olup, aşağı yönde krikoid düzeyine kadar uzanır. Vokal ligamentin arkada vokal çıkıntıya yapışma yeri posterior komissür olarak adlandırılır. Vokal çıkıntının perikondriuma yapışma yerinde elastik ve kollajen lifler vardır ve konnektif doku ile elastik lifler vokal çıkıntının önünde bir ağ yaparlar; Reinke buraya makula flava posterior adını vermiştir (15,17,18).

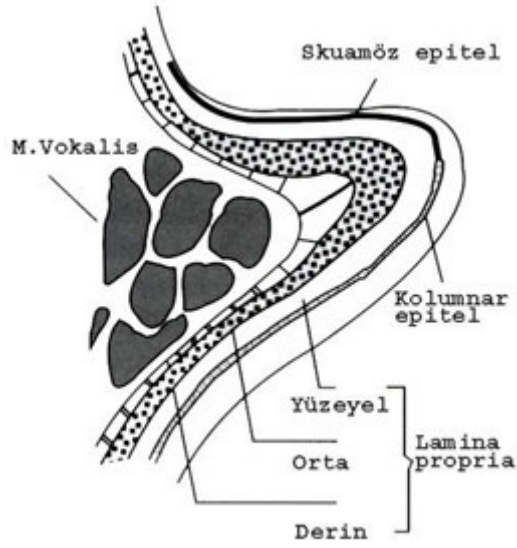
Kord vokaller glottisin anterior 2/3 membranöz parçasını oluştururlar; posterior 1/3 kısım ise aritenoid kıkırdağın vokal prosesi tarafından meydana gelen kartilajinöz glottistir. Anterior 2/3 membranöz kısım fonasyon, posterior 1/3 kısım respirasyon açısından önemlidir.

#### **4.1.2. Histolojik Yapı**

Kord vokaller mukoza ve kasdan oluşur. Mukoza, epitel ve lamina propriayı içerir. Kord vokaller dıştan içe 5 tabakadan oluşurlar:

- A. Örtü Tabakası: Üstte non keratinize çok katlı yassı epitel ve bunun altında lamina proprianın yüzeyel tabakası (Reinke mesafesi, Reinke aralığı, Reinke boşluğu).
- B. Geçiş tabakası: Lamina proprianın orta ve derin tabakaları (Vokal ligament).
- C. Gövde: Kas tabakası (Tiroaritenoid kasın medial bölümü: m. vocalis, vokal kas).





Şekil 2. Kord vokalin tabakalı yapısı

#### 4.1.2.1. Epitel Tabakası

Kord vokalin vibratuar kenarı ve üst yüzeyi non keratinize çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Kord vokalin kalan kısmı psödostratifiye silyalı kolumnar epitel ile örtülüdür. Yassı epitel arasında melanositlere de rastlanır. Epitel tabakasını lamina proprianın yüzeyel tabakasına bağlayan çok tabakalı ve kompleks yapıda olan bazal membran mevcuttur. Larenks epitelinde yüzeyin nemli ve yumuşak kalmasına yardım eden ve mukus akışını düzenleyen plikalar vardır. Seromüköz glandlar kordun serbest kenarı dışında diğer bölümlerinde bulunurlar. Bunlar tipik asini ve duktus içerirler. Kord yüzeyini ıslak tutarak fonasyon sırasında kordun aşınmasını önlerler (18).

#### 4.1.2.2 Lamina Propria

Lamina propria sesin oluşması açısından oldukça önemli bir bölgedir ve benign vokal fold lezyonları da genellikle lamina propria içinde oluşurlar. Lamina propria örtücü nonkeratinize epitel ile kas arasında kalan kısımdır; süperfisyel (yüzeyel), orta ve derin tabakalar olmak üzere 3 bölümden oluşur. Ortalama kalınlığı 1.05 mm'dir.

##### *Yüzeyel Tabaka:*

Kalınlığı 0.2-0.5 mm ortalama 0.3 mm'dir. Elastik, kollajen lifler ve esas madde içerir. Kordun serbest kenarından 2 mm uzaklıktadır. Ortada en kalın , ön ve arka yapışma yerinde en incedir. Bu tabaka Reinke aralığı ile ilgilidir. Anatomist Frederich Reinke tarafından tanımlanan bu izafi boşluk vokal ligamentin üzerinde subepitelyal bağ dokuda yer alır. Etrafi

herhangi bir nedenle oluşan ödemin dışa yayılmasını engelleyen sağlam fibröz doku ile çevrilidir. Bu boşluğun ödemi polipoid dejenerasyon, Reinke ödemi, polipoid kord vokal, polipoid hipertrofi olarak adlandırılır.

*Orta Tabaka:*

Kalınlığı 0.5-1.5 mm'dir. Histolojik olarak yüzeysel tabaka ile karışıktır. Kordun ön ve arka yapışma yerinde en kalın, ortada en incedir. Esas olarak elastik lifler bulunur. Bu ince elastik liflerin vibrasyona katkısı vardır. Derin tabakayla birlikte vokal ligamenti oluşturur.

*Derin Tabaka:*

Vokal kasa paralel seyreden kollajen liflerden oluşan bu tabaka vokal çıkıntıya yapışma yerinde en kalındır. En sert ve en az mobil olan tabakadır.

Lamina propria kord vokalin ventriküle bitişik lateral kenarında kalınlaşarak korda yataklık yapar. Tiroid kıkırdağın iç yüzeyindeki yapışma yerinde anterior makula flava adını alır. Lamina proprianın vokal çıkıntıda kalınlaştığı nokta ise posterior makula flava adını alır. Vokal ligament ön ve arka makula flava arasında uzanır. Makula flava vokal ligamentin gelişmesi açısından önemlidir. Yeni doğanda fibroblastlarca zengindir ve doğumdan sonra çocuğun ses çıkarması ile bu fibroblastlar aktive olarak vokal ligamenti şekillendirirler (15). Makula flava kondrosit, fibroblast gibi hücrelerden ve kollajen, elastin gibi ECM bileşenlerinden zengindir (19).

Lamina propria insanda kord vokalin vibrasyon performansı ile direkt ilişkilidir. Subepitelyal planda yer alan lamina propria, ECM ve bu matriksin bileşenlerini sentezleyen hücrelerden (fibroblast, myofibroblast, makrofaj) oluşmaktadır (2). Kord vokalin biyomekanik özelliklerini belirleyen bu bileşenlerin dengeli dağılımı, ses oluşumunda korda ideal viskoelastikiyeti kazandırır. Glikoproteinler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, kollajen ve elastin bu matriksin ana bileşenlerini oluşturur (3,4).

*Kollajen ve Elastin:* Normal kord vokal dokusunda epitelyal mukozaya paralel uzanan demetler halindedir. Her üç tabakada da değişen oranlarda bulunurlar.

*Fibronektin:* ECM glikoproteini olan fibronektinin önemli bir adezyon molekülü olduğu gösterilmiştir. İnflamatuar hücreler ve fibroblastlar için kemotaksik özellikte olup ECM organizasyonuna katkıda bulunur. Normal kord vokal dokusu içinde primer olarak bazal membranda ve lamina proprianın yüzeysel tabakasında yer alır (20). Hipertrofik ve kronik

yaralarda aşırı üretildiği (21,22), yara iyileşmesinde ECM içindeki yüksek düzeylerinin fibrozise katkıda bulunduğu gösterilmiştir (23).

*Dekörin:* Kollajene yapışarak fibril organizasyonunu sağlayan kısa zincirli bir proteoglikan adezyon molekülüdür (24). ECM içindeki kollajenin formasyonuna ve fibrillerin kalınlığına etkisi vardır (3,24). Düşük düzeylerinin akut kord vokal hasarı sonrasında oluşan skar dokusunda düzensiz kollajen oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (25). Özellikle lamina proprianın yüzeyel tabakasında bulunduğu gösterilmiştir ve bu tabakanın hasarında oluşan skar dokusuna katkısı vardır (3,24).

*Fibromodulin:* Esas olarak lamina proprianın orta ve derin tabakalarında vokal ligament içindeki kollajen ve elastin fibrilleriyle ilişkili halde bulunur. Transforming growth faktör beta'ya (TGF- $\beta$ ) bağlanarak onu inhibe eden bir proteoglikan moleküldür (3,24). TGF- $\beta$  kollajen sentezini uyarır. Dolayısıyla dokuda azalmış fibromodulin seviyesi artmış kollajen senteziyle sonuçlanır.

Tavşan modelinde yapılan çalışmalarda azalmış dekorin ve artmış fibronektin düzeyleri ile birlikte kollajen sentezinde artma (azalan fibromodulin yoluyla), dengesiz kollajen depolanması (azalan dekorin nedeniyle), devam eden inflamatuvar hücre ve fibroblast migrasyonu (artmış fibronektin yoluyla) gösterilmiştir (7,25).

*Hyaluronik asit (HA):* ECM'de bulunan non antijenik bir glikozaminoglikan molekülüdür (26). Mukozal dalga hareketinin başladığı kordun subglottik yüzünde yüksek konsantrasyonda tespit edilmiştir (3). Endojen HA organizmada hızla metabolize olur. Kord vokal dokusunda yarı ömrü 0.5-4 gün arasında değişir (10). ECM içinden reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alındıktan sonra hyaluronidaz enziminin degradasyonu ile metabolize edilir (26). Bu enzimin inhibisyonu ile sağlanan yüksek HA düzeyinin yara iyileşmesine olumlu katkıları bildirilmiştir (10). HA yokluğu, kord vokalde artmış viskoziteyle, fonasyon ve vokal temel frekansı bozan doku değişiklikleriyle kendini gösterir (27). HA, erkeklerde kadınlara göre kord vokal içinde daha yüksek konsantrasyonda bulunur (28). Dokudaki HA düzeyinin yara iyileşmesi ve skar formasyonu üzerine direkt etkisi vardır. Fetal dokulardaki skarsız yara iyileşmesi bu dokuların HA içeriğinin anlamlı olarak yüksek olmasıyla açıklanır (29). Yapılan hayvan çalışmalarında kord vokalde yara iyileşmesinin erken fazında HA seviyeleri kontrole kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur (6).

Bunların dışında lamina propria yapısında kaderin, sindekan-1, sindekan-4 gibi adezyon molekülleri de bulunur. Kaderin ve sindekan-1'in epitelyal interselüler aralıkta bulunduğu

ancak skatrize kord vokal dokusundaki düzeylerinin normalden farklılık göstermediği saptanmıştır.

#### **4.1.2.3. Kas Tabakası**

Tiroaritenoid kas tiroid kıkırdığın iç yüzünden arkaya uzanarak aritenoidin anterolateral yüzüne yapışır. Üst demetleri ön arka yönde vokal ligamente paralel seyreder. Aşağıdaki lifleri biraz yukarı ve posterolateral yönde ilerleyip aritenoid kıkırdakta fovea oblangaya yapışırlar. Tiroaritenoid kasın medial demetleri vokal kası oluştururlar. Bunlar ses oluşmasında aktif rol oynarlar. Kord vokalin hareketi az olan en katı bölgesidir. Vibrasyon sırasında kord vokalin vertikal stabilitesine ve ossilasyon oluşmasına yardım ederler. Rekürren sinirin lifleri adele içinde ağ yapar.

Kord vokalin vaskülarizasyonu karmaşıktır. Vibratuar parçada , kas ve kord mukozasında üst ve alt yüzeydeki vaskülarizasyon farklıdır. Kordun serbest kenarında damarlar uzun eksene paralel seyreder. Lamina propriada ise serbest kenardan uzakta olup uzun eksene perpendiküler durumdadır. Kas tabakasında damarlar derinden girerler. Ana damar kord ekseninde ilerlerken kasa dalcıklar verir (15).

## **4.2. KORD VOKALDE YARA İYİLEŞMESİ VE SKAR OLUŞUMU**

Skar oluşumu kord vokal hasarı sonrasında ortaya çıkan ses bozukluğunun en önemli sebebidir (1). Skar dokusu kord vokal serbest kenarında deformiteye yol açarak, lamina proprianın tabakalı viskoelastik yapısını bozarak, vibratuar yapıdaki katılığı artırarak ve glottik yetmezliğe katkıda bulunarak sesi etkiler. Skar oluşumunun nedenleri arasında travma, radyasyon, cerrahi travma, iyatrojenik nedenler, enfeksiyonlar sayılabilir (30). Kord vokalin biyomekanik özellikleri, ECM içinde yer alan komponentlerin dansitesi ve dağılımı tarafından belirlenir (25). Kord vokalin biyomekanik özelliklerini belirleyen bu komponentlerin dengeli dağılımı, ses oluşumunda kord vokale ideal viskoelastikiyeti kazandırır. Lamina propriada skar dokusu oluştuğunda değişen bu özellikler fonasyon sırasında mukozal dalga hareketini bozarak ses karakterlerini etkilemektedir. Bu değişiklik hastalarda ses kısıklığı, vokal kontrolün kaybı ve seste yorulma gibi klinik şikayetler yaratmaktadır (25). Yapılan çalışmalarla yara iyileşme sürecine ilişkin bilgilerimizin artması skar formasyonunu engellemeye ya da azaltmaya yönelik tedavi seçeneklerini gündeme getirmiştir.

Deri başta olmak üzere birçok organda yaratılan hasara verilen cevap ve yara iyileşmesi ayrıntılarıyla ortaya konmuştur. Bu süreç enflamatuar, proliferatif ve remodelasyon olarak adlandırıldığımız iç içe geçmiş üç fazdan oluşmaktadır (31).

Hasar olur olmaz enflamatuar faz başlar. Bu aşamada trombositler, nötrofiller ve makrofajlar hasar bölgesine migrasyon gösterirler ve transforming growth faktör alfa (TGF- $\alpha$ ), transforming growth faktör beta (TGF- $\beta$ ), platlet-derived growth faktör (PDGF) gibi sitokinler salgırlar. Proliferatif faz da hasardan hemen sonra başlar. İlk faza göre daha uzun sürer. Bu fazda epitelizasyon, anjiyogenez ve mezenkimal hücre proliferasyonu meydana gelir (31). Fibroblastlar ve epitelyal hücreler tarafından kollajen ve fibronektin gibi ECM komponentleri sentezlenir. Yapılan birçok çalışma bu ECM komponentlerinin yara iyileşmesinde anahtar rolü olduğunu ortaya koymuştur. Cilt dokusunda epitelizasyonun trombositlerden salınan epidermal growth faktör aracılığıyla yaralanmadan birkaç saat sonra başladığı gösterilmiştir (32). Normal yara iyileşme sürecinde hasardan yaklaşık dört gün sonra yara boşluğu granülasyon dokusuyla dolar (32). Granülasyon dokusu canlı bir epidermal yüzeyle örtüldüğü zaman remodelasyon fazı başlar. Bu faz granülasyon dokusunun matür skar dokusuna dönüşümüyle sonuçlanır. Bu fazda yeni kollajen sentezlenmez; var olan kollajen lifleri organize olarak matür skar dokusunun karakteristiğini oluşturur. Süresi üç hafta ile bir yıl arasında değişebilir.

Kord vokalde yara iyileşmesini inceleyen birçok yayında sürecin enflamatuar ve proliferatif fazda ciltte görülen ile aynı olduğu ancak remodelasyon fazında farklılık sergilediği ortaya konmuştur. Normalde cilt dokusunda yara iyileşirken kollajen tipIII başlangıçta hızla sentezlenir. Kollajen tip I ise hasardan yaklaşık üç gün sonra sentezlenmeye başlar ve yedinci günden başlayarak tip III'ün yerini alır (31). Tateya ve ark. (6) rat modelinde akut kord vokal hasarına cevabı inceleyen çalışmalarında cilttekine zıt olarak kollajen tip I'in beşinci günden sonra azalmasına karşılık kollajen tip III'ün 3-14. günler arasında değişmeden kaldığını ortaya koymuşlardır. Bu bulgu kord vokaldeki remodelasyon fazının ciltten farklı sürmekte olduğunu göstermektedir.

### 4.3. PENTOKSİFİLİN

Metil ksantin derivativesi olan Pentoksifilin, non spesifik bir fosfodiesteraz inhibitörüdür. Özellikle periferik arter hastalıklarında kullanılmaktadır (33). Oldukça güvenli ve iyi tolere edilen bir ilaçtır. En sık görülen yan etkiler arasında %3 hastada ortaya çıkan bulantı, dispepsi gibi gastrointestinal şikayetler ve baş dönmesi yer alır (33). Primer hemoreolojik etkisi eritrosit deformabilitesini artırmak ve kan viskozitesini düşürmektir. Bunu eritrosit içinde adenosin trifosfat ve diğer siklik nükleotidlerin seviyelerini yükselterek yapar. Hücre içinde yükselen cAMP düzeyi tromboksan sentezini azaltır, prostasiklin sentezini ise artırır. Böylece damar duvarına trombosit adezyonu ve agregasyonu inhibe edilir. Ancak bu temel hemoreolojik etkisinin yanında pentoksifilinin antiproliferatif, antiinflamatuvar, antifibrotik etkileri de mevcuttur. Shuei-Liong Lin ve ark.'nın (13) yapmış oldukları derlemede bu etkiler laboratuvar kanıtlarıyla bildirilmiştir.

Literatürde, yapılan birçok çalışmayla karaciğer, böbrek, akciğer, periton dokusunda antifibrotik ve antiinflamatuvar etkisi gösterilen pentoksifilinin kord vokalde yara iyileşme sürecine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma, akut kord vokal hasarı yaratılan rat larenksinde, pentoksifilinin antiinflamatuvar, antiproliferatif, antifibrotik etkileriyle skar oluşumunu azaltacağı düşünülerek planlanmıştır.

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı bünyesinde DEÜTF Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nın olanakları kullanılarak yürütülmüş; çıkarılan spesmenler DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenmiştir. Araştırma Deneysel Hayvanları Etik Kurulu onayı (12.09.06 tarih ve 87 sayılı yazı) alındıktan sonra DEÜTF Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilmiş ağırlıkları 280-350 (ortalama 330) gr arasında değişen 20 adet sağlıklı erkek Wistar rat üzerinde yapılmıştır. Denek olarak rat seçilmesinin nedenleri şöyle sıralanabilir:

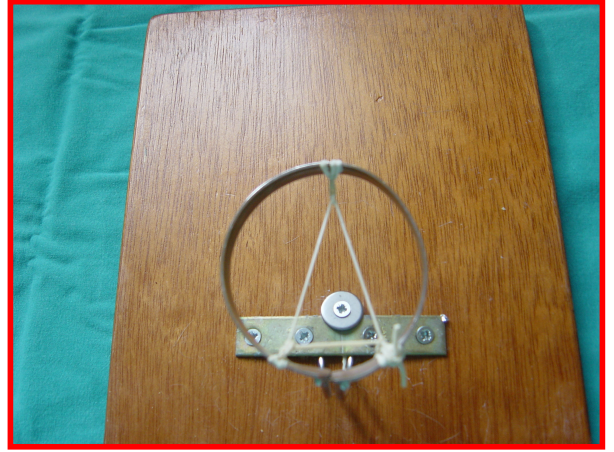
1. Rat ve insan vokal kordu aynı histolojik karakteristikleri göstermektedir. Ratlarda lamina proprianın orta ve derin tabakaları hyaluronik asid bakımından zengindir. Bu bulgu en fazla hyaluronik asidin orta tabakada saptandığı insan vokal korduyla benzerlik taşımaktadır. Yine rat vokal kordu insanda olduğu gibi derin tabakasında yoğun kollajen fiberler içermektedir. Lamina proprianın kollajen tip I'e oranla daha fazla kollajen tip III içermesi ve bazal membrandaki fibronektin içeriği de benzerlikler arasındadır (34).
2. Skatrize olan kord vokal hem ratlarda hem de insanlarda kontrollere göre düşük düzeylerde hyaluronik asid içerir. Oysa köpek ve tavşan çalışmalarında böyle bir fark bulunmamıştır. Dolayısıyla vokal korda ideal viskoziteyi sağlayan ve fonksiyonda önemli rolü olan hyaluronik asidin düzeyini artırmak amacıyla yapılan araştırmalar için en ideal model rat olarak görülmektedir.
3. Kısa hayat süreleri olan ratlar hızlı yara iyileşmesi gösterirler. Kord vokalde skatrizasyon süreci oldukça çabuk oluşur. ECM komponentleri 8-12. haftalar arasında hemen hemen kontrol düzeylerine dönerler.
4. Ratlar iletişimlerinde seslerini kullanırlar. Yara iyileşme döneminde kord vokalin mutlak hareketsiz kalmaması gerçeğe yakın iyileşme ortamı sağlamaktadır.
5. Rat çalışmalarının maliyeti diğer hayvan modellerine göre daha düşüktür.

## 5.1. Kord Vokal Cerrahisi

Çalışma öncesinde standart cerrahi işlemi tüm hayvanlarda aynı özelliklerle gerçekleştirmek amacıyla ratları vertikale yakın oturur pozisyonda tutacak ve başı sabitleyecek bir tespit platformu hazırlandı (Resim 1a, 1b).



**Resim 1a.** Operasyon tespit platformu



**Resim 1b.** Operasyon tespit platformu

Vokal kordarı görüş altına alabilmek ve cerrahi işlemi gerçekleştirebilmek amacıyla standart 2 cc'lik enjektörler kesilip özel şekil verilerek oral ve faringeal ekartör olarak kullanıldı (Resim2a, 2b). Yapılan pilot çalışmalarla en iyi görüşü sağlayan ideal şekil ve ölçü belirlendi. Ağız açıklığı değişik olan hayvanlar için bu standart şekil üzerinde modifikasyonlar yapılarak operasyon sırasında kullanıldı.

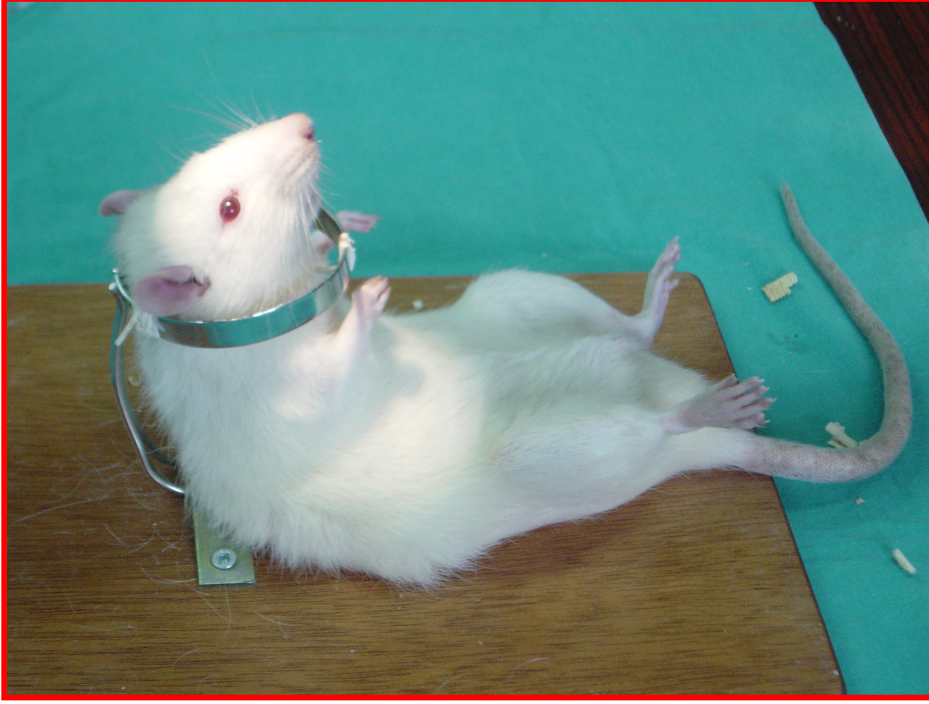




**Resim 2a:** Ekartör olarak kullanılan materyal

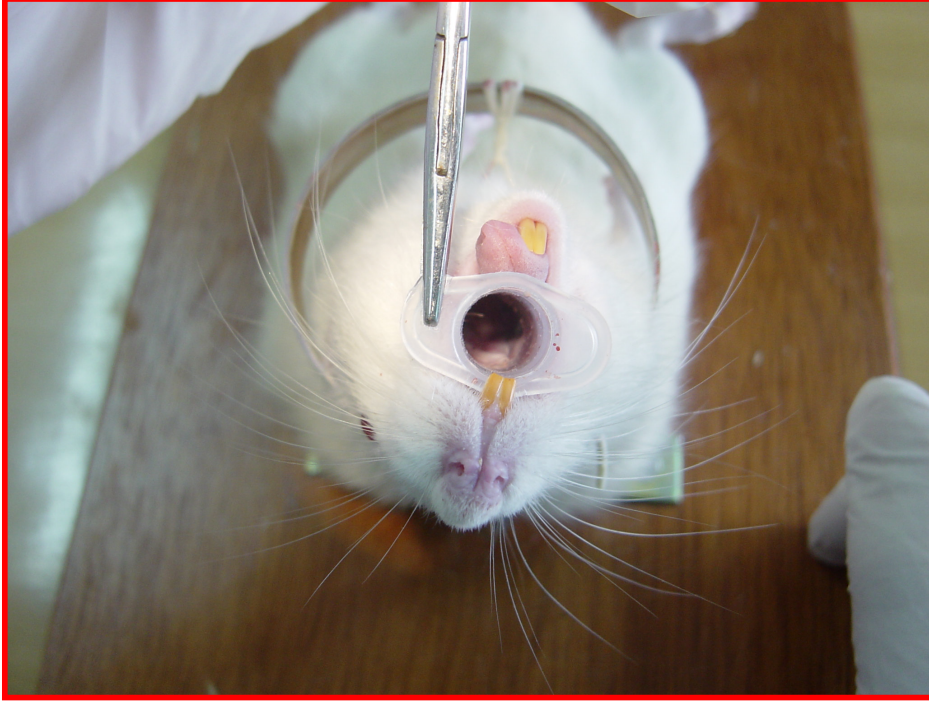
**Resim 2b:** Hazırlanan materyalin yandan görünüşü

Tüm hayvanlara cerrahi işlem öncesi intraperitoneal olarak 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar ®, Pfizer Warner Lambert, ABD) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun ®, Bayer, Mefar İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) verilerek anestezileri sağlandı. Takiben hayvanlara 0,05 mg/kg atropin sülfat intraperitoneal olarak verilerek tükürük salgısının ve larengeal lümendeki sekresyonun azaltılması amaçlandı. Tüm cerrahi işlemler spontan solunum devam ederken gerçekleştirildi. Ayak çekme refleksleri kontrol edilerek anestezi derinliği belirlendikten sonra ratlar operasyon platformuna alındı ve vertikale yakın bir pozisyonda yerleştirildi (Resim 3).



**Resim 3:** Platforma vertikale yakın bir pozisyonda yerleştirilen rat

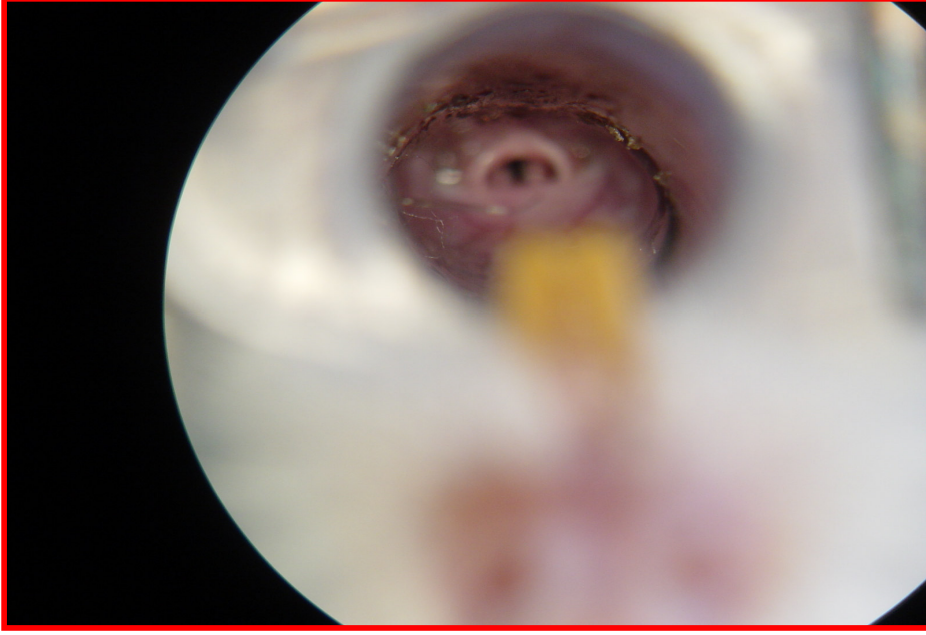
Dil bir penset yardımıyla nazikçe tutularak laterale alındı ve ekartör olarak kullanılmak üzere hazırlanan materyal uzun aksı dilin dorsal yüzüyle temasta olacak şekilde ağız içinde kaydırılarak larengeal düzeye inildi. Yerleştirilen materyalin açısı ve hayvanın pozisyonu sol el ile manipüle edilerek operasyon mikroskobu altında optimum görüş sağlandı (Resim 4a, 4b,4c, 4d).



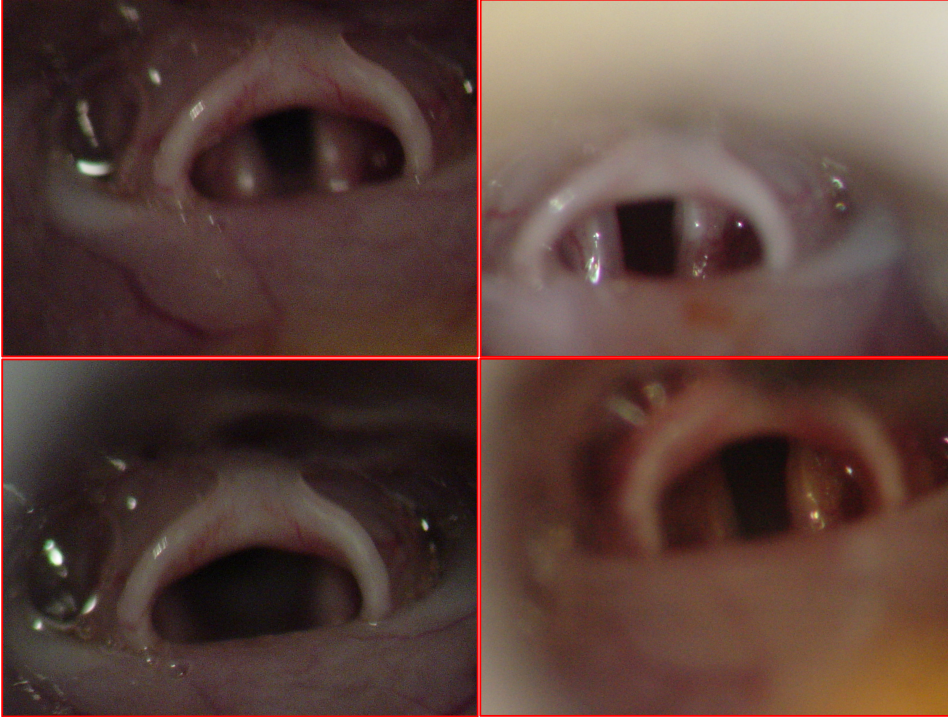
**Resim 4a:** Ağız içine yerleştirilen ekartör



**Resim 4b:** Sol el ile yapılan manipölasyon. Sol el ile ekartör açısı ve ratın pozisyonu değiştirilerek mikroskop altında en iyi görüş sağlandı.



**Resim 4c:** Ekartör içinden rat larenksi görünümü ( Rat mikrolaringoskopisi)



**Resim 4d:** Mikroskop altında sağlanan görüş

Ratlara iki farklı temel cerrahi prosedür uygulandı. Vokal korduna stripping uygulanan ratlarda ince kambur pik (EM-2056, Ömür Cerrahi Aletler, Antalya, Türkiye) yardımıyla vokal procesin hemen önünden girilerek kord epitelinin posterioru kaldırıldı. Kaldırılan epitelin ucu alligator forceps (O-1212, Ömür Cerrahi Aletler, Antalya, Türkiye) ile tutulup anteriora doğru sıyrılarak soyuldu ve dışarı alındı. Diğer grupta ise cerrahi prosedür olarak kas hasarı yaratılması planlandı. Bu amaçla kas hasarı oluşturmak üzere kordun ortası microcupped forceps (O-1224, Ömür Cerrahi Aletler, Antalya, Türkiye) ile ısırılarak doku eksizyonu uygulandı. İşlemden standartizasyon sağlamak amacıyla eksize edilecek doku hacmi microcupped forceps bir ısırışta dolduran miktar olarak belirlendi. Eksize edilen dokular Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenerek kas içerdiği gösterildi ve böylece kas hasarı yaratıldığı teyit edildi. Cerrahi işlemler her ratın sol korduna uygulandı. Karşı kord intakt bırakılarak kontrol olarak kullanıldı.

## 5.2. Çalışma Grupları

Yirmi adet rat altı grupta çalışmaya alındı.

*Grup Stripping S (n=5)* : Bu gruptaki ratlarda sol kord vokale yukarıda tanımlanan stripping işlemi uygulandı.

*Grup Stripping+ Pentoksifilin S+P (n=5)*: Bu gruptaki ratlarda sol kord vokale stripping uygulandı. Ancak farklı olarak ilk dozu preoperatif olmak üzere 14 gün boyunca 100 mg/kg/Gün Pentoksifilin (Trental ampul ®, 300mg/15ml, Aventis Pharma, İstanbul, Türkiye) intraperitoneal yoldan verildi.

*Grup Kas Hasarı K (n=5)*: Bu gruptaki ratlarda sol kord vokal ortası microcupped forceps ile ısırılarak tiroaritenoid kasdan belirtilen miktarda doku çıkartıldı ve kas hasarı oluşturuldu.

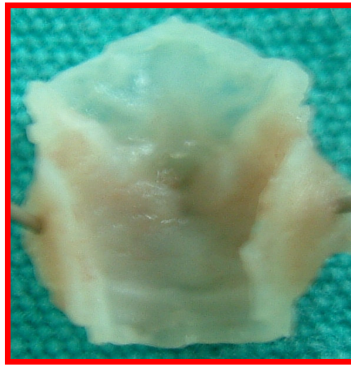
*Grup Kas Hasarı+ Pentoksifilin K+P (n=5):* Bu gruptaki ratlarda sol kord vokal ortası microcupped forceps ile ısırılıp kas hasarı oluşturuldu ve ilk dozu preoperatif olmak üzere 14 gün boyunca 100 mg/kg/gün pentoksifilin intraperitoneal yoldan verildi.

*Grup Kontrol (Pentoksifilin +) (n=10):* Bu grupta pentoksifilin alan hayvanların işlem görmeyen sağ kordları yer almaktadır.

*Grup Kontrol (Pentoksifilin -) (n=10):* Bu grupta pentoksifilin profilaksisi almayan hayvanların işlem görmeyen sağ kordları yer almaktadır.

Tek cerrahi uygulaması sonrasında hayvanlar 14 günlük iyileşme periyoduna bırakıldılar. Cerrahi sonrası erken dönemde bazı ratlarda hafif düzeyde solunum sıkıntısı meydana geldi. Ancak anestezi etkisinin geçmesiyle bu sıkıntının gerilediği görüldü. Ratlar standart pellet yemler ile beslendi , su ve yeme işlemleri serbest bırakıldı. Pentoksifilin dışında herhangi bir koruyucu kemoprofilaksi uygulanmadı.

Postop 14. günde hayvanlar yüksek doz pentotal (200 mg/kg; ip) verilerek sakrifiye edildi. Tüm hayvanlara larenjektomi yapılarak patolojik inceleme için spesmen sağlandı. (Resim 5).



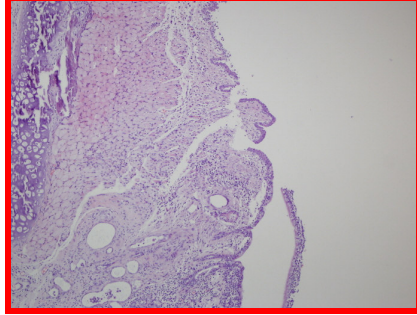
**Resim 5:** K grubundan bir ratın larenjektomi spesmeni

### 5.3. Patolojik İnceleme

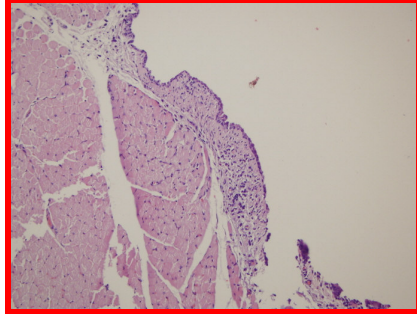
Çalışmanın patolojik hazırlık ve değerlendirme işlemleri aynı patolog tarafından yapılmıştır. Bu aşamada hayvan laboratuvarında çıkarılmış olan larengeal spesmenler posteriora interaritenoid bölgeden yapılan vertikal bir kesiyle açılarak vokal kordlar görüş altına alındı (Resim 5). Spesmen diseksiyon mikroskobu altında anterior komissürden yapılan vertikal kesiyle ikiye bölündü. Sonrasında her iki vokal kordun orta kısmından olacak şekilde bistüri yardımıyla vertikal planda doku örnekleri çıkarıldı. Çıkarılan örnekler %10'luk Formalin solüsyonu içinde fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Alınan 5 µm'lik kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyanarak ışık mikroskobu altında histopatolojik bulgular değerlendirildi (Resim 6 a,b,c,d,e). Epitel ve lamina propriada gözlenen enflamasyon ayrı ayrı değerlendirildi ve 0-3 puan arasında bir değer verilerek semikantitatif olarak skorlandı (Enflamasyon yok 0, Hafif enflamasyon 1, Orta derecede enflamasyon 2, Şiddetli enflamasyon 3). Aynı şekilde vasküler proliferasyon da benzer şekilde semikantitatif olarak skorlandırıldı.



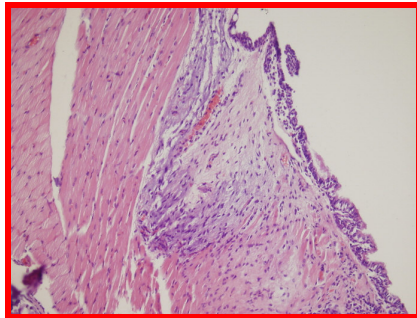
**Resim 6a:** Kontrol grubundan bir lareneal kesit  
E- Epitel, LP- Lamina Propria, MTA-Medial  
Tiroaritenoid Kas



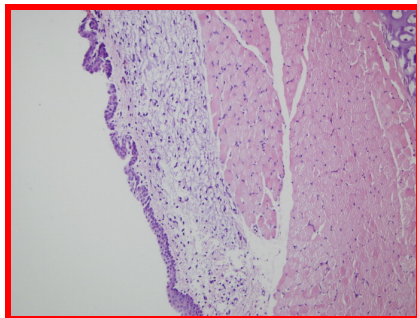
**Resim 6b:** S grubundan örnek kesit. LP 'da  
yoğun enflamatuar hücre göçü izleniyor.



**Resim 6c:** S+P grubundan örnek kesit. S+P  
grubunda bu enflamasyonun baskılandığını  
görmekteyiz.



**Resim 6d:** K grubundan örnek kesit. Kas içine  
uzanmış yoğun enflamatuar cevap izleniyor.



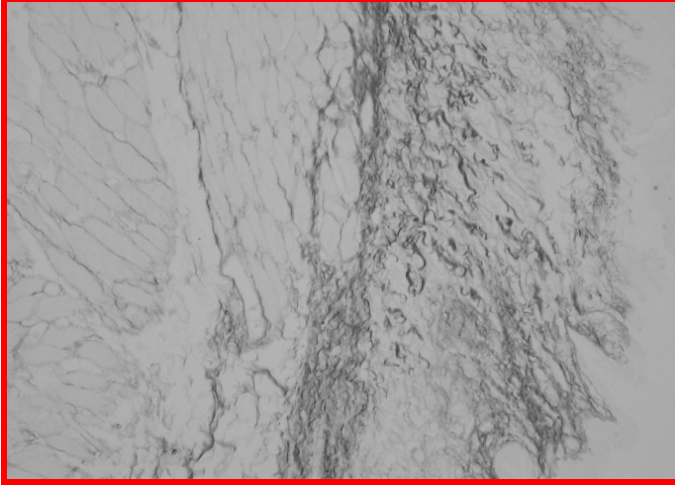
**Resim 6e:** K+P grubundan örnek kesit. K+P  
grubunda bu cevabın baskılandığını  
görmekteyiz.



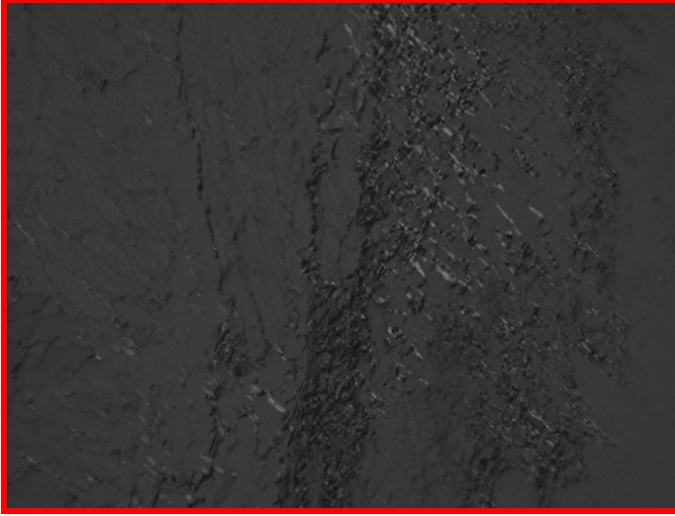
### *Kollajen Ölçümü*

Kord vokallerdeki matür ve immatür kollajen miktarının ölçümü Sirius Red ile boyalı kesitlerin bilgisayarlı dijital histokimya imaj analiziyle gerçekleştirildi. Kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra % 0,1 Sirius Red içeren satüre pikrik asit ile boyandı (35). Sirius Red ile boyanmış kesitlerden x40 büyütme altında, ışık mikroskobuna (Olympus BX51, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) bağlanmış 3CCD renkli video kamera (Olympus DP70, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) yardımıyla dijital görüntüler elde edildi. Görüntüler Mediscope imaj analiz yazılımı (Mediscope, Dokuz Eylül Üniversitesi, Klinik Mühendislik Bölümü, İzmir) ile işlenerek değerlendirmeye alındı (36,37,38,39). Her kord için dokuyu en iyi temsil eden bir görüntü alanı seçilerek ( $15878 \mu^2$ ) dijitalizasyon gerçekleştirildi.

Seçilen görüntüde boyalı alanın yüzdesi belirlenerek yapılan ölçüm için Sirius Red ile boyalı kesitler polarize ışık altında incelendi. Öncelikle patoloğ tarafından Sirius Red ile polarize ışıkta beyaz görünen alanlar görüntü üzerinde kliklenerek işaretlendi. Takiben sistem tarafından aynı boyanma özelliği gösteren tüm alanlar seçilerek pixel yoğunluğu belirlendi ve tüm alana göre yüzdesi hesaplandı. Böylece o kesit için kollajen dansitesi boyalı alan yüzdesi (BAY) olarak ortaya konmuş oldu (Resim 7 a,b,c). Bu değerlendirme yönteminin kullanıldığı önceki çalışmalarda bilgisayar destekli imaj analizi ile yapılan ölçümlerin oldukça güvenilir olduğu ortaya konmuştur (37).



**Resim 7a:** Sirius Red ile boyanmış örnek kesit siyah beyaz izleniyor.



**Resim 7b:** Bu kesitin polarize ışık altındaki görüntüsü. Beyaz görünen alanlar patolog tarafından işaretleniyor.



**Resim 7c:** Seçili alanın görüntüsü. Sistem işaretlenen alanla aynı renkte olan bölgeleri bulup seçiyor. Seçili beyaz alanın toplam alana göre yüzdesi alınarak kollajen dansitesi hesaplanıyor.

#### 5.4. İstatistiksel Analiz

Epitel ve lamina propria içinde enflamasyon ve vasküler proliferasyon, semikantitatif skorlamaya dayalı veriler olduğu için gruplar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapmak amacıyla sonuçlar yok-hafif (skoru 0 ve 1 olanlar) ve orta-ağır ( skoru 2 ve 3 olanlar) olmak üzere ikiye ayrıldı. Takiben gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Fischer's Exact Test kullanılması planlandı.

Kollajen değerleri ise ikili gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak test edildi. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlı kabul edildi.

## 6. BULGULAR

Araştırmadan elde edilen tüm veriler Tablo 1’de gösterilmektedir. Kontrol gruplarında enflamasyon ve vasküler proliferasyon skorları “sıfır” olduğu için tabloda yer verilmemiştir.

**Tablo 1:** Çalışma verilerinin dökümü

No	Grup	Lamina propria Enflamasyon Skoru	Epitel Enflamasyon Skoru	Vasküler Proliferasyon Skoru	Kollajen Sol kord (BAY)	Kollajen Sağ kord (Kontrol) (BAY)
1	S	3	2	1	4,0	1,3
2	S	3	2	2	3,3	1,8
3	S	1	1	1	2,8	0,9
4	S	2	1	1	3,3	1,9
5	S	3	1	0	3,2	1,0
6	S+P	2	0	0	3,1	1,3
7	S+P	1	0	1	2,9	1,5
8	S+P	1	0	0	2,5	1,3
9	S+P	1	0	0	3,3	2,0
10	S+P	1	0	0	2,9	0,8
11	K	1	1	0	4,3	0,9
12	K	2	1	0	4,4	1,2
13	K	2	0	0	3,7	1,2
14	K	2	1	1	3,2	1,3
15	K	2	0	1	4,0	1,0
16	K+P	1	0	1	3,0	1,1
17	K+P	1	0	0	3,7	0,9
18	K+P	1	0	0	2,9	1,4
19	K+P	1	0	1	2,6	1,9
20	K+P	1	1	1	3,1	1,0

(S: Stripping, K: Kas Hasarı, P: Pentoksifilin)

## 6.1. Kollajen Ölçümü (Boyalı alan yüzdesi- BAY)

Gruplardaki kollajen ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 2’de gösterilmektedir. İkili grupların Tablo 2’de verilen kollajen ortalamaları açısından farklılaşıp farklılaşmadığı Mann- Whitney U testi uygulanarak irdelenmiştir.

Yapılan değerlendirmede S grubu için ortalama kollajen miktarı  $3,32 \pm 0,43$  BAY olarak ölçülürken S+P grubunda  $2,94 \pm 0,29$  BAY olarak hesaplanmıştır. İki grup arasında ölçülen kollajen miktarı karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır (Mann- Whitney U,  $p=0,168$ ).

K grubunda ortalama kollajen miktarı  $3,92 \pm 0,49$  BAY ölçülürken , K+P grubunda ise  $3,06 \pm 0,40$  olarak saptanmıştır. Yapılan karşılaştırmada K+P grubunda ölçülen kollajen miktarının K grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir (Mann- Whitney U,  $p=0,021$ )

S ile K grupları arasında ise anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Mann- Whitney U , $p=0,114$ ).

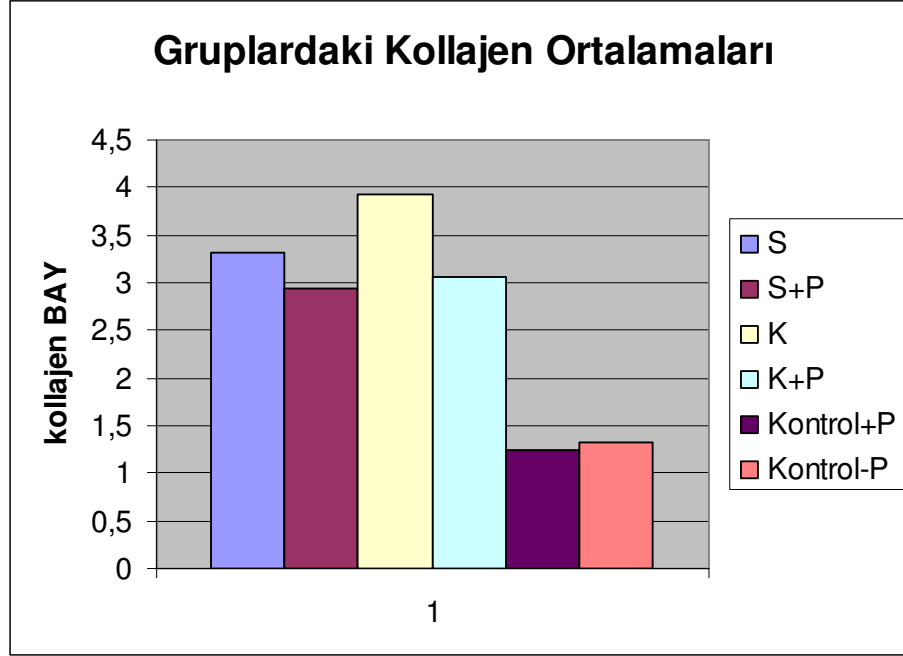
Pentoksifilin alan kontrol grubu için ortalama kollajen değeri  $1,25 \pm 0,35$  pentoksifilin almayan kontrol grubu içinse  $1,32 \pm 0,40$  olarak saptanmıştır. İki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Mann- Whitney U,  $p=0,568$ )

K+P grubu pentoksifilin almayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık mevcuttur (Mann- Whitney U,  $p=0,002$ ). Aynı şekilde S+P grubu ile pentoksifilin almayan kontrol grubu arasında da istatistiksel anlamlı fark vardır (Mann- Whitney U,  $p=0,002$ ).

**Tablo 2:** Gruplardaki kollajen ortalamaları ve standart sapmaları

Grup	Ortalama (BAY)	Standart sapma
S	3,32	0,43
S+P	2,94	0,29
K	3,92	0,49
K+P	3,06	0,40
Kontrol+ P	1,25	0,35
Kontrol- P	1,32	0,40

(S: Stripping, K: Kas Hasarı, P: Pentoksifilin)



**Şekil 3:** Gruplarda ölçülen kollajen değerleri ortalamaları (S: Stripping, K: Kas Hasarı, P: Pentoksifilin)

Enflamasyon ve vasküler proliferasyon skorları değerlendirilirken gruplar arasında Fischer exact test ile istatistiksel analiz yapılabilmesi için sonuçlar yok-hafif ( skoru 0-1 olanlar) ve orta-ağır ( skoru 2-3 olanlar) olmak üzere iki başlık altında toplandı. Ancak bazı gruplarda herhangi bir sonucu sağlayan deneğin bulunmaması (örneğin K+P grubunda orta-ağır enflamasyon gösteren bir denek yoktur) parametreyi “0” yapmakta Fischer’s exact testinin kullanılmasını teorik olarak mümkün kılmamaktadır. Bu nedenle istatistik analiz yerine sonuçların yorumlanmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

## 6.2. Lamina Propriada Enflamasyon

Elde edilen bulgular Tablo 3 de sunulmuştur. S grubunda üç olguda ağır, bir olguda orta ve bir olguda da hafif enflamasyon gözlenirken S+P grubunda dört olguda hafif ve bir olguda da orta derecede enflamasyon tespit edilmiştir.

K grubunda ise yalnızca tek olguda hafif enflamasyon gözlenirken kalan dört olguda orta derecede enflamasyon mevcuttur. Buna karşılık K+P grubunda tüm olgularda hafif enflamasyon tespit edilmiştir.

Kontrol grupları, enflamasyon olmadığı tespit edilerek değerlendirmeye alınmamıştır.

**Tablo 3:** Lamina propriadaki enflamasyon şiddetine göre gruplardaki dağılım

Gruplar	Lamina Propriada Enflamasyon				Toplam	
	Yok/hafif		Orta/ağır		Sayı	%*
	Sayı	%	Sayı	%		
S	1	20.0	4	80.0	5	100.0
S+P	4	80.0	1	20.0	5	100.0
K	1	20.0	4	80.0	5	100.0
K+P	5	100.0	0	0.0	5	100.0

(S: Stripping, K: Kas Hasarı, P: Pentoksifilin)

## 6.3. Epitelde Enflamasyon

Elde edilen bulgular Tablo 4 de sunulmuştur. S grubunda iki olguda orta derecede, üç olguda da hafif derecede enflamasyon saptanırken S+P grubunda hiçbir olguda enflamasyon gözlenmemiştir.

K grubunda üç olguda , K+P grubunda ise yalnızca bir olguda hafif enflamasyon tespit edilirken; K grubunda kalan iki olguda K+P grubunda ise kalan dört olguda enflamasyon görülmemiştir.

**Tablo 4:** Epiteldeki enflamasyon şiddetine göre gruplardaki dağılım

Gruplar	Epitelde Enflamasyon				Toplam	
	Yok/hafif		Orta/ağır		Sayı	%*
	Sayı	%	Sayı	%		
S	3	60.0	2	40.0	5	100.0
S+P	5	100.0	0	0.0	5	100.0
K	5	100.0	0	0.0	5	100.0
K+P	5	100.0	0	0.0	5	100.0

(S: Stripping, K: Kas Hasarı, P: Pentoksifilin)

#### 6.4. Vasküler Proliferasyon

Elde edilen veriler Tablo 5 de sunulmuştur. S grubunda üç olguda hafif, bir olguda orta derecede vasküler proliferasyon tespit edilirken kalan bir olguda vasküler proliferasyon saptanmamıştır. S+P grubunda ise yalnızca bir olguda hafif derecede vasküler proliferasyon tespit edilebilmiştir. Kalan olgularda vasküler proliferasyon saptanmamıştır.

K grubunda iki olguda , K+P grubunda üç olguda hafif vasküler proliferasyon saptanırken K grubunda kalan üç olguda ,K+P grubunda ise kalan iki olguda vasküler proliferasyon tespit edilmemiştir.

**Tablo 5:** Vasküler proliferasyon derecesinin gruptaki dağılımı

Gruplar	Vasküler Proliferasyon				Toplam	
	Yok/hafif		Orta/ağır		Sayı	%*
	Sayı	%	Sayı	%		
S	4	80.0	1	20.0	5	100.0
S+P	5	100.0	0	0.0	5	100.0
K	5	100.0	0	0.0	5	100.0
K+P	5	100.0	0	0.0	5	100.0

(S: Stripping, K: Kas Hasarı, P: Pentoksifilin)



## 7. TARTIŞMA

Fonasyon kord vokallerin adduksiyon pozisyonunda normal vibrasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Vibratuar özellik gösteren bu yumuşak medial kenarda ya da lamina propria içinde herhangi bir anormallik gelişmesi vibratuar paterni değiştirerek disfoniye yol açar. Polip ve kist gibi benign non neoplastik lezyonlar kord vokallerin kapanışını etkileyerek ve/veya mukozal dalga hareketini etkileyerek disfoni yaratırlar. Ancak bu lezyonların cerrahi eksizyonu da fonksiyonel kaybı tamamen düzeltmeye yetmez. Çünkü stripping tekniklerinde epitelin ve altındaki lamina proprianın hasarlanması kaçınılmazdır. Woo (1) benign kord lezyonları nedeniyle cerrahi geçiren 62 hastadaki postoperatif disfoninin en önemli sebebinin kord vokalde ileri skar oluşumu olduğunu göstermiştir. Yine kedi modelinde yapılan bir çalışmada korda uygulanan stripping sonucu skar oluşumu ortaya konmuştur (40). Fonocerrahide mikroflep cerrahisi, lazer uygulamaları gibi gelişmeler söz konusu olsa da normal yara iyileşme sürecinin kaçınılmaz sonu olan skar oluşumu karşımızda bir sorun olarak hala durmaktadır.

Bu konuda insanda yapılan çalışmalar daha çok oluşmuş matür skar dokusunun tedavisiyle ilgilidir. Klinik çalışmalar, doku içinde oluşan histopatolojik değişikliğin fonksiyona nasıl yansıdığını göstermesi bakımından önemlidir. Ancak bu konuda yapılan klinik çalışma sayısı hayvan çalışmalarına oranla oldukça azdır. Çünkü temel bilimlerde sağlanan gelişmeler ve hayvan çalışmalarından elde edilen bilgilerin klinikte uygulama alanı bulması oldukça uzun zaman almaktadır. Ayrıca araştırılan her yeni biyomateryalin insanda kullanımı mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, biz çalışmamızda kord vokal dokusunda skar oluşumunu azaltması amacıyla halihazırda kullanım gören ve yan etki profili düşük olan pentoksifilini kullandık.

Bjorck ve ark. (41) dört hasta üzerinde tamamladıkları prospektif çalışmalarında skatrize kord vokal içine dokuyu yumuşatması amacıyla kollajen (Zyplast) enjeksiyonu yapmışlardır. Enjeksiyondan 6-17 ay sonra hastalar değerlendirilmiş, vibrasyon amplitüdünde ve glottal kapanmada iyileşme olduğu gösterilmiştir. Ancak kord vokal hareketlerinde gözlenen bu iyileşme sesin akustik analizinde bir karşılık bulmamış, istenilen etkiyi yaratmamıştır.

Neuenschwander ve ark. (42) retrospektif çalışmalarında, skar oluşumu nedeniyle disfoni yakınması bulunan sekiz hastaya uygulanan otolog yağ implantasyonu sonuçlarını bildirmişlerdir. Kord vokal serbest kenarına yağ enjeksiyonuyla glottik kapanma, mukozal

dalga ve kordun katılığında olumlu düzelmeler gözlenmiş ancak skar dokusunun boyu değişmemiştir.

Hsiung ve ark.(43) da yaptıkları çalışmada otolog yağ enjeksiyonu sonuçlarını bildirmişlerdir. Hastalar akustik analiz yanında GRBAS skorlaması ve videolaringostroboskopi (VLS) ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda temel frekans ve fonasyon süresinde artış, jitter, shimmer ve harmonik/gürültü oranında azalma saptanmıştır. GRBAS skorlamasına göre ise disfoni derecesi, hava kaçağı ve ses gücünde düzelmeler gözlenirken sesin hiperfonksiyonel özelliği ve vibrasyon düzensizliği değişmemiştir. VLS sonuçları kord vokal kenarı , amplitüd, mukozal dalga, vibratuar davranış, simetri ve glottik kapanma parametrelerinde anlamlı değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur.

Hertegard ve ark.(44) skar nedeniyle glottik kapanma sorunu yaşayan hastalarda intrakordal Hylan B jel ve sığır kollajen enjeksiyonunu karşılaştırmışlardır. Her iki grupta da glottik kapanma düzelmiştir. Ancak vibratuar özellik, amplitüd ve maksimum fonasyon zamanı Hylan B jel grubunda anlamlı olarak artmıştır. Üstelik Hylan B jel doku içine enjekte edildikten sonra kollajene oranla çok daha az rezorbe olmuştur.

Kord vokalde yara iyileşmesi incelenirken dikkat çeken ilk nokta bu cevapta rol oynayan hücrelerin kordun hangi bölgesinden kaynak aldığı konusunda olmuştur. Makula flava ve lamina propria bu konuda tartışılan iki bölgedir. Lamina propriadaki fibroblastların iğsi şekilli ve az gelişmiş organellere (düz endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı) sahip oldukları buna karşılık makula flavadakilerin ise stellat şeklinde ve iyi gelişmiş organellere (düz endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı) sahip oldukları gösterilmiştir (45). Sato ve ark. (46) yaptıkları çalışmada makula flavanın lamina propriadaki ECM komponentlerinin metabolizmasından sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Fayoux ve ark. (47) ise makula flavadaki hücrelerin kondroid natürde olduklarını, ECM üretiminin yanında bir diğer önemli işlevinin hücre üretimi olduğunu ve vokal foldda hücre kaynağı olarak hizmet verdiğini ileri sürmüşlerdir. Ancak Tateya ve ark. (48) ratlarda kord vokal hasarına cevap olarak gördükleri proliferasyonun makula flavada değil lamina propriada olduğunu dolayısıyla makula flavanın hücre sağlayıcı fonksiyonunun olmadığını belirtmişlerdir. Tateya ve ark. bunu, makula flavadaki gelişmiş organellere sahip hücrelerin iyi diferansiye olduklarına; artan diferansiyasyonun ise proliferasyon yeteneğini azalttığı gerçeğine bağlamaktadırlar.

Araştırmamızda iki farklı derinlikte hasar yaratılarak, oluşan cevap karşılaştırıldı. KH grubunda kordun orta 1/3 ü microcupped forceps ile ısırılarak doku defekti oluşturuldu. Eksize

edilen dokular patolojide incelenerek kas içerdiği gösterildi ve kas hasarı doğrulandı. Çalışmamızda S ile K grubu arasında kollajen düzeyi açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (  $p= 0,114$  ). Ancak istatistiksel olarak karşılaştırılamasa da S grubunda K grubuna göre daha yoğun bir enflamatuar cevap olduğu görülmüştür. Stripping uygulanan ratlarda vokal procesten anterior komissüre kadar tüm epitelin soyulduğu dikkate alındığında bu grupta yapılan hasarın yüzey alanının, K grubundaki hasara göre daha fazla olduğu söylenebilir. Yine S grubunda yapılan hasarın, kord vokal içinde yara iyileşmesinde hücresel cevaptan sorumlu tutulan her iki bölgeyi de ( lamina propria ve makula flava) etkilediğini düşünürsek S grubundaki yoğun enflamatuar cevabın nedeni açıklanabilir. Bu nedenle benign kord vokal lezyonları nedeniyle cerrahi uygularken cerrahi travmayı mümkün olan en sınırlı alanda tutmak başlıca hedefimiz olmalıdır.

Kord vokalde yara iyileşmesi konusunda dikkat çeken diğer nokta ise iyileşme sürecinin enflamatuar ve proliferatif fazda cilttekiyle aynı olduğu ancak remodelasyon fazında farklılık sergilediği konusundadır. Normalde cilt dokusunda yara iyileşirken kollajen tipIII başlangıçta hızla sentezlenir ve bir yapı iskeleti görevini görür. Kollajen tip I ise hasardan yaklaşık üç gün sonra sentezlenmeye başlar ve yedinci günden başlayarak tip III'ün yerini alır (31). Tateya ve ark.'nın (6) yapmış oldukları rat modelinde akut kord vokal hasarına cevabı inceleyen çalışmada da granülasyon dokusuna iskelet görevi gören kollajen Tip III'ün birinci günde, oluşan bu frajil dokuyu sağlamlaştıracak olan Tip I'in ise üçüncü günde ortaya çıktığı gösterilmiştir. Ancak cilttekine zıt olarak kollajen tip I'in beşinci günden sonra azalmasına karşılık kollajen tip III'ün 3-14. günler arasında değişmeden kaldığı ortaya konmuştur. Bu bulgu kord vokalde remodelasyon fazının cilttekenden farkını vurgulamaktadır. Thibeault ve ark.'nın (49) yapmış oldukları çalışmada da kord vokalde yara iyileşme sürecinde kollajen tip I'in 2-8 hafta arasında giderek azaldığı, kollajen tip III'ün yüksek düzeylerinin ise 2-12 hafta arasında stabil kaldığı gösterilerek bu bulgu desteklenmiştir.

Reepitelizasyon, hücre migrasyonu ve matriks depozisyonunda rol alan fibronektinin ekspresyon paterni ise cilttekiyle aynıdır. Birinci günde reepitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşmadan önce açığa çıkar; 3-14 gün arasında kollajen birikimi ve remodelasyona paralel olarak yüksek düzeylerde kalır.

Yine yara iyileşmesi üzerine olumlu etkisi olan hyaluronik asit, yara yerinde üçüncü günde saptanmış, beşinci günde pik yaptıktan sonra da düşmeye başlamıştır. Ancak sadece 5. günde kontrol ile arasında anlamlı bir fark gözlenmezken ; 3.,7. ve 14. günlerde kontrol

grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Thibeault ve ark. (49) da tavşan modelinde yaptıkları çalışmalarında hyaluronik asidin kord vokal hasarı sonrası beşinci günde pik yaptığını belirtmişlerdir. Bu bulgular gösteriyor ki hyaluronik asidin ekspresyon paterni de cilt dokusuyla aynıdır. Tateya ve ark. (6) rat modelinde akut kord vokal hasarına cevabı inceledikleri çalışmalarında sonuç olarak; reepitelizasyonun 14 günde tamamlandığını, hyaluronik asid düzeyinin düştüğünü, fibronektin ve kollajenin miktarının ise yükseldiğini göstermişlerdir. Bu çalışmanın iki önemli yönü şöyle sıralanabilir:

1. Daha önce yapılan rat modeli dışındaki hayvan çalışmalarında skar dokusunun ana bileşeni olan kollajenin birikimi geç dönemde tespit edilmiştir. Oysa kısa hayat süreleri sebebiyle yara iyileşme sürecinin hızlı işlediği ratlarda bu birikim erken dönemde ortaya çıkmıştır.
2. Hasara verilen cevapta hyaluronik asit, fibronektin, kollajen gibi ECM matriks komponentlerinin üretimi hemen başlar ve genelde 3-5. günler arasında pik yapar. Dolayısıyla skar formasyonunu azaltmaya yönelik stratejiler açısından bu periyod oldukça önemlidir.

Skar dokusunun ana bileşeni olan kollajen normal kord vokal yapısı içinde de epitelyal mukozaya paralel uzanan demetler halinde ve her üç tabakada da değişen oranlarda bulunmaktadır. Biz çalışmamızda kollajeni tespit etmek için Sirius Red boyası kullandık. Buna Tateya ve ark.'nın (6) yapmış oldukları çalışmada trichrome boyaması ve immunhistokimya olmak üzere iki farklı yöntemle tespit edilen kollajen düzeyinin farklılık göstermesi nedeniyle karar verdik. Şöyle ki; bu çalışmada trichrome boyamasıyla elde edilen sonuca göre kollajen 3-14. günler arasında sürekli artış gösteriyordu. Ancak kollajeni tiplendirebilmek (I- III) amacıyla antikorlar kullanılarak yapılan immunhistokimya ölçümlerinde ise 3-5. günlerdeki düzeyin 7-14. günlerdekinden farklı olmadığı ve kontrole oranla yüksek kaldığı sonucuna varılmıştı. Trichrome boyasının daha kalın, organize kollajen demetlerini boyadığı dikkate alınarak, bu farkın erken fazda sentezlenen ancak trichrome ile boyanmayıp immunhistokimya ile yakalanan immatür kollajenden kaynaklandığı söylenebilir. Bu nedenle çalışmamızda tüm kollajeni yakalamak amacıyla immatür kollajeni de boyayan Sirius Red boyasını tercih ettik.

Kord vokal dokusunda yara iyileşme sürecinin ayrıntılarıyla ortaya konmuş olması araştırmacıları hem oluşmuş matür skar dokusunun tedavisi hem de skar oluşumunun önlenmesi konusundaki çalışmalara yöneltmiştir.

Kriesel ve ark. (50) lamina propriadaki matur skar dokusunu tedavi etmek amacıyla enjektabl homolog kollajen matris kullanmışlar ancak skar dokunun biyomekanik özellikleri değişmemiş ve başarı elde edememiştir.

Yara iyileşmesindeki olumlu rolü nedeniyle dokudaki hyaluronik asid düzeyini artırmaya yönelik yapılan çalışmalar ümit vermektedir. Rousseau ve ark. (10) domuz modelinde anti hyaluronidaz etkili echinacide etkisini incelemiştir. Çalışmalarında hasarlanan kord vokal dokusunda hyaluronik asid seviyesini tedavi verilen grupta verilmeyene göre yüksek bulmuşlardır. Bu seviye hasarlanmayan normal kord vokal dokusuyla aynıdır. Yine kollajen dansitesi tedavi verilen grupta anlamlı olarak azalmıştır.

Hirano ve ark. (51,52) tavşan ve köpek modelinde dokuda hyaluronik asid düzeyini yükselttiği düşünülen hepatosit growth faktör'ün (HGF) etkisini incelemiştir. Her iki modelde de HGF kollajen dansitesini ve doku kontraksiyonunu azaltarak biyomekanik özellikleri iyileştirmiştir. Ancak HA düzeyinin ölçülmemiş olması mekanizma konusunda spekülasyona yol açmıştır.

Fibroblast proliferasyonunu ve skar oluşumunu engellediği gösterilen Mitomisin-C (MMC) de alternatif olarak denenmiştir. Cerrahi esnasında topikal uygulamasının fibrozisi azaltarak kalıcı disfoniyi önleyebileceği hipotez edilmiştir. Garrett ve ark. (11) köpek modelinde yaptıkları çalışmada MMC uygulanan kord vokal dokusunda lamina propria içeriğinin azaldığını ve kordun atrofik hale geldiğini göstermişlerdir. Stroboskopi ile ölçülen vibratuar patern ise mukozal dalga hareketinin ya değişmediğini ya da azaldığını ortaya koymuştur. Histolojik analizde ise MMC uygulanan dokuda fibroblast ve kollajen yoğunluğu kontrole oranla düşük bulunmuştur. Ancak histolojik olarak istenen bu sonuç, beklenen fonksiyonel kazancı beraberinde getirmemiştir.

Yine köpek modelinde yapılan bir çalışmada mezenkimal kök hücre tedavisi denenmiştir (12). Kemik iliğinden elde edilen kök hücreler hasardan dört gün önce intrakordal enjeksiyonla doku içine verilmiştir. Tedavi edilen grupta morfolojik olarak kordun daha az irregülerite ve fibrotik değişiklik gösterdiği, granülasyon polibi gelişiminin azaldığı tespit edilmiştir.

Biz ise yaptığımız çalışmada skar oluşumunu azaltması amacıyla pentoksifilin kullanmayı tercih ettik. Pentoksifilin daha önce pek çok dokuda çalışılmasına karşılık kord vokal dokusundaki yara iyileşmesi konusunda hiç kullanılmamış olması tercihimizin sebepleri arasındadır. Bir diğer sebep de oldukça güvenli, iyi tolere edilen ve yan etkileri az

olan bu ilacın uzun süreden beri periferik arter hastalıkları başta olmak üzere değişik endikasyonlarda geniş kullanım görüyor olmasıydı. Pentoksifilin primer hemoreolojik etkisi eritrosit deformabilitesini arttırmak ve kan viskozitesini düşürmektir. Ancak bu temel hemoreolojik etkisinin yanında antiproliferatif, antienflamatuar, antifibrotik etkileri de mevcuttur.

Pentoksifilin yenidoğan sıçanlardaki akciğer hasarında etkileri konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İnflamatuar hücreleri baskılamasının yanısıra, pulmoner epitel hücrelerinden kemokin salınımının da pentoksifilin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (53). Hayvan deneyleri sonucunda pentoksifilin akciğer hasarı üzerine etkileri konusunda farklı sonuçlar alınmıştır. Sıçanlarda endotoksin ile geliştirilen akut akciğer hasarında pentoksifilinden fayda görülmüştür (54). Gavino ve ark. (55) pentoksifilin hiperoksi uygulanan sıçanlarda pnömositlerin apoptozunu engellediğini göstermişlerdir. Ter Horst ve ark. (56) yaptıkları çalışmanın sonucunda, hiperoksi uygulanan yenidoğan sıçanlarda 150 mg/kg/g dozunda pentoksifilin kullanımı ile kontrol gruba göre sağkalımın uzadığını, fibrin birikiminin belirgin azaldığını bildirmişlerdir.

Ratlarda oluşturulan pyelonefrit modelinde ise Yagmurlu ve ark. (14) intraperitoneal yoldan 100 mg/kg/gün dozunda verilen Pentoksifilin'in renal skar formasyonunu önlediğini göstermişlerdir.

Pentoksifilin in vitro ve in vivo ortamda mezanjiyal hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (57,58). Yine renal fibroziste önemli rolleri olan lenfosit ve renal fibroblastların aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder. Pentoksifilin antiproliferatif etkisini, hem proliferasyonda rol alan sitokin ve growth faktörlerin in vivo ekspresyonunu azaltarak hem de bu mediatörleri sentezleyen hücreleri ( inflammatuar hücreler, mezenjiyal hücreler, renal fibroblastlar) sayıca azaltarak gösterir (57).

Hayvanlardaki deneysel mezenjiyal proliferatif glomerulonefrit modelinde pentoksifilin, interstisyel dokuda makrofajların, lenfositlerin ve MHC klas II antijeni taşıyan diğer hücrelerin akümüasyonunu azaltmıştır (57). Bu antienflamatuar davranış proteinüri ve azoteminin zayıflaması, glomerüler kresent, skleroz oluşumunun ve interstisyel fibrozisin azalması gibi renoprotektif etkiler ile ilişkilendirilir (57). Antienflamatuar etki MHC klas II antijen ekspresyonunun azalmasının yanı sıra diğer proinflammatuar sitokin ve kemokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\delta$ ) sekresyonunun da inhibe edilmesiyle oluşur (59).

Çalışmamızda lamina propriadaki enflamasyon dikkate alındığında S grubunda %80 olan orta-ağır enflamasyon oranı S+P grubunda %20 olarak tespit edilmiştir. Yine K grubunda orta-ağır enflamasyon oranı %80 iken K+P grubunda bu oran %0'dır. Epitel enflamasyonuna baktığımızda ise her iki hasar çeşidinde de pentoksifilinin enflamatuvar cevabı baskıladığını görmekteyiz. Bu sonuçlar pentoksifilinin literatürde bahsedilen antiinflamatuvar etkisini desteklemektedir.

Mezenjiyal hücre kültürlerinde pentoksifilinin ECM gen ekspresyonunu azalttığı ve kollajen tip I, III, fibronektin gibi proteinlerin sentezini baskıladığı gösterilmiştir (58). Hayvanlarda yapılan mezenjiyal proliferatif glomerulonefrit, kresentli glomerulonefrit modelinde pentoksifilinin bu antifibrotik etkisiyle glomeruloskleroz ve interstisyel fibrozis gelişimini önlediği ortaya konmuştur (57). Global antifibrotik etki, mezenjiyal hücre ve fibroblastlarda growth faktör ekspresyonunun azalmasıyla birlikte proliferasyonun ve ECM sentezinin inhibisyonu yoluyla oluşmaktadır.

Araştırmamızda pentoksifilinin kollajen dansitesini K+P grubunda K grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (  $p= 0,021$ ). S+P grubu ile S grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlılığa yakın almakla birlikte p değerinin 0,05'in üstünde kaldığı görülmüştür (  $p= 0,168$  ). Bu sonuç denek sayısının azlığına bağlanabilir. K+P ve S+P grupları ile kontrol grubunun kollajen ortalamaları açısından farklılaşp farklılaşmadığına bakılmış ve her iki grup için de anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $p= 0,002$  ve  $p= 0,002$ ). Bu sonuçlar pentoksifilinin kollajen sentezini azaltarak antifibrotik etki gösterdiği yönündeki literatür bilgilerini desteklemektedir. Ancak pentoksifilin alan her iki grupta da kollajen düzeyinin normal dokuya göre yüksek kalması amaçlanan hedefe tam olarak ulaşamadığının bir göstergesidir.

Sonuç olarak; pentoksifilinin, diğer dokularda gösterilen antiinflamatuvar ve antifibrotik davranışını kord vokal dokusundaki yara iyileşmesi sürecinde de sergilediği çalışmamızda ortaya konmuştur. Ancak bu etkinin insan ses parametrelerine fonksiyonel anlamda ne kazandırdığı konusunda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 8. SONUÇ

Çalışmamızda pentoksifilin hem S+P hem de K+P grubunda, yapılan hasara cevap olarak ortaya çıkan enflamasyonu belirgin oranlarda baskıladığı görülmüştür. S grubunda K grubuna kıyasla daha yoğun bir enflamatuvar cevap gözlenmesine rağmen iki grubun kollajen değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. S grubunda görülen yoğun enflamatuvar cevap bu grupta hasarın yüzey alanının daha fazla olmasına ve lamina propria dışında makula flavanın da etkilenmesine bağlanmıştır.

Denek sayısının azlığı nedeniyle pentoksifilin vasküler proliferasyon üzerine olan etkisi hakkında yorum yapılamamaktadır.

Gruplar arası kollajen ortalamaları karşılaştırıldığında kollajen düzeyi K+P grubunda K grubuna göre anlamlı ölçüde düşük seviyede kalmıştır. S+P grubunda S grubuna göre kollajen seviyesi düşme göstermesine rağmen iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı ortaya konmuştur. Her iki grupta da (K+P, S+P) ölçülen kollajen miktarı kontrole kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda dokudaki immatür ve matür kollajenin tamamı ölçülmüş ancak kollajenin tiplendirmesi (I-III) yapılmamıştır. Yine ECM içindeki diğer bileşenlerin (hyaluronik asit, fibronektin) düzeyine bakılmamıştır. Kord vokalin biyomekanik özelliklerinin ECM içinde yer alan komponentlerin dansitesi ve dağılımı tarafından belirlendiği bilinmektedir. Yara iyileşmesinde yüksek hyaluronik asit düzeylerinin olumlu katkısı ortaya konmuş, düzeyini arttırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Dolayısıyla skar oluşumunun azaltılması hedeflenirken kollajen düzeyinin düşürülmesinin yanında diğer ECM bileşenlerinin istenilen seviyeye getirilmesi de önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle skar oluşumunu azaltması amacıyla kullandığımız pentoksifilin yara iyileşmesi sırasında diğer ECM bileşenlerinin ve kollajen subtiplerinin sentezini nasıl etkilediğini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu sonuçlar pentoksifilin diğer dokularda gösterilen antienflamatuvar ve antifibrotik etkilerinin kord vokal dokusunda da oluştuğunu desteklemektedir. Ancak kollajen



değerlerinin kontrole göre anlamlı ölçüde yüksek kalması, normal dokuyla kıyaslandığında en az farkla iyileşmeyi sağlayacak optimum dozun saptanması açısından denek sayısının daha fazla olduğu ve pentoksifilin değişik dozlarda, değişik yollardan kullanıldığı ileri çalışmaları gerektirmektedir.

Dikkat çeken diğer bir soru da istenilen histopatolojik değişikliğin beklenen fonksiyonel kazancı beraberinde getirip getirmeyeceği konusudur. Hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçların klinikte uygulama bulması oldukça uzun zaman almaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kemoprofilaktik olarak halen insanda kullanılmakta olan ve yan etki profili düşük pentoksifilini kullandık. Benign kord lezyonları nedeniyle cerrahi geçiren hastalara pentoksifilin uygulaması sonrasında yapılacak objektif ve subjektif ses değerlendirmeleriyle (ses bozukluğu indeksi, GRBAS skalası, akustik ses analizi, maksimum fonasyon süresi ölçümü, videolaringostroboskopik ölçümler ve videolaringostroboskopik imaj üzerinde alan ve açı hesaplamaları) bu soruya cevap bulunabileceği inancındayız.

## **9. KAYNAKLAR:**

- 1- Woo P, Casper J, Cotton R, Brewer D. Diagnosis and treatment of persistent dysphonia after laryngeal surgery: a retrospective analysis of 62 patients. *Laryngoscope* 1994;104:1084-1091.
- 2- Catten M, CJrav SD, Hanitnond TH, Zhou R, Hammond E. Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:663-667.
- 3- Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 1999;109(6):845-854.
- 4- Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH. Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109(1):77-85.
- 5- Benninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R, Ford C, Koufman J, Sataloff RT, Spiegel JR, Woo P. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;115(5):474-482. (In medline)
- 6- Tateya T, Tateya I, Sohn JH, Bless DM . Histological study of acute vocal fold injury in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(4):285-292.
- 7- Hirano S, Bless DM, Heisey D, Ford C. Effect of growth factors on hyaluronan production by canine vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:617-624.
- 8- Hirano S, Bless DM, Heisey D, Ford C. Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor B1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope* 2003;113:144-148.

- 9- Hirano S, Bless DM, Massey RJ, Hartig GK, Ford CN. Morphological and functional changes of human vocal fold fibroblasts with hepatocyte growth factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:1026–1033.
- 10- Rousseau B, Tateya I, Lim X, Munoz-del-Rio A, Bless DM. Investigation of anti-hyaluronidase treatment on vocal fold wound healing. *J Voice* 2006;20(3):443-451.
- 11- Garrett CG, Soto J, Riddick J, BillanteCR,Reinisch L. Effect of mitomycin-C on vocal fold healing in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:25–30.
- 12- Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magrufov A, Hiratsuka Y. Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:915–920.
- 13- Lin SL, Chen YM, Chiang WC, Tsai TJ, Chen WY. Pentoxifylline: a potential therapy for chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 2004;9(4):198-204.
- 14- Yagmurlu A, Boleken ME, Ertoy D, Ozsan M, Gokcora IH, Dindar H. Preventive effect of pentoxifylline on renal scarring in rat model of pyelonephritis. *Urology* 2003;61(5):1037-1041.
- 15- Sefa Kaya. *Larenks Hastalıkları*, 1. baskı Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi 2002: 19-20.
- 16- Behbut Cevanşir, Güzin Gürel. *Foniatri Sesin oluşumu Bozuklukları ve Korunmasında Temel İlkeler*,. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Ders Kitabı.
- 17- Atilla Yavuzer. *Larenksin Benign Lezyonları*, in: Çelik O. ed. *Kulak Burun Boğaz hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*, 1. Baskı, İstanbul, Turgut yayıncılık 2002: 651-659.
- 18- Petcu LG, Sasaki CT. in: Ballenger J.J, ed: *Diseases of the Nose Throat Ear Head and Neck*, 14th ed, Philadelphia: Lea and Febier 1991; 478-497.

- 19- Sato K, Hirano M. Histologic investigation of the macula flava of the human newborn vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104(7):556-562.(In medline)
- 20- Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Scheidt T, Ford CN. Fibronectin and adhesion molecules on canine scarred vocal folds. *Laryngoscope* 2003;113(6):966-972.(In medline)
- 21- Kischer CW, Hendrix MJ. Fibronectin (FN) in hypertrophic scars and keloids. *Cell Tissue Res* 1983;231(1):29-37.(In medline)
- 22- Ongenaie KC, Phillips TJ, Park HY. Level of fibronectin mRNA is markedly increased in human chronic wounds. *Dermatol Surg* 2000;26(5):447-451.(In medline)
- 23- Thibeault SL, Bless DM, Gray SD. Interstitial protein alterations in rabbit vocal fold with scar. *J Voice* 2003;17(3):377-383.
- 24- Pawlak AS, Hammond T, Hammond E, Gray SD. Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105(1):6-11.(In medline)
- 25- Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice* 2002;16(1):96-104.
- 26- Ward PD, Thibeault SL, Gray SD. Hyaluronic acid: its role in voice. *J Voice* 2002;16(3):303-309.
- 27- Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124(6):607-614.
- 28- Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope* 2001;111(5):907-911. (In medline)

- 29- Estes JM, Adzick NS, Harrison MR, Longaker MT, Stern R. Hyaluronate metabolism undergoes an ontogenic transition during fetal development: implications for scar-free wound healing. *J Pediatr Surg* 1993;28(10):1227-1231.(In medline)
- 30- Benninger MS, Alessi D, Archer S, Bastian R et all. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;115(5):474-482.
- 31- Stephens P, Thomas DW. The cellular proliferative phase of the wound repair process. *J Wound Care* 2002;11(7):253-261.(In medline)
- 32- Singer AJ, Clarck RA Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341:738-746
- 33- Ward A, Clissold SP.Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987;34(1):50-97.
- 34- Gray SD. Hirano M. Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR. Ed. *Vocal fold physiology: frontiers of basic science*. San Diego. Calif:Singular Publishing Group 1993:1-34
- 35- Francis RJ. Amyloid. In: Bancroft JD, Stevens A, eds. *Theory and practice of histological techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990:155-175.
- 36- Sarioglu S, Celik A, Sakar M, Sonmez D, Tekis D. Methenamine silver staining quantitative digital histochemistry in chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2004;36: 2991-2992.
- 37- Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M. Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:32-38.
- 38- Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, Sen M, Kinay M. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:417-424.

- 39- Kavukcu S, Soylu A, Turkmen M, Kuralay F, Yilmaz O, Sarioglu S. Unilateral ureteroperitoneostomy in the management of hypoproteinemia in nephrotic rats with normal renal function. *Tohoku J Exp Med* 2003;201:67-73.
- 40- Leonard RJ, Kiener D, Charpied G, Kelly A. Effects of repeated stripping on vocal fold mucosa in cats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985;94(3):258-262.(In medline)
- 41- Bjorck G, D'Agata L, Hertegard S. Vibratory capacity and voice outcome in patients with scarred vocal folds treated with collagen injections--case studies. *Logoped Phoniatr Vocol* 2002;27(1):4-11.
- 42- Neuenschwander MC, Sataloff RT, Abaza MM, Hawkshaw MJ, Reiter D, Spiegel J. Management of vocal fold scar with autologous fat implantation: perceptual results. *J Voice* 2001;15(2):295-304.
- 43- Hsiung MW, Woo P, Minasian A, Schaefer Mojica J. Fat augmentation for glottic insufficiency. *Laryngoscope* 2000;110(6):1026-1033.
- 44- Hertegard S, Hallen L, Laurent C, Lindstrom E, Olofsson K, Testad P, Dahlqvist A. Cross-linked hyaluronan used as augmentation substance for treatment of glottal insufficiency: safety aspects and vocal fold function. *Laryngoscope* 2002;112(12):2211-2219.
- 45- Hirano M, Sato K, Nakashima T. Fibroblasts in human vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol* 1999;119(2):271-276.(In medline)
- 46- Sato K, Hirano M, Nakashima T. Stellate cells in the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110(4):319-325.
- 47- Fayoux P, Devisme L, Merrot O, Chevalier D, Gosselin B. Histologic structure and development of the laryngeal macula flava. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113(6):498-504.

- 48- Tateya I, Tateya T, Lim X, Sohn JH, Bless DM. Cell production in injured vocal folds: a rat study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(2):135-143.
- 49- Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope* 2004;114(4):760-764.
- 50- Kriesel KJ, Thiebault SL, Chan RW, Suzuki T, VanGroll PJ, Bless DM, Ford CN. Treatment of vocal fold scarring: rheological and histological measures of homologous collagen matrix. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111(10):884-889.
- 51- Hirano S, Bless DM, Nagai H, Rousseau B, Welham NV, Montequin DW, Ford CN. Growth factor therapy for vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113(10):777-785.
- 52- Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, Ford CN. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope* 2004;114(3):548-556.
- 53- Krakauer T. Pentoxifylline inhibits ICAM-1 expression and chemokine production induced by proinflammatory cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Immunopharmacology* 2000;46:253-261. (In medline)
- 54- Michetti C, Coimbra R, Hoyt DB, Loomis W, Junger W, Wolf P. Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia. *J Surg Res* 2003;115:92-99.
- 55- Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide: modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline. *Cytokine* 2002;20(6):247-255.
- 56- Ter Horst SAJ, Wagenaar GTM, de Boer E, van Gastelen MA, Meijers JCM, Biemond BJHM, Walther FJ. Pentoxifylline reduces fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* 2004;2014-2019.

57- Lin SL, Chen YM, Chien CT, Chiang WC, Tsai CC, Tsai TJ. Pentoxifylline attenuated the renal disease progression in rats with remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002 ;13(12):2916-2929.

58- Tsai TJ, Lin RH, Chang CC, Chen YM, Chen CF, Ko FN, Teng CM. Vasodilator agents modulate rat glomerular mesangial cell growth and collagen synthesis. *Nephron* 1995;70(1):91-99.(In medline)

59- Heystek HC, Thierry AC, Soulard P, Moulon C. Phosphodiesterase 4 inhibitors reduce human dendritic cell inflammatory cytokine production and Th1-polarizing capacity. *Int Immunol* 2003;15(7):827-835.(In medline)