

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ



TRAKEA CERRAHİSİNDE LOKAL OLARAK UYGULANAN TGF- β 3'ÜN

YARA İYİLEŞMESİ VE STENOZ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Aykut ELİÇORA

UZMANLIK TEZİ

GÖĞÜS CERRAHİSİ

2011

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ



TRAKEA CERRAHİSİNDE LOKAL OLARAK UYGULANAN TGF- β 3'ÜN

YARA İYİLEŞMESİ VE STENOZ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Aykut ELİÇORA

GÖĞÜS CERRAHİSİ

Danışman : Doç.Dr.Şerife Tuba LİMAN

2011

ÖNSÖZ

2

KOÜ Göğüs Cerrahisi kliniğinde asistanlığım süresince, değerli bilgi ve deneyimlerini aktararak eğitimime katkı sağlayan ve her konuda yardımlarını esirgemeyen, mesleki, insani ve etik tecrübelerinden çok şey öğrendiğim Göğüs Cerrahisi AD. başkanı değerli hocam Prof.Dr.Salih TOPÇU'ya ve pozitif enerjileri, çalışkanlıkları ile her zaman örnek aldığım, tez çalışmamda katkı ve yardımlarını esirgemeyen, üzerimde büyük emekleri olan değerli hocalarım Doç.Dr.Ş.Tuba LİMAN ve Yrd.Doç.Dr.A.Gül AKGÜL'e ;

Rotasyonlarım sırasında, mesleki açıdan bana farklı bilgi ve becerileri kazandıran Kalp ve Damar Cerrahisi kliniğinden değerleri hocalarım Prof.Dr.K.Turan BERKİ'ye, Doç.Dr.Muhip KANKO'ya, Yrd.Doç.Dr. Şadan YAVUZ'a ; Göğüs Hastalıkları kliniğinden değerli hocalarım Prof.Dr.Fusun Yıldız'a, Prof.Dr.Ahmet ILGAZLI'ya, Doç.Dr.Haşım BOYACI'ya, Doç.Dr. İlknur BAŞYİĞİT'e, Genel Cerrahi kliniğinden değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer UTKAN'a , Prof. Dr.Zafer Cantürk'e , Anestezi Bölümünden Prof. Dr. Kamil TOKER'e, Prof. Dr.Mine SOLAK'a, Yrd. Doç.Dr. Tülay HOŞTEN'e; ayrıca bilgi ve deneyimlerine her ihtiyaç duyduğumda katkılarını esirgemeyen Radyoloji bölümünden değerli hocalarım Prof. Dr. Ercüment ÇİFTÇİ'ye, Doç.Dr. Tahsin ARISOY'a, tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Patoloji bölümünden değerli hocam Prof. Dr.Kürşat YILDIZ'a, Halk Sağlığı AD'dan Doç.Dr.Çiğdem ÇAĞLAYAN'a, Öğr. Gör. Veteriner Hekim **Cüneyt Özer'e, Hacettepe Üniversitesi** Farmasötik Teknoloji AD.'dan Doç.Dr. Betül Arıca Yeğin ve Yrd.Doç.Dr. Hakan EROĞLU'na ;

Göğüs Cerrahisi kliniğinde birlikte çalıştığım, değerli asistan arkadaşlarım Dr. Korkmaz BURÇ'a, Dr. Selin ÇORAK'a, Dr. Seymur Salih MEHMETOĞLU'na, Dr. Serkan ÖZBAY'a, Dr. Fatih SEZER'e ; diğer kliniklerdeki tüm asistan arkadaşlarıma, servisimizin değerli hemşirelerine ve çalışan tüm personeline,

Asistanlık eğitimim ve tezimin hazırlanışı süresince göstermiş olduğu anlayış, sağladığı sevgi ve huzur dolu ortam için çok sevdiğim eşim Sultan'a, canım kızım Duru'ya ve yaşamımda önemli yeri olan annem başta olmak üzere tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ekim, 2011

Dr. Aykut ELİÇORA

İÇİNDEKİLER

1-KISALTMALAR DİZİNİ.....	1
2-ŞEKİLLER DİZİNİ.....	2
3-RESİMLER DİZİNİ.....	3
4-GRAFİKLER DİZİNİ.....	4
5-TABLolar DİZİNİ.....	5
6- GİRİŞ VE AMAÇ.....	6
7- GENEL BİLGİLER.....	8
7.1.İNSAN TRAKEASININ ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ.....	8
7.2. RAT TRAKEASININ ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ.....	9
7.3. TRAKEAL STENOZ VE CERRAHİ TEDAVİ.....	10
7.4. KOMPLİKASYONLAR.....	14
7.5. TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR BETA.....	15
7.6. KİTOSAN.....	16
7.7. NORMAL YARA İYİLEŞMESİ.....	18
8- GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
9-BULGULAR.....	27
9.1. MİKROSKOBİK BULGULAR.....	27
10-TARTIŞMA.....	46
11-ÖZET.....	50
12-ABSTRACT.....	51
13- KAYNAKLAR.....	52

1. KISALTMALAR DİZİNİ

- DNA** : Deoksi Ribonükleik Asit
EGF : Epidermal Growth Factor
ECM : Extracellular Matrix
FGF : Fibroblast Growth Factor
IL : İnterlökin
IF : İnterferon
RNA : Ribonükleik Asit
MMP : Matriks Metalloprotein
NGF : Nevre growth factor
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
TGF : Transforming Growth Factor
TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF : Tümör Nekroz Faktör
VEGF : Vascular Endothelial Growth Facto
PAI : Plasminogen Activator İnhibitor

2. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kitin (a) ve Kitosan(b) yapısı.....17



3. RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Cerrahiye hazırlanan ratın supin pozisyonuna yatırılması.....	20
Resim 2: Kaslar lateralize edildikten sonra trakeanın görünümü.....	21
Resim 3: Trakeal kesinin görünümü.....	21
Resim 4: Trakeal insizyonun sütür görüntüsü.....	22
Resim 5: TGF- β 3/kitosan kombinasyonunu içeren film tabakanın yerleştirilme görüntüsü...23	
Resim 6: Trakeal insizyonun üzerine yerleştirilmiş preparatın görünümü.....	23
Resim 7: İnsizyon bölgesinde palpe edilen kitlesel lezyonun görünümü.....	27
Resim 8: Kontrol grubundaki rat trakeası ve özefagusun görünümü (HE x20).....	29
Resim9: Kontrol grubundaki rat trakeasının insizyon bölgesindeki epitelizasyonun görünümü (HE x200).....	30
Resim 10: Trakea üzerinde oluşan absenin görünümü.....	43
Resim 11: Abse ve trakeanın kesitsel görünümü.....	44
Resim 12: Abse ve trakeanın mikroskopik incelemedeki görünümü (HE x40).....	44

4. GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1 : TGF- β 3/ Kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) epitel rejenerasyonu.....	28
Grafik 2 : Kitosan (B grubu) grubundaki epitel rejenerasyonu.....	28
Grafik 3 : Kontrol (A grubu) grubundaki epitel rejenerasyonu.....	29
Grafik 4 : TGF- β 3/Kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) inflamasyon.....	31
Grafik 5 : Kitosan (B grubu) grubundaki inflamasyon.....	32
Grafik 6 : Kontrol (A grubu) grubundaki inflamasyon.....	32
Grafik 7 : TTGF- β 3/ Kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) anjiyogenez.....	34
Grafik 8 : Kitosan (B grubu) grubundaki anjiyogenez.....	35
Grafik 9 : Kontrol (A grubu) grubundaki anjiyogenez.....	35
Grafik 10 : TGF- β 3/ Kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) fibroblast.....	37
Grafik 11 : Kitosan (B grubu) grubundaki fibroblast.....	38
Grafik 12 : Kontrol (A grubu) grubundaki fibroblast.....	38
Grafik 13 : TGF- β 3/ Kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) kollajen.....	40
Grafik 14 : Kitosan (B grubu) grubundaki kollajen.....	41
Grafik 15 : Kontrol (A grubu) grubundaki kollajen.....	41

5. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1 : Trakeal stenoz nedenleri.....	11-12
Tablo 2 : Çalışma grupları ve yapılan işlemler.....	25
Tablo 3 : Epitel rejenerasyonunun grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.....	30
Tablo 4 : Epitel rejenerasyonu sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).....	31
Tablo 5 : İnflamasyonun grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.....	33
Tablo 6 : İnflamasyon sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları.....	34
Tablo 7 : Angiyonezin grup içi ve gruplar arası dağılımı.....	36
Tablo 8 : İnflamasyon sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).....	37
Tablo 9 : Fibroblastların grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.....	39
Tablo 10 : Fibroblast sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).....	40
Tablo 11 : Kollajenin grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.....	42
Tablo 12 : Kollajen sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).....	42
Tablo 13: Komplikasyonun grup içi ve gruplar arındaki dağılımı.....	45
Tablo 14: Kollajen sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).....	45

6. GİRİŞ VE AMAÇ

Trakeal tümörlerin nadir görülmesi, rekonstrüksiyonundaki zorluklar, trakeanın kendine özgü anatomik yapısı gibi sebeplerle trakeal rezeksiyon ve rekonstrüksiyon gelişimi diğer cerrahi prosedürlere göre oldukça yavaş bir seyir izlemiştir. Modern yoğun bakım yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla görülmeye başlanan postentübasyon benign lezyonlar sayesinde çalışmalar hız kazanmıştır. Trakeal stenozların morbiditesi ve kısa sürede gelişirse mortalitesi oldukça yüksektir. Tedavisi toraks cerrahisinin en zor alanlarından biridir ve başarısızlık oranı oldukça yüksektir. Bunun da en büyük nedeni tekrar stenoz gelişmesidir (1-3). Trakeal stenoz operasyona bağlı değil entübasyona bağlı olarak gelişmektedir.

Trakeal stenoz gelişmesinde ilk basamak mukozal hasarlanmadır. Mukozaya mekanik hasar, kompresyon ve stenotik segmentin nekrozu stenoz gelişiminde kabul edilen temel mekanizmadır. Bunlarla birlikte lokal enfeksiyon, entübasyon süresince düşük kan basıncı, steroid kullanımı, entübasyonda kullanılan materyal ve kimyasal ajanlara hastanın duyarlılığı gibi faktörlerde stenoz gelişimini etkilemektedir (4-6). Bununla birlikte iyileşme sürecinde skar oluşumunu önleyici yöntemlerin kullanılması tedavi başarısını arttırmaktadır.

Trakeanın benign stenozlarında veya primer ve sekonder malign tümörlerinde standardize edilmiş bir tedavi metodu bulunmamaktadır. Tedavide bronkoskopik dilatasyon, stent yerleştirilmesi, laser, cerrahi rezeksiyon ve rekonstrüksiyondan oluşan modaliteler geliştirilmiştir. Değişik tedavi metodları kullanılmasına rağmen kesin tedavinin sadece cerrahi rezeksiyon ve uç uca anastomoz olduğu belirtilmektedir.

Trakea cerrahisinde önemli gelişmeler olmasına karşın halen ciddi problemler bulunmaktadır. Anastomozun sütür hattında gerilim yüksekse ayrılma ve stenoz daha sık görülür. Sütür hattındaki gerilim düşük olsa bile trakea çevresinde, kartilajlar arasındaki mesafeyi arttıran ve stenoza yol açabilen fibröz doku reaksiyonu oluşabilir. Anastomozda sütür tipi ve tekniği iyileşme sürecini etkilemektedir. Epitelizasyon yetersiz ise skar dokusu gelişecektir. Skar dokusu histolojik olarak artmış mezenşimal yoğunluk, zengin vaskülarite ve kalınlaşmış epitelyal doku ile normal dokudan farklılık gösterir.

Cerrahi tedavinin etkinliğini arttırmak için çeşitli ilave yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla cerrahiye ek olarak sıklıkla antibiyotik ve kortikosteroidler kullanılmıştır. Bunlara ek olarak yavaş salımlı 5-florourasil triamsinolon bileşiği, mitomisin-C, hiperbarik oksijen, karnitin, halofuginon tedavide yardımcı olarak uygulanmıştır. Yara iyileşmesini düzenleyici

çeşitli ajanlar için arayışlar devam etmektedir. Son yıllarda TGF- β 1, β 2 ve β 3'ün yara iyileşmesi üzerine olan etkisini araştırmak için bir çok çalışma yapılmaktadır. TGF- β 1, β 2 ve β 3 yara iyileşmesinin her aşamasında etkili oldukları bilinen sitokinlerdir (7). Birçok hücrenin büyümesini, farklılaşmasını, ekstrasellüler matriksin şekillenmesini ve immunsupresyonu düzenleyici etkiye sahiptirler (8,9,10). TGF- β 2 fibroblast ve makrofajların kollajen üretimini aktive eder. Ayrıca kollajen üretimini inhibe eden metalloproteinazların inhibitör düzeylerini de artırır. TGF- β 1 ve TGF- β 2 kollajen sentezini artırmaktadır. TGF- β 3'ün ise hayvan çalışmalarında skar dokusunu azaltabileceği öne sürülmüştür (11).

Çalışmamızda ratlarda deneysel olarak trakea cerrahisi yapıldı. Trakea insizyonun yapıldığı bölgeye lokal olarak bir grupta kitosan içerisinde jel formuna getirilmiş ve yavaş salınım yapan TGF- β 3 preparatı, bir gruba jel formundaki Kitosan preparatı yerleştirilerek epitelizasyon, fibroblast, inflamasyon, angiogenez ve kollajen düzeyleri ilaç kullanılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Bu çalışmada TGF- β 3'ün trakea cerrahisi sonrasında trakea stenozunu önlemedeki rolünün belirlenmesi amaçlandı.

7. GENEL BİLGİLER

7.1. İNSAN TRAKEASININ ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ

Erişkin insan trakeası krikoid kıkırdığın hizasından başlar ve ana bronşların ayrımına kadar uzanır. Karina trakeanın distal ucunu işaret eden önemli bir mirengi noktasıdır. Hastanın boyuna göre değişiklik göstermekle birlikte erişkin insan trakeası 10-13 cm uzunluğunda (ortalama 11 cm) ve 17-24 mm çapındadır. Servikal trakea 6-7 cm, torasik trakea 5-6 cm'dir. Trakea ön ve lateral kısımlarını oluşturan "C" şeklindeki kıkırdak parçalar arka kısımda membranöz yapıyla birleşerek kıkırdak halkaları oluşturmaktadır. Trakeanın her santimetresinde yaklaşık 2 kıkırdak halka bulunmaktadır. Böylelikle tek tam halka krikoid olmak üzere yaklaşık 18-22 kıkırdak halka bulunur (12,13). Erişkin erkek trakeasının iç lateral çapı 2.3 cm anteroposterior çapı 1.8 cm'dir. Ölçümler bireylere değişim göstermekle birlikte bayanlarda daha küçük çaptadır. Trakea yaklaşık T4-T5 torasik vertebra hizasında sağ ve sol ana bronşlara ayrılmaktadır. Sağ ana bronş daha düz bir hattı takip ederek trakeadan ayrılırken, sol ana bronş daha keskin bir açı ile ayrılır. Sağ ana bronşun trakeadan sağ üst lob ayrımına kadar olan uzunluğu ortalama 1,2 cm'dir. Sol ana bronşun trakeadan sol üst lob bronşu ayrımına kadar olan uzaklığı ise ortalama 4-6 cm'dir. Her iki bronş da doğrudan bronşial arterlerden beslenmektedir.

Trakea birçok yapı ile belirgin komşuluk göstermektedir. Servikal bölgede önde tiroid dokusu, arkada özefagus yanlarda tiroid lobları, karotis arter ve rekürren larengeal sinirler ile komşudur. Torasik bölgede önde timus, sol brakiosefalik ven ve arkus aorta ile komşuluk gösterir. Arkada özefagus ile komşuluğu devam etmektedir.

Trakeal kan dolaşımı başarılı bir rezeksiyon ve rekonstrüksiyon için hayati önem taşır. Trakeanın arterleri segmenter dağılım gösterir. Servikal trakea, inferior tiroid arterden, torasik trakea ise bronşiyal arterin dalları, subklavyen arter, üst interkostal arter, internal torasik ve innominat arterlerden beslenir. Lateral pediküller arasından trakeaya ulaşırlar ve özefagusun posteriorunda, ince longitudinal anastomoz meydana getirirler. İnterkartilajenöz arterler transvers olarak ilerler ve submukozal kapiller içinde dallanma gösterirler. Lateral kesimdeki bu vasküler oluşumların trakeanın çevresel diseksiyonu esnasında aşırı şekilde tahrip olmaları, kan akımının kesintiye uğraması sonucu stenoz ve anastomozda ayrılma gibi komplikasyonlara yol açabilir. Trakea lümeninde bası nekrozuna en duyarlı bölge, trakeal halkayı örten mukozadır. Trakeanın innervasyonu rekürren larengeal sinirlerdir. Rekürren larengeal sinirler trakeoözefageal olukta yer alır ve tiroid kıkırdığın alt boynuzunun medialinden geçerler.

Trakeanın lenf drenajı direkt paratrakeal ve subkarinal lenf nodlarında olmaktadır (13). Genel olarak trakeanın lenf akımının yönü sentripedal ve ventrodorsaldır. Trakea lenfatik drenajı özefagus , tiroid ve akciğerlerin lenfatik drenajı ile yakın ilişki göstermektedir.

Trakea histolojik olarak mukoza, submukoza, muskularis ve adventisya tabakalarından oluşmaktadır (14). Mukoza yalancı çok katlı silyalı silindirik epitelden oluşmaktadır. Epitelde submukozada bulunan tubuloasiner bezlerin duktusları ve goblet hücreleri de bulunur. Submukoza ve muskularis tabakası çok sayıda elastik fibriller, lenfatikler, kan damarları ve sinir içermektedir. Mukozanın tamiri, subepitelyal marjinal hücrelerin taşınmasıyla meydana gelir ve onarım hızı yaklaşık 24 saatte 1 mm'dir. Trakeal kırıklar yaralanmaları sonrasında yenilenmezler; ancak kalsifikasyon ya da fibrozis ile iyileşme sağlanır.

7.2. RAT TRAKEASININ ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ

Rat trakeası insan trakeasına oldukça benzer özellikler gösterir. Rat trakeasının uzunluğu yaklaşık 33 mm'dir. Krikoid kırıkdağın hemen altından başlar ve toraksta üst mediastinuma uzanır. Trakeanın "C" şeklinde 3 mm genişliğinde 1,4-2 mm kalınlığında 24 kadar kırık halkası vardır. Kırık halkaların boş kalan arka kısmında transvers durumda düz kas lifleri uzanmaktadır. Erişkin ve yaşlı sıçanlarda kırık doku kalsifiye olduğundan esneklik azalmaktadır. Transvers kesitlerde lümen çapı 3 mm, duvar kalınlığı 1 mm'dir (15).

Boyun parçasında önde tiroid bezi, hyoid altı kasları ve fasya kolli superfisyalis ile komşudur. Yanlarda ise tiroid bezinin yan lobları ve a.karotis kommunis ile komşuluğu vardır. Arkada özefagus ile komşudur ve özefagus ile trakea arasındaki oluktan n.laringeus inferior geçer. Trakeanın torakal parçası arka mediastendedir. Bu parçası önde timus artıkları, trunkus brakiosefalikus, a.karotis kommunis sinistranın başlangıç kısmı ve vena brakiosefalika sinistra ile komşudur. Bifurkasyon yerinde ise arkus aortanın bir kısmı trakeanın ön yüzü ile temastadır (15).

Histolojik olarak başlıca tunika mukoza, tunika kartilaris, tunika adventisya tabakalarından oluşmaktadır. Epitel tabakası çeşitli tipte hücrelerden meydana gelir. Bunlardan yalnızca 3 tipi ışık mikroskobu ile görülebilir. Bunlardan ilki silyalı hücrelerdir ve epitel hücrelerinin %35'i bu gruptadır. Goblet hücreleri kadehe benzer, mukus salgılayan hücrelerdir (16). Tüm epitel hücrelerinin % 9.3'ü bu gruptadır. Bazal hücreler bazal lamina üzerinde oturan, lümene ulaşamayan hücrelerdir. Küçük ve piramidal hücrelerdir. Diğer hücreler için prekürsör özellik taşıdıklarından "Stem-cell hücreler" olarak da bilinirler. Tüm epitel hücrelerinin % 24.2'si bu gruptadır. Bu hücreler dışında, elektron mikroskop ile

saptanabilen ve trakea epitel hücrelerinin % 30.9'unu oluşturan hücreler vardır. Bunlar: fırça hücreler, arjirofilik hücreler, silindirik hücrelerdir.

Trakeanın lamina propriası incedir ve elastik fibriller içerir. Elastik fibrillerin çoğu longitudinal olarak uzanır. Lamina propriada küçük gruplar halinde lenfositler, endositatik aktiviteyi sağlayan mast hücreleri, lenf follikülleri ve çok seyrek olarak bez yapıları gözlenir.

Kıkırdak tabakası hyalin kıkırdak yapısındadır (15). Oldukça dayanıklı ve diffüzyon ile beslenen bir yapısı vardır. Sıçan yaşlandıkça bu kıkırdak kalsifikasyona uğrar. Tunika adventisya ise trakeayı çevre dokulara bağlayan gevşek bağ dokusu özelliği taşır

7.3. TRAKEAL STENOZ VE CERRAHİ TEDAVİ

Krikoid kıkırdak alt kenarından karınaya kadar olan mesafedeki stenozlar trakeal stenoz olarak tanımlanmaktadır (17). Trakeal stenozu birçok neden yol açabilmektedir. Trakeal stenozların en sık nedenleri, trakeal mukoza hasarı yapan trakeotomi veya endotrakeal tüp uygulaması sonrasında oluşan lezyonlardır. Bunun yanında konjenital, neoplazmlar, infeksiyöz ve kollajen vasküler hastalıklarda trakeal stenoz yapan nedenlerin arasında yer almaktadır (18-22). Trakeal stenoz nedenleri tablo 1'de gösterilmiştir (18).

Trakeal stenoz sıklıkla trakeal damarların tıkanması ya da trombozuna, mukozal travmaya bağlı olarak submukozal bası nekrozuna, sonuçta da kıkırdağın avasküler nekrozu sonucunda meydana gelmektedir. Trakeadaki silyar hareketin lokal olarak hasarına bağlı olarak pürülan sekresyonların birikmesi sonucu lokal ve sistemik enfeksiyon gelişmesi kolaylaşır (18-22) . Histolojik olarak inflamatuvar değişiklikler 24-48 saat içinde başlar. İnflamasyon bir hafta içinde süperfisyal trakeit ve mukozal ülserasyona dönüşür. Mukozal ülserasyon 1-3 hafta içinde kıkırdağa ulaşır. Eğer inflamatuvar süreç devam ederse kıkırdak açığa çıkar ve sonuçta kıkırdak destrüksiyonu oluşur (23). İyileşme inflamatuvar sürecin önüne geçer ve trakea darlığına neden olan granülasyon ve fibrozise neden olur

Tablo 1: Trakeal stenoz nedenleri.

KONJENİTAL NEDENLER	<ul style="list-style-type: none">• Agenezi ya da aplazi• Atrezi• Segmental kartilaj hipoplazisi• Konjenital subglottik stenoz• Trakeal divertikül• Trakeal bronşların bifürkasyon anomaliler• Trakeomalazi• Trakeaözefagial malformasyonlar	
	<ul style="list-style-type: none">• Bakteriyel; Difteri• Luetik• Fungal; Histoplazmozis• Granulomatöz: Tüberküloz,• Lepra, Sarkoidoz, Skleroma	
İNFLAMATUAR NEDENLER	İntrensek	Ekstrensek
	<ul style="list-style-type: none">• Künt boyun yaralanmaları• Künt göğüs yaralanmaları• Penetre boyun yaralanmaları• Postoperatif	<ul style="list-style-type: none">• Postentübasyon• Posttrakeostomi• Kaf yaralanmaları• Kimyasal yaralanmalar• Fiziki yaralanmalar
TRAVMATİK NEDENLER	İntrensek	Ekstrensek
	<ul style="list-style-type: none">• Papillomlar• Fibromlar• Kondromlar• Glandüler• Nöral	<ul style="list-style-type: none">• Tiroide ait olanlar• Timusa ait olanlar
BENİGN NEOPLAZMALAR		

	İntrensek	Ekstresek
MALİGN NEOPLAZMLAR	<ul style="list-style-type: none"> • Skuamoz hücre karsinomu • Adenoid kistik karsinom • Mukoepidermoid karsinom • Kondrosarkoma • Lenfoma • Lenfosarkom 	<ul style="list-style-type: none"> • İnvaziv tiroid adenokarsinomu
KOLLAJEN VASKULER HASTALIKLARI	<ul style="list-style-type: none"> • Tekrarlayan polikondrit • Wegener Granülomatosisi 	
MEKANİK NEDENLER	<ul style="list-style-type: none"> • Obesite • Pikwick Sendromu • Mikrognati – Pierre Robin Sendromu • Sekresyonel staz <ul style="list-style-type: none"> ○ Ciddi merkezi sinir sistem yaralanmaları ○ Trakeitis sikka ○ Bronşiolit ○ Bronkolit ○ Bronşiektazi ○ İmmobil silya sendromu 	
İDYOPATİK NEDENLER	<ul style="list-style-type: none"> • Trakeopati osteoplastika • Tekrarlayan polikondrit • Amiloidoz • Eosinofilik granülomatozu 	

Trakeal stenozlarda lümen açıklığına göre Coton (24) sınıflama yapmıştır. Coton sınıflaması ile klinik ve cerrahi tedavi seçeneği belirlenirken bu sınıflamada;

Grade 1: trakea lümeninin %70'inden daha azı tıkalıdır.

Grade 2: trakea lümeninin %70-90'ı tıkalıdır.

Grade 3: trakea lümeninin %90'ından daha fazlası tıkalıdır, ancak lümen vardır.

Grade 4: trakea lümeninin tamamı tıkalıdır, lümen yoktur

Genel olarak üst hava yollarında benign hastalık saptanan ve de özellikle semptomatik olan hastalar tedavi gerektirirler. Ancak bu tedaviler hastaya özel olarak planlanmalıdır. Wegener granülomatozu gibi diffüz olanlar veya enfeksiyöz karakterde olanlar medikal olarak tedavi edilmektedir.

Trakeal stenoz tedavisini iki ana başlık altında toplayabiliriz.

- 1) **Endoskopik yöntemler:** Daha çok hafif olgularda uygulanır. Bu yöntemler içerisinde CO2 lazer, endoskopik dilatasyon ve debrütman sayılabilir. Endoskopik girişimlerle birlikte veya tek başına birçok medikal ajan tedavide uygulanmıştır. Uygulanan ajanlar arasında antibiyotikler, kortikosteroidler, penisilamin ve N-asetil sistein, mitomisin-C, 5-florourasil, triamsinolon asetat kombinasyonu, karnitin ve halofuginon sayılabilir (3,25).
- 2) **Açık teknik rekonstruktif yöntemler:** Trakea cerrahisi 1881 yılında Gluck ve Zeller tarafından uc-uca anastomoz şeklindeki uygulama ile başlamış ve günümüze kadar çeşitli araştırmacılar tarafından stenotik kısım çıkarıldıktan sonra defekt onarımında fascia lata, deri, perikard, periost fascia ve fascia-kostal kartilaj kombinasyonu kullanılmıştır. Trakeal stenozlarda cerrahi metodlar 4 ana başlıkta toplanmaktadır. Bunlar ;
 1. Uç-uca anastomoz
 2. Oto/homo/hetero greftler ile anastomoz
 3. Organizmadan alınan canlı dokular ile anastomoz
 4. Protezler ile anastomozlardır.

Greft kullanılarak yapılan onarımlarda otogreftlerde beslenme sorunu, heterogreftlerde ise beslenme sorunu yanında immünoterapi desteğine rağmen rejeksiyon sonucu greft dejenerasyonu ile stenoz oluşumu büyük bir problem olarak görülmüştür. Rijit materyalden oluşan protezler ile de değişik çalışmalar yapılmış ve

bunlarda da sonuç; kollabe olma, anastomoz hattında nekroz ve açılma ile silier aktivite olmaması sonucu sekresyon birikimi gibi komplikasyonlar görülmüştür.

Trakeal stenoza bağlı rezeksiyondan sonra halen en ideal girişimin uç uca anastomoz olduğu kabul edilmektedir. Grillo ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda mobilize trakeada uc-uca anastomoz için defekt genişliğinin 6,5 cm olduğunu saptamışlardır ki, bu mesafe genellikle trakeanın yarısıdır. Uç uca anastomoz en iyi onarım/rekonstrüksiyon metodu olarak gözlenirken yinede başarısız olunabilecek durumları şöyle sıralayabiliriz.

1. Primer yada sekonder malign lezyonlar,
2. Birden fazla darlık bulunması halinde,
3. Servikal trakea rezeksiyonu gerektiğinde sternotomi ile mediastinal trakeanın serbestleştirilmesi gereksinimi.

Günümüzde kabul gören yöntem uç uca anastomoz olup mümkün olan her durumda uygulanmalıdır.

7.4.KOMPLİKASYONLAR

Trakea cerrahisi sonrasında komplikasyonlar nispeten az görülmekle birlikte hayatı tehdit edici özellikte olabilmektedir.

Anastomoz hattında granülasyon dokusu ve stenoz gelişimi en sık görülen komplikasyonlardır (3). Granülasyon dokusunun gelişimi nonabsorbabl sütür kullanıldığı dönemde oldukça sık görülürken absorbabl sütür kullanımının yaygınlaşması ile görülme sıklığı azalmıştır. Granülasyon dokusu bronkoskopiyle temizlenebildiği gibi dirençli vakalarda cerrahi gerekebilmektedir.

Gerginliği fazla olan anastomozlarda, trakea etrafında fazla diseksiyon yapılması durumunda ve stenozun inkomplet rezeke edildiği durumlarda stenoz riski artmaktadır. Rezeksiyon sonrası haftalar, aylar içerisinde ortaya çıkar. Rijit bronkoskopi ile yapılan dilatasyonlarda uzun süreli açıklık sağlanabilmektedir.

Dilatasyondan fayda görmeyen hastalarda ikinci planda T-tüp ya da trakeostomi düşünülür. Reanastomoza imkan veren yeterli trakea dokusu mevcutsa re-rezeksiyon yapılabilir.

Anastomoz ayrılması, trakeoinnominat fistül, trakeoözefagial fistül, larengeal ödem diğer görülebilen komplikasyonlar arasındadır.

7.5. TRANSFORMİNG GROWTH FAKTOR-BETA

Memelilerde TGF- β 'nin üç farklı isoformu saptanmıştır. TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 proteinleri benzer aminoasit içermelerine rağmen her biri farklı gen ve kromozomlardan meydana getirilir (26,27). TGF- β süperfamilyası epitelyal hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını, motilite, apoptoz ve tümörenezisini regüle eder (28). TGF- β ağırlıklı olarak T-hücreleri tarafından üretilen ekstrasellüler bir proteindir (29). Vücudun bütün hücreleri tarafından eksprese edilen bu sitokin parakrin ve otkrin olarak trombosit, makrofaj, nötrofil, kemik, plasenta, böbrekler, endometrium ve malign hücreler tarafından da üretilir (30-34). TGF- β trombositlerin alfa granüllerinde yüksek miktarda bulunur. Monositleri uyarak PDGF, FGF, IL-1 ve TNF- α 'nın salınmasına neden olur. Bunun yanında makrofajlar için kemotaktik, fibroblastlar kemotaksi ve proliferasyonunu uyarma özelliğine sahiptir. Genel olarak TGF- β ekstra sellüler matriks birikimine ve fibrozise neden olur. TGF- β fibroblast kemotaksisini ve bu hücrelerce kollajen ve fibronektin üretimini uyarırken, metalloproteinazlarca hücre dışı matriksin yıkımını inhibe eder. Bütün bu etkiler fibrojenez lehine olup TGF- β kronik iltihabı olaylarda fibrosiz gelişmesinden sorumlu tutulmaktadır (28,35). TGF- β hücrelerden yüksek moleküllü kompleks bir protein olarak salınır.

Bu proteinler; matür TGF- β dimer, LAP (Latency associated protein) ve LTBP (Latent TGF- β binding protein)'dir (36). TGF- β farklı hücreler üzerinde düzenleyici olarak görev alır. Hücre siklusunun ilerleyişi, migrasyonu, angiogenesis, hematopoezis, kemik şekillenmesi, hücrenin replikasyon ve differansiasyonunda görev alır (37,38,39). Bu süreçler yara iyileşmesinin önemli safhalarıdır. TGF- β ekstrasellüler matriks üretimini kontrol eder. Hücre replikasyonunda hem inhibitör hem de stimülatör olarak katkı sağlar (26). Tenaskin, TIMP-1, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), trombospondin, proteoglikan, fibronektin ve kollajen sentezini stimüle eder. ECM şekillenmesinde bir mediatör olarak apoptoz ve morfogenezini kontrol eder. TGF- β aynı zamanda nöroprotektif bir proteindir (26). İn vivo astrosit kültüründe NGF (Nerve growth factor) sentezini stimüle eder (40). İnsanlarda hemen hemen tüm hücrelerde TGF- β reseptörü bulunur (41). Son olarak dokuz membran protein reseptörü tespit edilmiştir (26). Farklı hücre yüzey reseptörleri affiniteye göre değişik TGF- β 'ları bağlar. TGF- β 1 reseptörleri 53 kDa ağırlıklı molekülleri, TGF- β 2 reseptörleri ise 70 kDa ağırlıklı molekülleri bağlayacak şekilde düzenlenmişlerdir. Hücrelerin TGF- β 'ya yanıtı bu reseptörlerin miktarı ile orantılıdır (42). TGF- β yüzey reseptör protein sinyallerini bir intrasellüler protein olarak geçiren Smad proteinlerdir (26,43). Hipertrofik skar ve keloidde

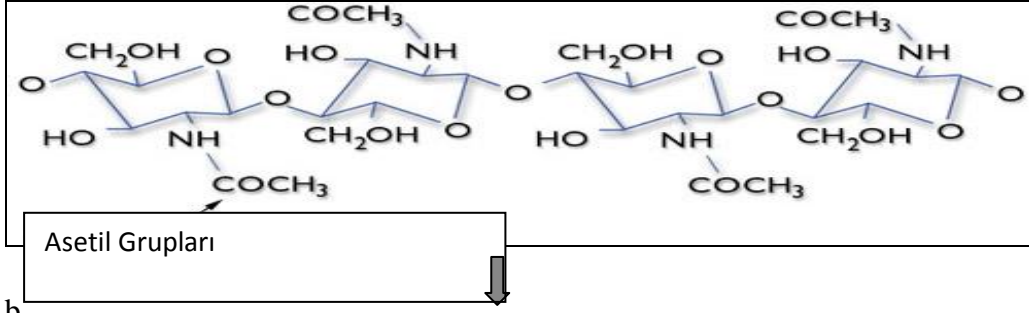
ekstrasellüler matriksin aşırı birikimi görülür. Hipertrofik skarda akantoziste artış ile anormal keratinosit diferansiyasyonu ve proliferasyonu olduğu son zamanlarda keşfedilmiştir (44). TGF- β farklı moleküler mekanizmalarla hipertrofik skar ve keloid patogeneğinde önemli bir rol oynar. TGF- β üç isoformu yara iyileşmesinde değişik biyolojik aktiviteye sahiptir. Keloid fibroblast kültürlerinde TGF- β 1 ve TGF- β 2 protein konsantrasyonlarının normal dermal fibroblast kültürleri ile kıyaslandığında yüksek olduğu görülür. Bu TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin fibrozise neden olan sitokinler olduklarını desteklemektedir (45). Bunun yanında TGF- β 1'in keloid fibroblastlarda çok yüksek bir kollajen sentezi sağladığı ortaya konmuştur. TGF- β 1 ile keloid fibroblastları tarafından yapılan kollajen sentez artışına prokollajen tip-1 mRNA düzeylerindeki artış da eşlik eder (26,46).

TGF- β 3'ün ise yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Cox ve arkadaşları TGF- β 3'ün yanıklarda ve insizyonel yaralarda reepitelizasyonu yaşlı ratlarda hızlandırdığını göstermişlerdir. Wut ve arkadaşları tavşanların kulaklarında yara iyileşmesini skar dokusu oluşturmadan hızlandırdığını bulmuşlardır. Coerper ve arkadaşları doz yanıt ilişkili olarak ratlarda gastrik ülserle etkili olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar TGF- β 3'ün TGF- β 1 ve β 2'ye karşı avantajlı olmasını diğerlerine göre yapısal farklılık gösteren N-terminal kısımdan kaynaklandığını söylemektedirler. TGF- β 3'ün skar oluşumu üzerine olan etkisi halen şüphelidir. Wut ve arkadaşları tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada TGF- β 3 ile kontrol grubu arasında hipertrofik indeks açısından fark gözlemlenmemişlerdir. Ancak, TGF- β 3 ile tedavi edilen yaraları TGF- β 2 ile tedavi edilen yaralar ile karşılaştırdıklarından hipertrofik indeksde önemli derecede gerileme olduğunu bulmuşlardır.

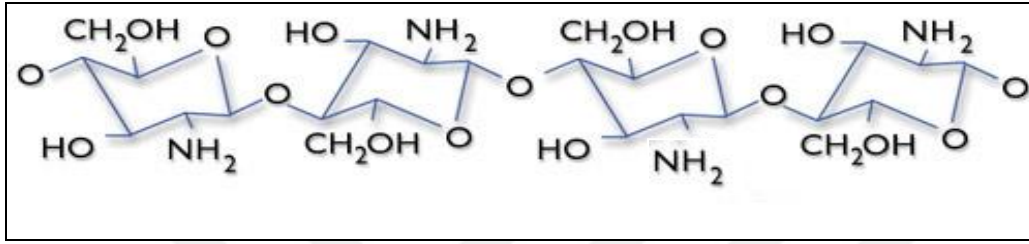
7.6. KİTOSAN

Farmasötik formülasyonlarda selülozdan sonra en sık kullanılan polisakkarit yapıda bir polimerdir. Crustacea kabuklarının doğal yapısında bulunan kitinin deasetilasyonu sonucunda elde edilen kitosan β (1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz yapısına sahiptir. Kitin ve kitosanın yapısal formülü Şekil 1'de gösterilmiştir.

a.



b.



Şekil 1: Kitin (a) ve Kitosan(b) yapısı

Kitosan yapısında bulunan amin gruplarının organik asitler ile muamele edilmesi sonucunda bu amin yapılarına proton kazandırılır. Bu sayede oluşan tuzları suda çözünebilir özelliğe sahip olur. Kitosan genellikle asetik asit ve laktik asit kullanılarak hazırlanan zayıf asidik sulu çözeltilerde çözünmektedir. Kitosanın çözelti-jel geçişinin pH 6.5-7.0 arasında olması, oral yolla ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmasını avantajlı bir hale getirmektedir (47).

Yapısında bulunan primer amino gruplarından kaynaklanan şelat yapıcı özelliğine bağlı olarak kitosan, endüstriyel atık suların içinde bulunan civa ve benzeri diğer iyonların arıtılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (48). Antifungal özelliğinden ve bitkilerdeki metabolik olayları artırmasından dolayı, tarım sektöründe germisid ve verim artırıcı olarak kullanımı bulunmaktadır (49).

Kitosanın biyomedikal alanda kullanımı, biyoparçalanabilir olması, toksik olmaması, vücut ile uyumlu bir yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır (49,50). Bu özelliklerinin yanı sıra hemostatik özelliğinin olması, yara iyileşmesini hızlandırıcı özelliği ve antimikrobiyal, antiviral ve hipokolesterolemik aktiviteye sahip olması da bu amaçlarla kullanımına olanak sağlamaktadır (49).

Farmasötik alanda kullanımı oldukça fazla olan kitosan, mikroküre, nanopartikül, mikrokapsül, film ve tablet formülasyonları gibi çeşitli dozaj şekillerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (51-58).

7.7. NORMAL YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon ve remodeling safhalarını içerir. İnflamatuar fazda hemostaz sağlanır ve bunu inflamatuvar maddenin bölgeye göçü izler. Özellikle subendotelden olmak üzere hasarlı dokudan tromboplastik doku ürünleri dışarı salınır. Trombositler kümelenerek ilk hemostatik tıkaçı oluşturur. İntrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma sistemleri protrombinin trombine aktivasyonunu sağlar. Aktive trombin, fibrinojeni daha sonra polimerize olarak kalıcı pıhtıyı oluşturacak olan fibrine çevirir (59,60,61). Hemostazı takiben, damarlar koagülasyon ve kompleman sisteminin ürünlerinin etkisiyle dilate olur ve permabiliteleri artar. Bu, inflamatuvar hücrelerin yaraya geçişini arttırır. Yara bölgesine ilk gelen inflamatuvar hücreler arasında nötrofiller çoğunluktadır. 2-3 gün içinde inflamatuvar hücre sayısı monositlerin hakimiyetine geçer. Kanda dolaşan monositler yara bölgesine göç eder ve makrofajlara dönüşür. Makrofajlar doku ve bakteri yıkım ürünlerini fagosite etmekle kalmaz aynı zamanda büyüme faktörlerini salarlar. Bu büyüme faktörleri endotel hücreleri, fibroblastları ve keratinositleri aktive ederek onarım sürecindeki görevlerini yerine getirmelerini sağlar.

Proliferatif fazda, yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra, geçici ekstrasellüler matriks granülasyon dokusuyla yer değiştirmeye başlar. Bu değişim aynı zamanda hücresel seviyede dermisin kalıcı elemanlarının bölgede oluşmasını sağlar. Bunlar, fibroblastlar ve fibroblastlar tarafından oluşturulan kollajen ve kan damarlarıdır (62). Fibroblastlar yara iyileşmesinde görev alan en önemli mezankimal hücrelerdir (63). Hem “üretim” hem de “mekanik” görevleri vardır. Fibroblastlar geçici matriksin yerini alacak olan kollajen bazlı matriksin üretiminden sorumludur. Mekanik görevleri ise kontraktıl özellikleri sayesinde yara kontraksiyonunu sağlamalarıdır. Fibroblast migrasyonu, PDGF, NGF, TGF- β , CTGF ve Cyr-61 tarafından stimüle edilir (64). Aynı zamanda geçici matriksin içeriğinde yer alan fibronektin de fibroblastları yara bölgesine çeker (65). Fibroblastların yara bölgesine göçü düzensiz bir şekilde değildir. Fibroblastlar yara bölgesine fibrillere paralel olarak hareket ederler. Fibroblastlar bu göçleri sırasında, hücresel yıkım ürünleri ve matriks fibrilleriyle karşılaşır. Bu engelleri çeşitli matriks metalloproteinazları (MMP) yardımıyla aşarlar.

Şimdiye kadar 24 farklı MMP tanımlanmıştır (66). Bunlardan MMP-1, MMP-2 ve MMP-3, TGF- β tarafından, MMP-19 ise TNF- α tarafından stimüle edilirler. Yapılan çalışmalarda, hipertrofik skar ve keloidlerde MMP-2, MMP-3, MMP-13 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (67-69). Fibroblastlar, kalıcı ekstraselüler matriks elemanlarını (kollajen, glikozaminoglikan (GAG), proteoglikan) ve büyüme faktörlerini üretmekten sorumludurlar. Kollajen üretimi, doku hasarının yaklaşık 3-5. gününde başlar ve PDGF, TGF- β , EGF, IGF1, FGF-2, CYGF, Cyr61, S1P tarafından stimüle edilirler (63). Proliferatif fazda gerçekleşen diğer bir olayda anjiogenezdır (61). Doku hasarının 2. gününde endotelial hücreler, geçici ECM üzerinde, fibroblastlara benzer şekilde göç ederler. Endotelial hücrelerin hareketi, VEGF, FGF, anjiopietin ve TGF- β tarafından stimüle edilir (60). MMP'ler anjiogeneizde önemli görev alırlar (66). MMP'lerin görevi, bazal membranın yıkımı ve ECM'nin endotelial hücrelerin geçişine izin verecek şekilde yıkımıdır. MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT-MMP ve MMP-19 anjiogeneizde rol alan en önemli matriks metalloproteinazlardır (60).

Matürasyon fazı, yara iyileşmesinin en uzun süren aşamasıdır. Yaranın granülasyon dokusuyla dolup, keratinosit migrasyonu ile reepitelizasyon sağlanmasını takiben başlar. Yara kontraksiyonu, yaralanmayı takiben 4-5. günde başlar (59,60,61). Yara kontraksiyonu, myofibroblastlar sayesinde sağlanır. Matürasyon fazında yara kalınlığı azalırken, yaranın tensil (gerilmeye dayanım) kuvveti ters orantılı olarak artar (60). Bu ECM'nin remodelizasyonu ile ilişkilidir. Net kollajen üretimi yaralanmadan sonra ortalama 21. güne kadar sürekli bir artış gösterir. Bu aşamadan sonra kollajen sentezinde bir azalma gözlenir (59). ECM'deki artmış kollajen miktarının fibroblastlardaki kollajen sentezini azalttığı düşünülmektedir (70). Bunu yanında interferon- γ ve TNF- α fibroblastların kollajen sentezini azaltmada etkilidir (71). Yara iyileşmesinin 21. gününde maksimum kollajen miktarına ulaşılsa da, yaranın tensil kuvveti normalin ancak % 20'si kadardır. 6. haftada yaranın tensil kuvveti, olması gerekenin % 80'ine ulaşır. 21. günle 6. hafta arasında geçen ve yara kuvvetinin arttığı bu dönemde gerçekleşen asıl olay, kollajen yıkımı ve yeniden düzenlenmesidir (59,60). Matürasyon fazında ECM niteliğinde belirgin değişiklikler meydana gelir. Zamanla, Tip I kollajen miktarı artarken, Tip III kollajen, proteoglikan ve su miktarı azalır. Yara iyileşmesinin erken dönemlerine kollajen fibrillerinin düzensiz şekilde dizilmiş olmaları yüksek kollajen miktarına rağmen, yara kuvvetinde zayıflığa neden olmaktadır.

8. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu'nun 22.02.2011 tarih ve 2/1-2011 nolu onayı alınarak Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama biriminde gerçekleştirildi. Çalışmada 250-300 gram ağırlıktaki (ortalama ağırlık 280 gram), erkek cins 30 adet "Wistar Albino" tipi rat kullanıldı. Isısı 20-22 santigrat derecede sabit tutulan, günde iki defa temizliği yapılan, 12 saat karanlık / aydınlık döngüsüne uygun, kapalı hayvan barınağında bakılan ratlar beşer deneklik kafeslerde tutuldu. Standart rat yemi ve çeşme suyu verilerek beslendi.

Çalışmada ratlar A, B, C olmak üzere üç gruba ayrıldı. Gruplar onar rattan oluşturuldu. Gruplar A grubu; Kontrol, B grubu; Baz madde (Kitosan) ve C grubu ; Etken madde + baz madde olarak oluşturuldu.

Cerrahi işlem: Her bir rata intramusküler 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® 10 ml flakon, Pfizer) ile 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun® 50 ml %2 flakon, Bayer) verilerek anestezi sağlandı ve ratlar operasyon sırasında spontan solunuma bırakıldı.

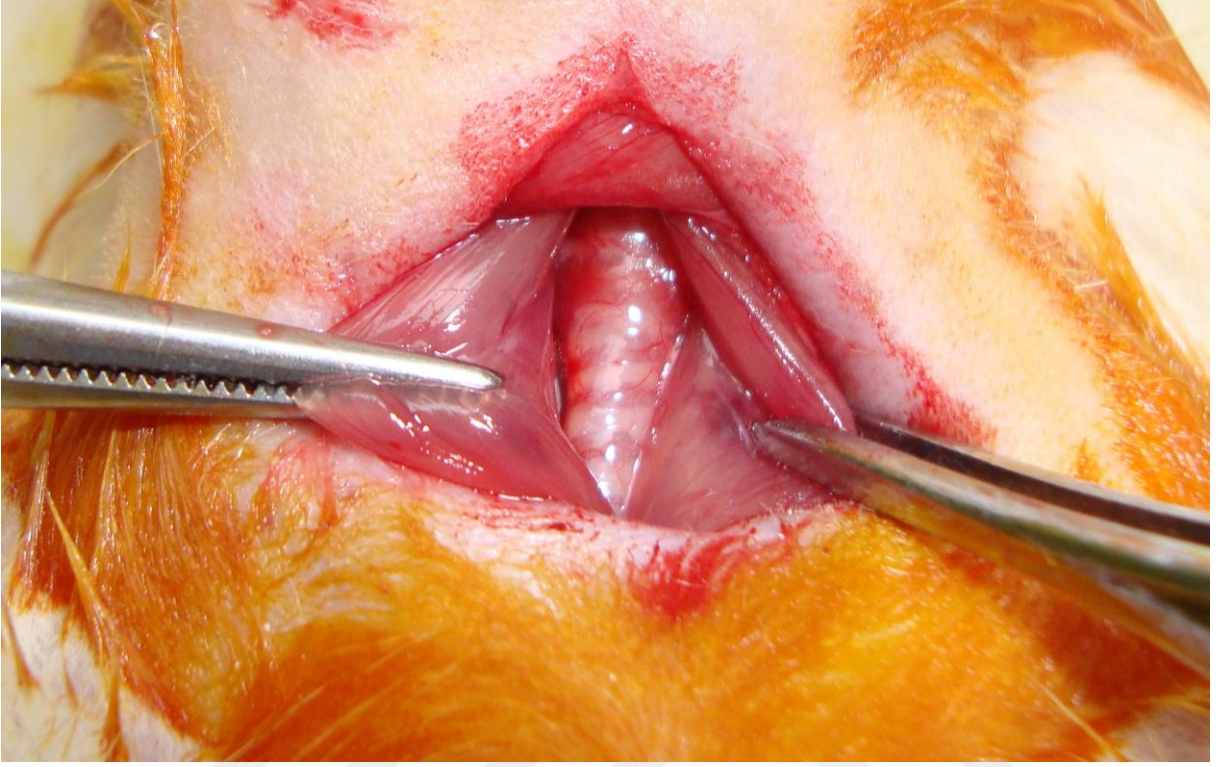
Intramusküler anestezi uygulandıktan on dakika sonra ratlar supin pozisyonda yatırıldı. Boyun ön bölümü traş edildi, povidon-iodin (Poviodeks® 1000 ml antiseptik solüsyon, KİM-PA) ile silindi (Resim 1).



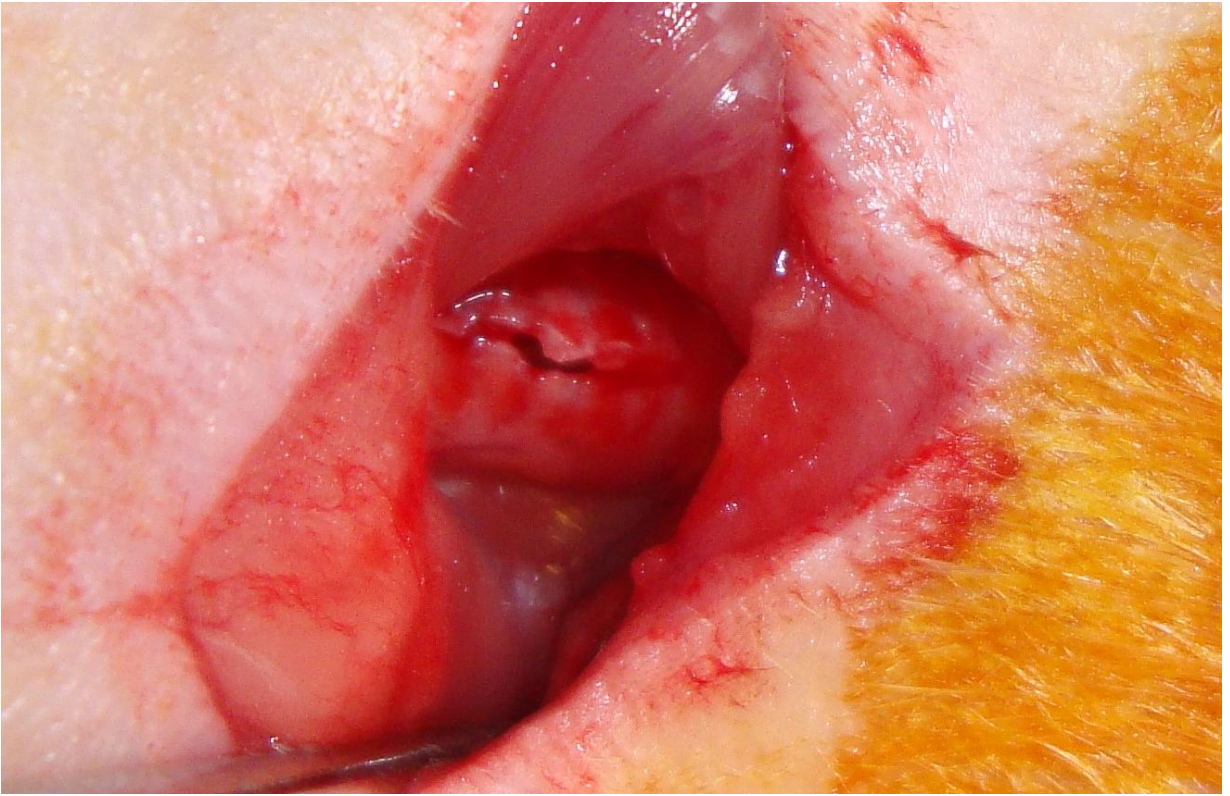
Resim 1: Cerrahiye hazırlanan ratın supin pozisyonuna yatırılması.

Orta hatta çene altında tiroid kıkırdak üst sınırından insisura jugularise uzanan yaklaşık 3 cm uzunluğunda vertikal cilt insizyonu yapıldı. Cilt ve cilt altı geçildi, kaslar laterale ekarte edilerek larengotrakeal yapıya ulaşıldı (Resim 2). Tüm ratların 2 ve 5. trakeal

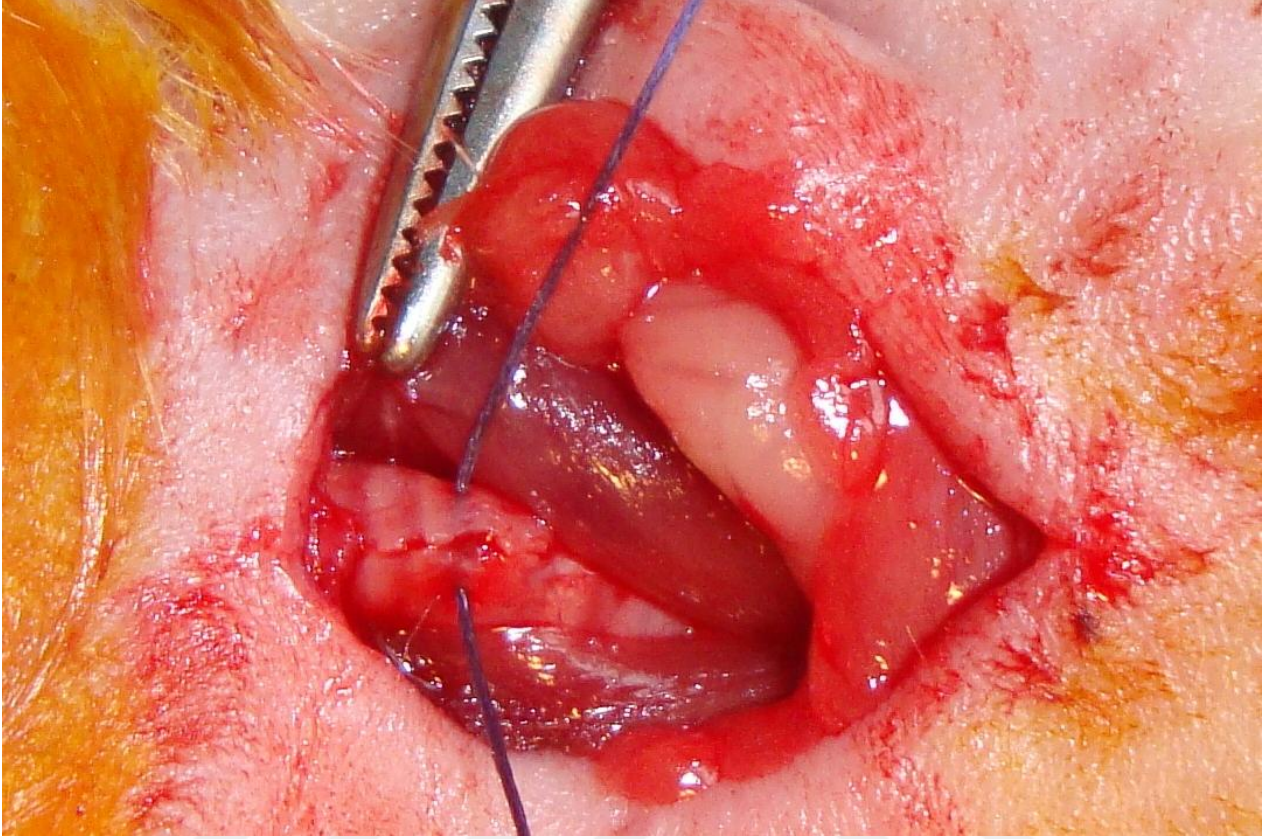
halkalarının ön bölgesine 3 kıkırdağı içine alacak şekilde yaklaşık 0.5 cm'lik tam kat vertikal insizyon yapıldı (Resim 3). Trakeanın membranöz bölümü tüm ratlarda korundu. Trakeal insizyon 4/0 polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon, Belçika) ile suture edildi.



Resim 2: Kaslar lateralize edildikten sonra trakeanın görünümü.

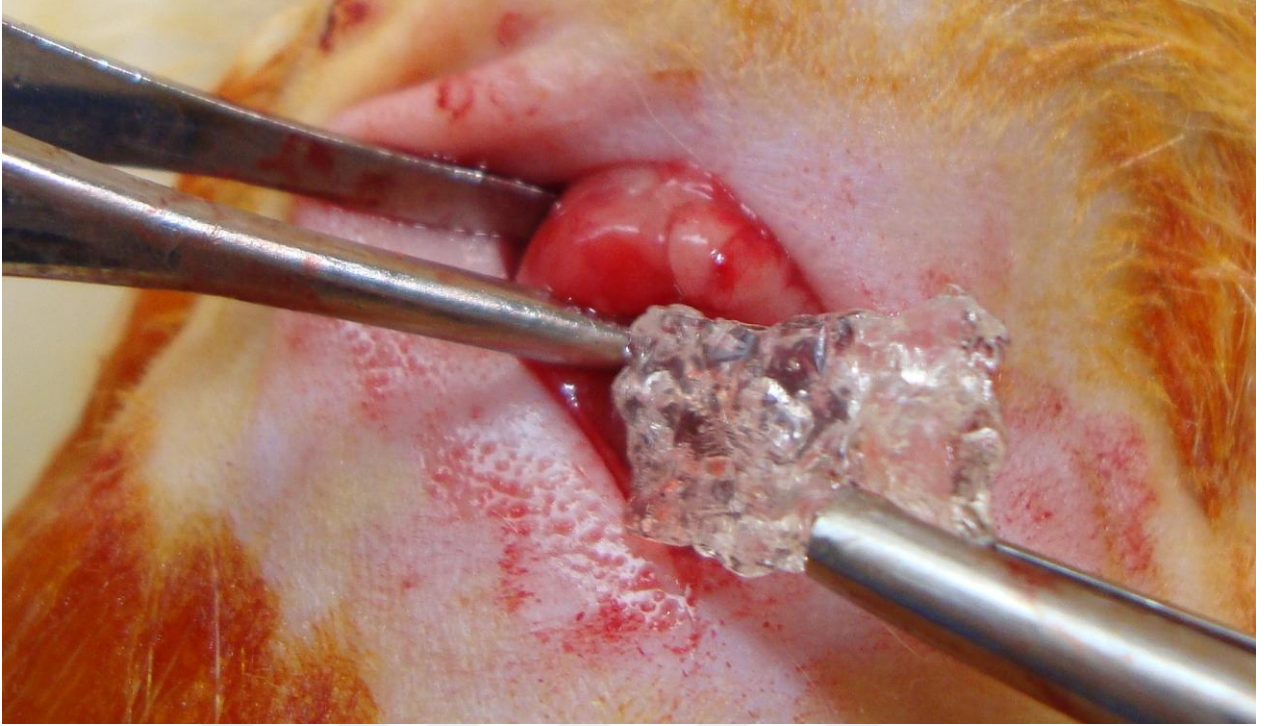


Resim 3: Trakeal kesinin görünümü.

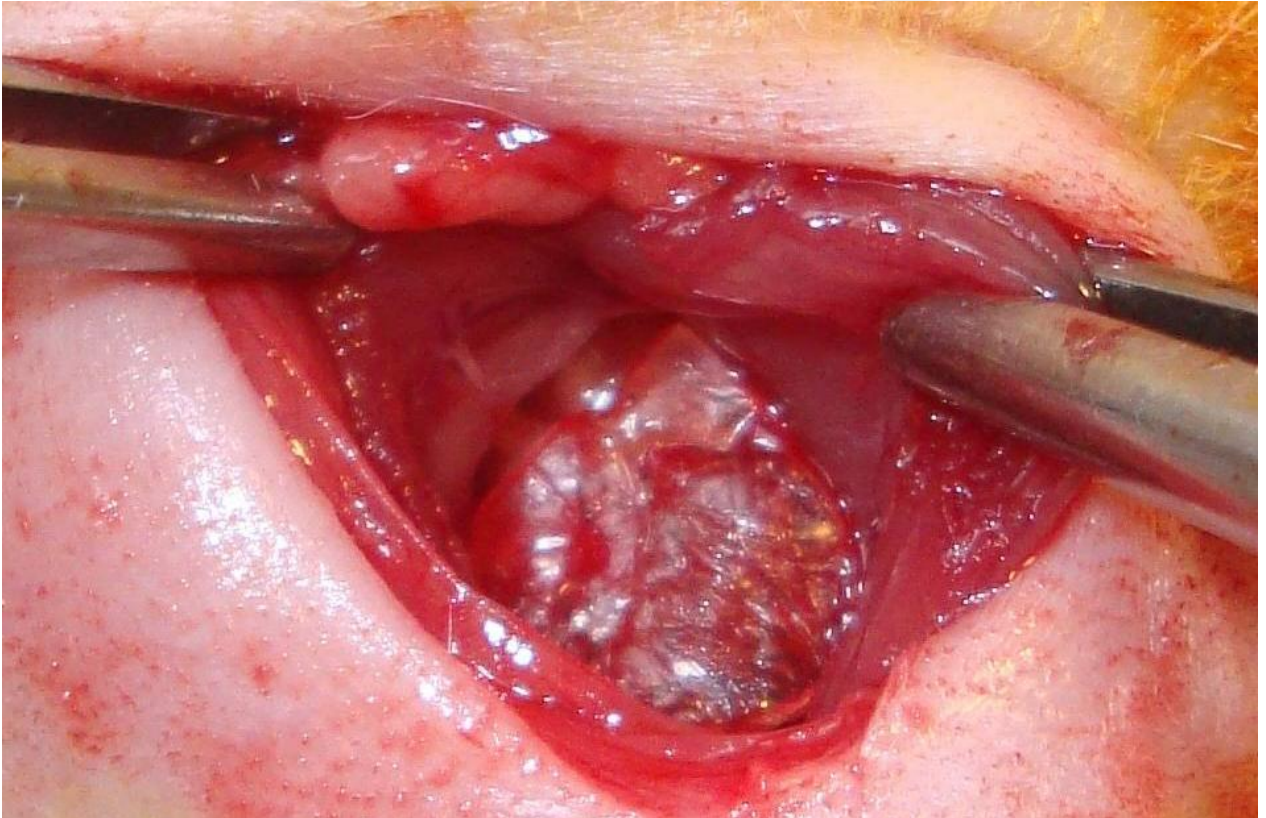


Resim 4: Trakeal insizyonun sütür görüntüsü.

C grubunda sütüre edilen bölge üzerine paratrakeal olarak, Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı tarafından soğuk zincir ile korunan recombinant human TGF-beta3 (R&D Systems®, Albio), kitosan içerisinde eritilerek oluşturulan yavaş salınlı film tabaka haline getirilmiş 5mm X 5mm boyutlarında TGF-β3 preparatı yerleştirildi (Resim 5,6). B grubunda trakeal insizyon yapılan bölgeye baz madde olarak kitosan film tabaka yerleştirildi. A grubunda trakeal insizyon bölgesi sadece sütüre edildi ve kontrol grubu olarak değerlendirildi. Ardından cilt altı dokusu ve cilt anatomiye uygun olarak 4/0 polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon, Belçika) ile kapatılarak operasyona son verildi.



Resim 5: TGF- β 3/kitosan kombinasyonunu içeren film tabakanın yerleştirilme görüntüsü.



Resim 6: Trakeal insizyonun üzerine yerleştirilmiş preparatın görünümü.

Postoperatif erken dönemde solunum sıkıntısı yönünden takip edilip tamamen uyandıklarında kafeslerine alındılar. Opere edilen ratlar solunum sıkıntısı, stridor ve beslenme bozukluğu açısından sakrifiye edilinceye kadar gözlendi. Çalışmanın ilk bir haftasında TGF- β 3 uyguladığımız gruptan (C Grubu) 2 rat, kitosan uygulanan gruptan (B grubu) 1 rat beslenme bozukluğuna bağlı genel durum kötülüğü nedeni ile öldü. Sonraki iki haftada herhangi bir sorun yaşanmazken son haftada TGF- β 3 uyguladığımız gruptan (C grubu) 1 rat, kitosan uygulanan gruptan (B grubu) 1 rat ve kontrol grubundan (A grubu) 1 rat öldü. İstatiksel açıdan yeterli denek olması nedeni ile yerlerine yeni denekler eklenmedi.

Tüm gruplardaki ratlar 30. günde inhalasyon anestezi cihazı ile yüksek doz izofluran (İsofludem®, Dem) verilerek sakrifiye edildi. Bütün ratların trakeaları üstte tiroid kıkırdağın üst kenarından altta 6. trakeal halkanın altından kesilerek özefagus ile birlikte çıkarıldı. Çalışma boyunca yapılan cerrahi işlemler standardizasyon açısından, aynı kişi tarafından ve aynı cerrahi aletler kullanılarak uygulanmıştır.

Mikroskopik incelemeye gönderilecek rat trakeaları her grup için ayrı ayrı rastlantısal olarak numaralandırıldı ve patolog tarafından kör olarak incelendi.

Tablo 2: Çalışma grupları ve yapılan işlemler

GRUPLAR	SAYI	SÜRE	YAPILAN İŞLEM
A Kontrol	9	30 gün	Tüm ratların 2 ve 5. trakeal halkalarının ön bölgesine yaklaşık 0.5 cm'lik tam kat vertikal insizyon yapıldı. Trakeal insizyon suture edildi.
B Kitosan	8	30 gün	Tüm ratların 2 ve 5. trakeal halkalarının ön bölgesine yaklaşık 0.5 cm'lik vertikal insizyon yapılarak travmatize edildi. Trakeal insizyon suture edildi. Suture edilen bölge üzerine paratrakeal olarak, film tabaka haline getirilmiş kitosan preparatı yerleştirildi
C TGF-β3/kitosan kombinasyonu	7	30 gün	Tüm ratların 2 ve 5. trakeal halkalarının ön bölgesine yaklaşık 0.5 cm'lik tam kat vertikal insizyon yapıldı. Trakeal insizyon suture edildi. Suture edilen bölge üzerine paratrakeal olarak, kitosan içerisinde eritilerek yavaş salımlı film tabaka haline getirilmiş TGF-β3 preparatı yerleştirildi.

Mikroskopik inceleme için kesitler %10'luk nötral formaldehit ile fikse edildi. Paratrakeal vertikal insizyon yapılarak trakea yara alanının en dar yeri bulundu. Parafin içine gömülüp bloklandı. En dar trakea alanından mikrotomla (Leica RM2035) 5 ve 25 mikron kalınlığında horizontal kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda (Stereology Workstation-Lieca DM 2500 ışık mikroskobu) x20, x40 ve x100 büyütmelemlerle incelendi.

Histopatolojik incelemede; epitelizasyon, inflamasyon, anjiogenez, fibroblast ve kollojen parametreleri değerlendirildi. Tüm parametrelerde; yok (-), hafif (+), orta (++) , fazla (+++) ve çok fazla (++++) şeklinde nitelendirildi ve mikroskopik değerlendirme sırasında "+" ve "-" işaretle değerlendirilen parametreler istatistiksel değerlendirme için 0, 1, 2, 3 ve 4 olacak şekilde nümerik hale getirildi.

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizleri için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 13.0 programı kullanıldı.

Üç grubun epitelizasyon, inflamasyon, anjiogenez, fibroblast, kollojen ve komplikasyon sonuçlarının istatistiksel olarak incelenmesinde *Pearson Ki-kare Test ve Trend Ki-kare Test* kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde ve %99 güven aralığında ileri derecede anlamlılık $p<0.01$ düzeyinde değerlendirildi.

9. BULGULAR

Ratlardan bazılarında anesteziden kaynaklanan peroperatif dönemde solunum sıkıntısı gözlemlendi. Solunum sıkıntısı görülen ratlara peroperatifambu kullanılarak solunum desteği verildi. Entübasyon gerekmedi. TGFβ3 grubundaki 4 rat ve kitosan grubundaki 5 ratta insizyon bölgelerinde cilt altında, boyutları değişkenlik gösteren sert kitlesel lezyon palpe edildi (resim 7).



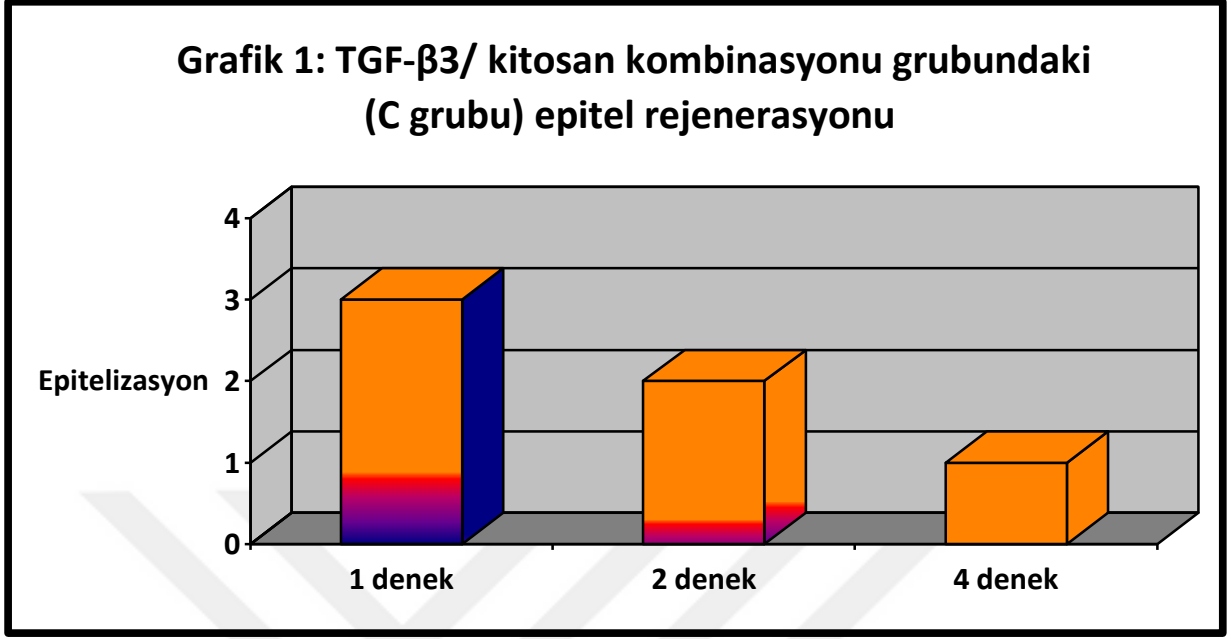
Resim 7: İnsizyon bölgesinde palpe edilen kitlesel lezyonun görünümü.

9.1.MİKROSKOBİK BULGULAR

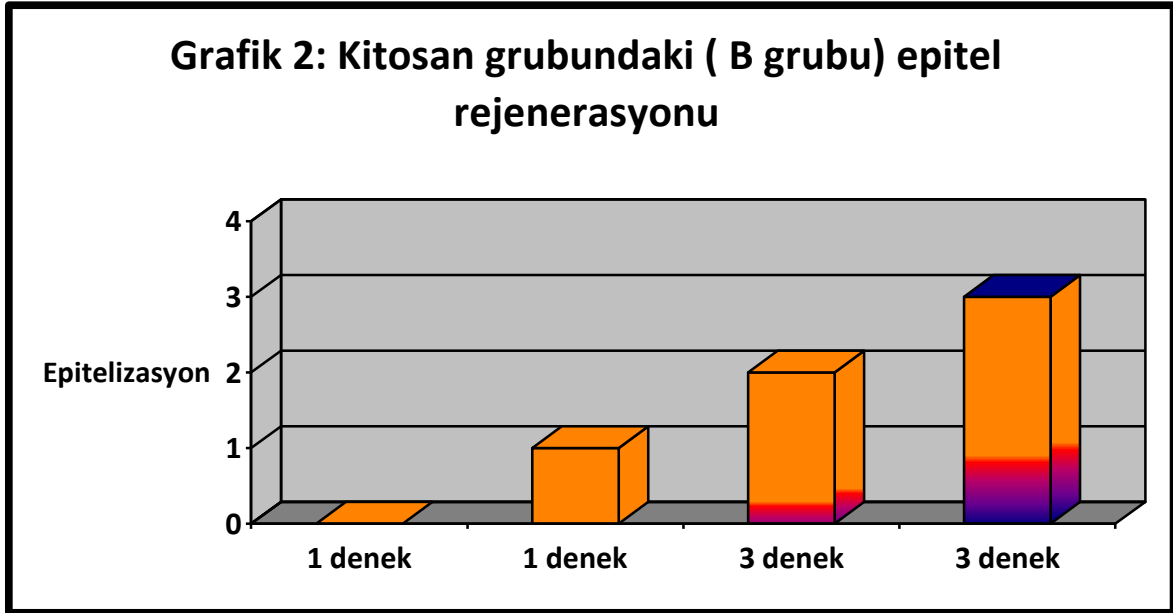
Epitelizasyon, inflamasyon, angiogenez, fibroblast ve kollojen bulguları nümerik olarak 3 grupta hesaplandı.

EPİTELİZASYON; Epitelizasyon ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Deneklerin hepsinde hasarlı bölgelerde mukoza epitelinin rejenere olduğu görüldü.

TGF- β 3/kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) epitel rejenerasyonu 4 denekte 1 pozitif, 2 denekte 2 pozitif, 1 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi.

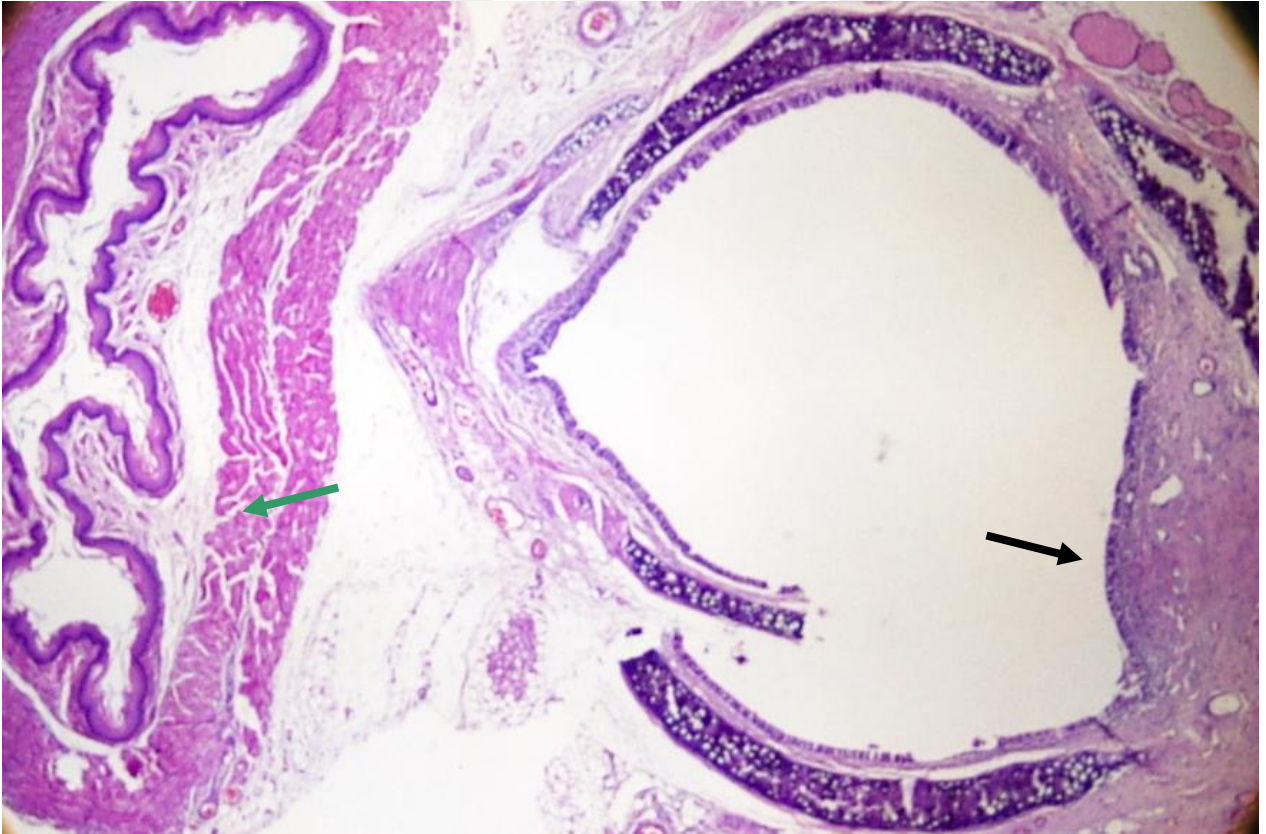
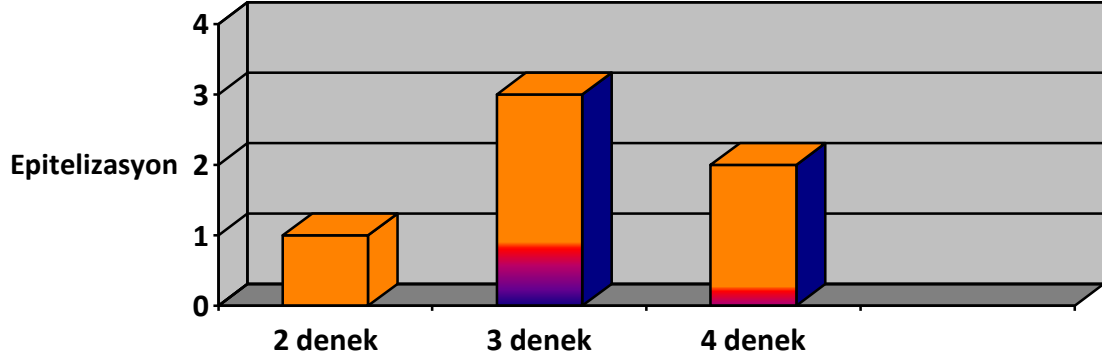


Kitosan grubundaki (B grubu) epitel rejenerasyonu 3 denekte 3 pozitif, 3 denekte 2 pozitif, 1 denekte 1 pozitif olarak gözlemlendi. Kitosan grubundaki 1 denekte epitel rejenerasyonu gözlemlenmedi.

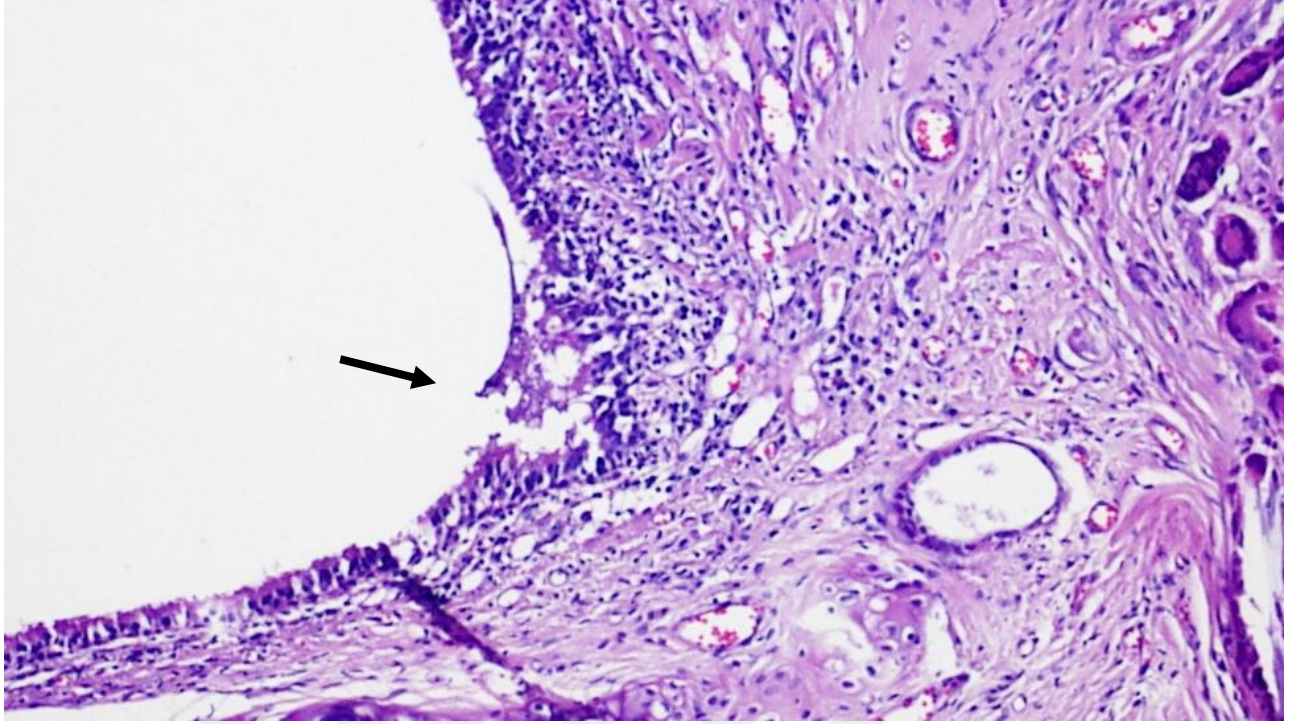


Kontrol grubundaki (A grubu) epitel rejenerasyonu 4 denekte 2 pozitif, 3 denekte 3 pozitif, 2 denekte 1 pozitif olarak gözlemlendi.

Grafik 3: Kontrol grubundaki (A grubu) epitel rejenerasyonu



**Resim 8: Kontrol grubundaki rat trakeası ve özefagusun görünümü (HE x20).
(Yeşil ok: Özofagus, siyah ok: Trakeal insizyon bölgesindeki epitelyumizasyon)**



Resim 9: Kontrol grubundaki rat trakeasının insizyon bölgesindeki epitelizasyonun görünümü (HE x200).

Tablo 3: Epitel rejenerasyonunun grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.

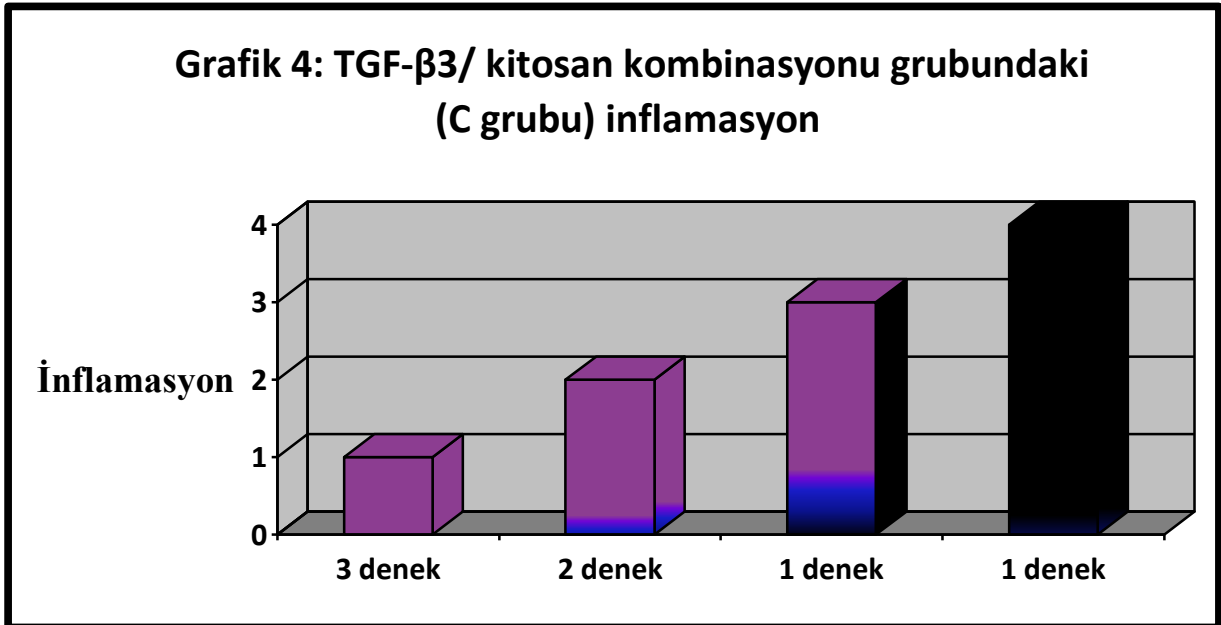
			TGFB3 (C grubu)	KITOSAN (B Grubu)	KONTROL (A grubu)	TOPLAM
Epitel	negatif	Denek sayısı	0	1	0	1
		% Epitel	,0%	100,0%	,0%	100,0%
		% grup	,0%	12,5%	,0%	4,2%
	1 pozitif	Denek sayısı	4	1	2	7
		% Epitel	57,1%	14,3%	28,6%	100,0%
		% grup	57,1%	12,5%	22,2%	29,2%
	2 pozitif	Denek sayısı	2	3	4	9
		% Epitel	22,2%	33,3%	44,4%	100,0%
		% grup	28,6%	37,5%	44,4%	37,5%
	3 pozitif	Denek sayısı	1	3	3	7
		% Epitel	14,3%	42,9%	42,9%	100,0%
		% grup	14,3%	37,5%	33,3%	29,2%
Toplam		Denek sayısı	7	8	9	24

Epitel rejenerasyonu bakımından, TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubu (C grubu), kitosan grubu (B grubu) ve kontrol grubu (A grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Ki-Kare testi kullanıldı. Gruplar arasında epitel rejenerasyonu açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($P>0,05$).

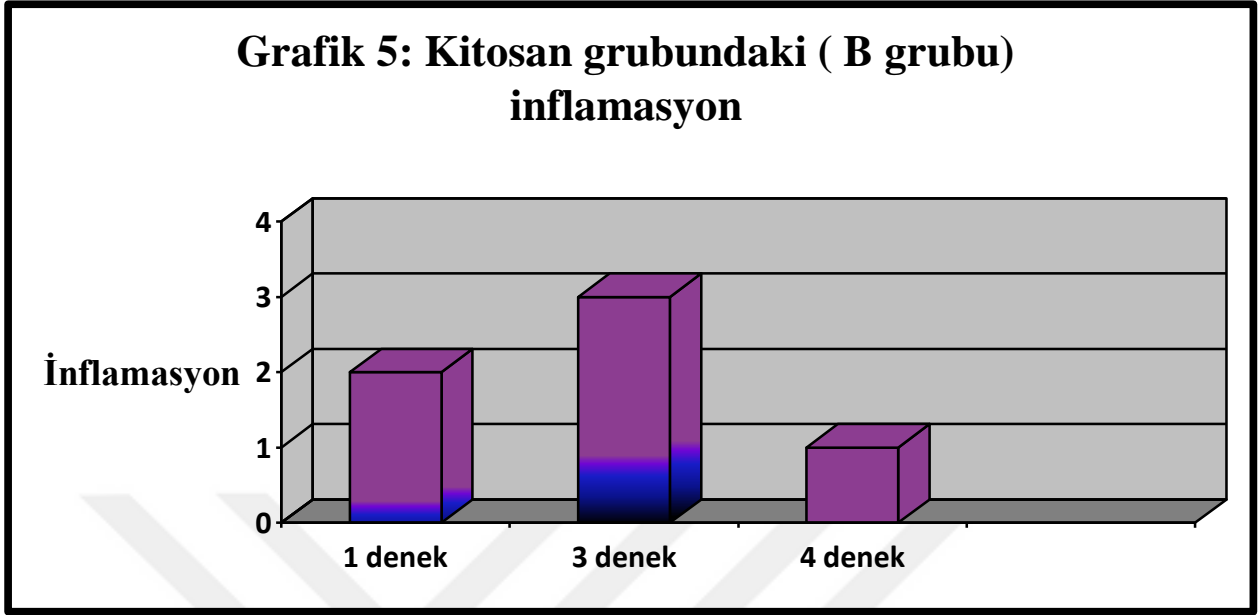
Tablo 4 : Epitel rejenerasyonu sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,829(a)	6	,443
Likelihood Ratio	5,948	6	,429
Linear-by-Linear Association	1,414	1	,234
N of Valid Cases	24		

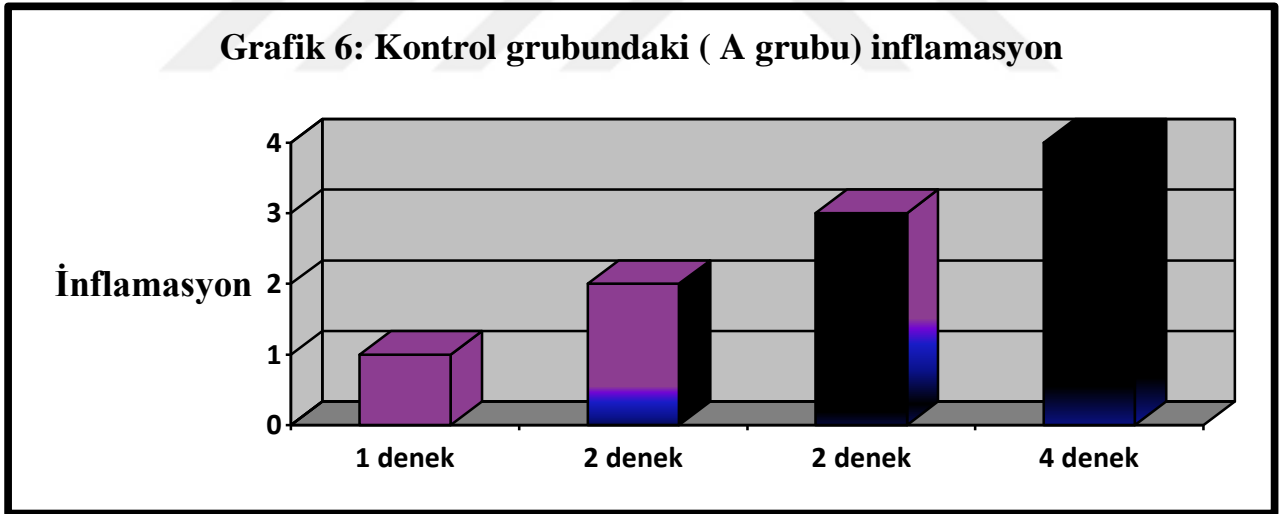
İNFLAMASYON; TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubundaki (C grubu) inflamasyon 3 denekte 1 pozitif, 2 denekte 2 pozitif , 1 denekte 3 pozitif, 1 denekte 4 pozitif olarak değerlendirildi.



Kitosan grubundaki (B grubu) inflamasyon 4 denekte 1 pozitif, 3 denekte 3 pozitif, 1 denekte 2 pozitif olarak gözlemlendi.



Kontrol grubundaki (A grubu) epitel rejenerasyonu 4 denekte 1 pozitif, 2 denekte 2 pozitif, 2 denekte 3 pozitif, 1 denekte 1 pozitif olarak gözlemlendi.



Tablo 5: İnflamasyonun grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.

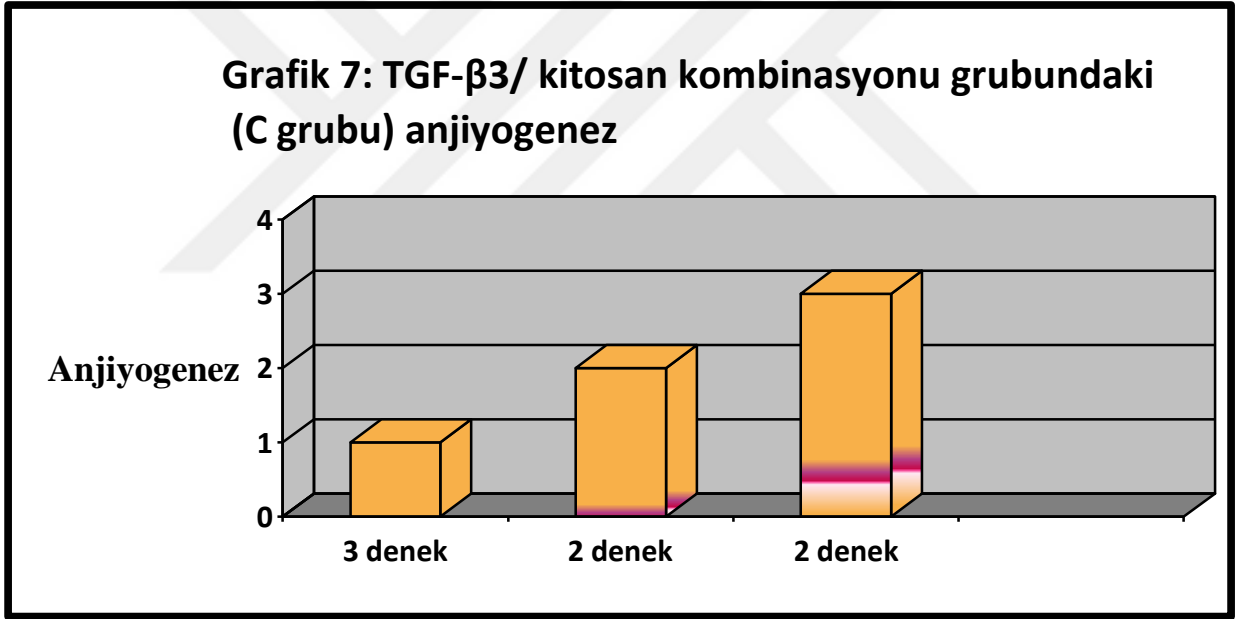
		TGFB3 (C grubu)	KITOSAN (B Grubu)	KONTROL (A grubu)	TOPLAM	
İnflamasyon	1	Denek sayısı	3	4	4	11
	pozitif					
	%inflamasyon	27,3%	36,4%	36,4%	100,0%	
	% grup	42,9%	50,0%	44,4%	45,8%	
2	Denek sayısı	2	1	2	5	
	pozitif					
	% inflamasyon	40,0%	20,0%	40,0%	100,0%	
	% grup	28,6%	12,5%	22,2%	20,8%	
3	Denek sayısı	1	3	2	6	
	pozitif					
	% inflamasyon	16,7%	50,0%	33,3%	100,0%	
	% grup	14,3%	37,5%	22,2%	25,0%	
4	Denek sayısı	1	0	1	2	
	pozitif					
	%inflamasyon	50,0%	,0%	50,0%	100,0%	
	% grup	14,3%	,0%	11,1%	8,3%	
Toplam	Denek sayısı	7	8	9	24	

İnflamasyon bakımından, TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubu (C grubu), kitosan grubu (B grubu) ve kontrol grubu (A grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Ki-Kare testi kullanıldı. Gruplar arasında inflamasyon açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($P>0,05$).

Tablo 6 : İnflamasyon sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları (P >0,05).

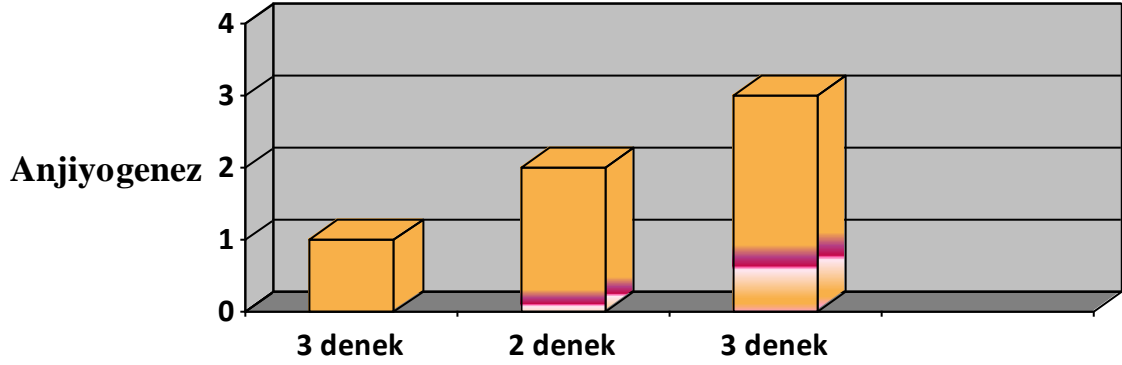
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2,421(a)	6	,877
Likelihood Ratio	3,043	6	,803
Linear-by-Linear Association	,000	1	,984
N of Valid Cases	24		

ANJİYOGENEZ; TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubundaki (C grubu) anjiyogenez 3 denekte 1 pozitif, 2 denekte 2 pozitif , 2 denekte 3 pozitif olarak değerlendirildi.



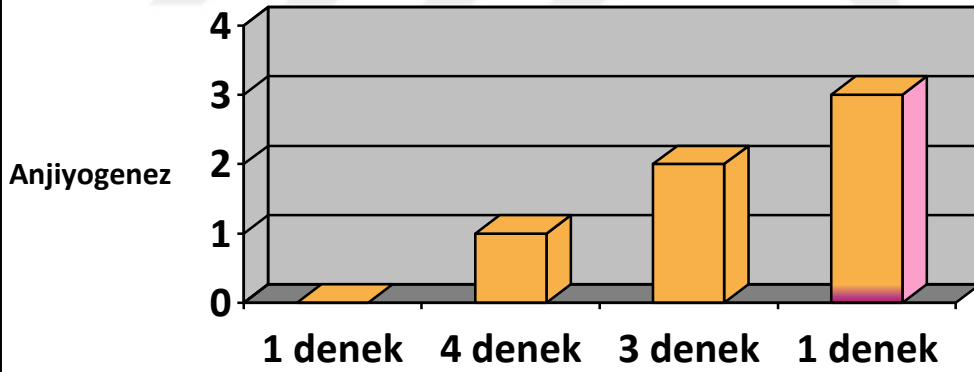
Kitosan grubundaki (B grubu) anjiyogenez 3 denekte 1 pozitif, 2 denekte 2 pozitif, 3 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi.

Grafik 8: Kitosan grubundaki (B grubu) anjiyogenez



Kontrol grubundaki (A grubu) anjiyogenez 4 denekte 1 pozitif, 3 denekte 2 pozitif, 1 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi. Kontrol grubundaki 1 denekte anjiyogenez gözlemlenmedi.

Grafik 9: Kontrol grubundaki (A grubu) anjiyogenez



Tablo 7: Anjiyogenezin grup içi ve gruplar arası dağılımı.

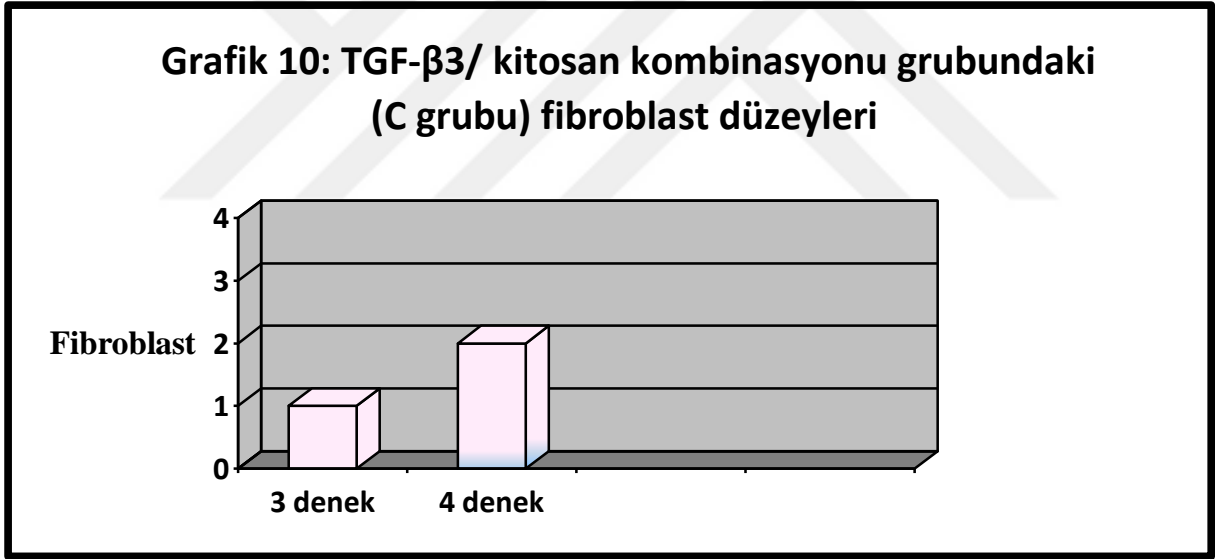
			TGF-β3	KITOSAN	KONTROL	TOPLAM
anjiyogenez	negatif	Denek sayısı	0	0	1	1
		% anjiyogenez	,0%	,0%	100,0%	100,0%
		% grup	,0%	,0%	11,1%	4,2%
	1 pozitif	Denek sayısı	3	3	4	10
		% anjiyogenez	30,0%	30,0%	40,0%	100,0%
		% grup	42,9%	37,5%	44,4%	41,7%
	2 pozitif	Denek sayısı	2	2	3	7
		% anjiyogenez	28,6%	28,6%	42,9%	100,0%
		% grup	28,6%	25,0%	33,3%	29,2%
	3 pozitif	Denek sayısı	2	3	1	6
		% anjiyogenez	33,3%	50,0%	16,7%	100,0%
		% grup	28,6%	37,5%	11,1%	25,0%
Toplam		Denek sayısı	7	8	9	24

Anjiyogenez bakımından, TGF-β3/kitosan kombinasyon grubu (C grubu), kitosan grubu (B grubu) ve kontrol grubu (A grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Ki-Kare testi kullanıldı. Gruplar arasında anjiyogenez açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmadı (P>0,05).

Tablo 8 : İnflamasyon sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları (P >0,05).

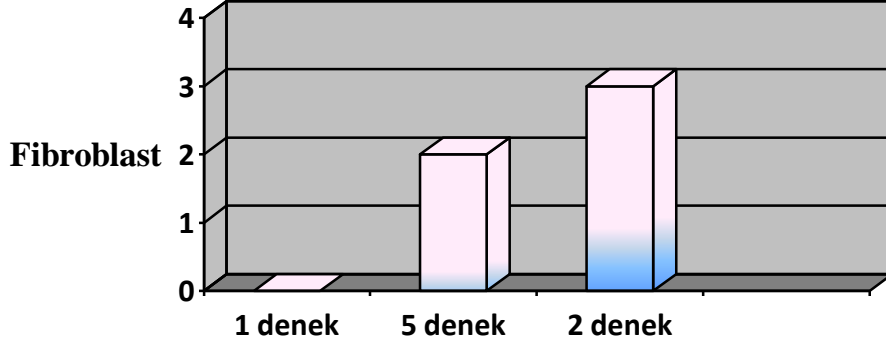
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,051(a)	6	,802
Likelihood Ratio	3,462	6	,749
Linear-by-Linear Association	,962	1	,327
N of Valid Cases	24		

FİBROBLAST; TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubundaki (C grubu) fibroblastlar 3 denekte 1 pozitif, 4 denekte 2 pozitif olarak değerlendirildi.



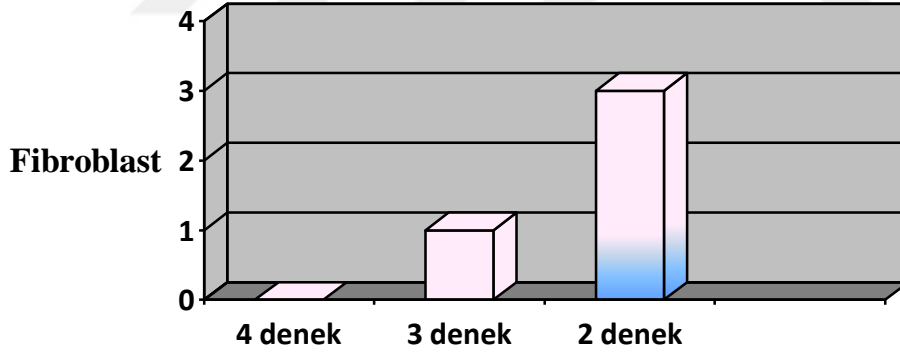
Kitosan grubundaki (B grubu) fibroblastlar 5 denekte 2 pozitif, 2 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi. Kitosan grubundaki 1 denekte fibroblast gözlemlenmedi.

Grafik 11: Kitosan grubundaki (B grubu) fibroblast düzeyleri



Kontrol grubundaki (A grubu) fibroblastlar 3 denekte 1 pozitif, 2 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi. Kontrol grubundaki 4 denekte fibroblast gözlemlenmedi.

Grafik 12: Kontrol grubundaki (A grubu) fibroblast düzeyleri



Tablo 9: Fibroblastların grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.

		TGF- β 3 (C Grubu)	KITOSAN (B Grubu)	KONTROL (A Grubu)	TOPLAM	
fibroblast	negatif	Denek sayısı	0	1	4	5
		% fibroblast	,0%	20,0%	80,0%	100,0%
		% grup	,0%	12,5%	44,4%	20,8%
	1 pozitif	Denek sayısı	3	0	3	6
		% fibroblast	50,0%	,0%	50,0%	100,0%
		% grup	42,9%	,0%	33,3%	25,0%
	2 pozitif	Denek sayısı	4	5	0	9
		% fibroblast	44,4%	55,6%	,0%	100,0%
		% grup	57,1%	62,5%	,0%	37,5%
	3 pozitif	Denek sayısı	0	2	2	4
		% fibroblast	,0%	50,0%	50,0%	100,0%
		% grup	,0%	25,0%	22,2%	16,7%
Toplam	Denek sayısı	7	8	9	24	

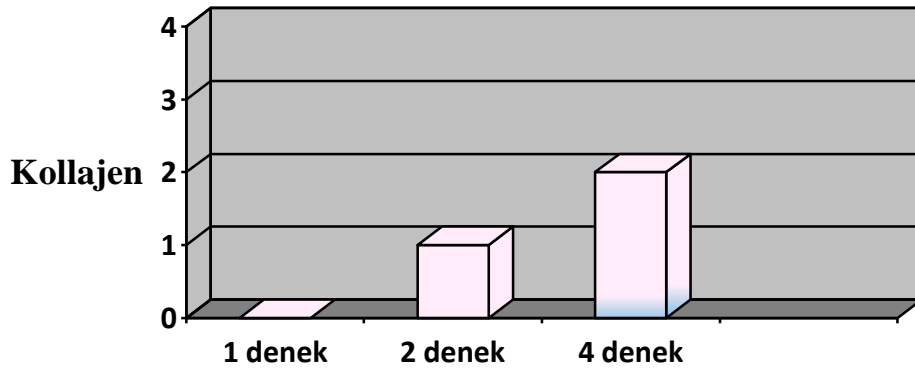
Fibroblast düzeylerine göre, TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubu (C grubu), kitosan grubu (B grubu) ve kontrol grubu (A grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Ki-Kare testi kullanıldı. Gruplar arasında fibroblast düzeyleri açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($P>0,05$).

Tablo 10 : Fibroblast sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları (P >0,05).

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,371(a)	6	,026
Likelihood Ratio	21,250	6	,002
Linear-by-Linear Association	1,513	1	,219
N of Valid Cases	24		

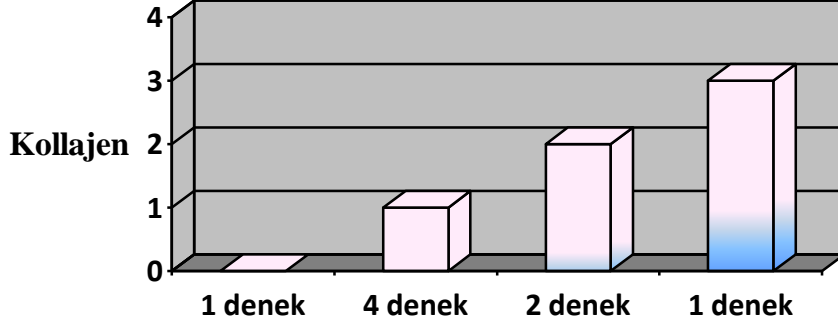
KOLLAJEN; TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubundaki (C grubu) kollajen 2 denekte 1 pozitif, 4 denekte 2 pozitif olarak değerlendirildi. TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubundaki 1 denekte kollajen gözlenmedi.

Grafik 13: TGF- β 3/ kitosan kombinasyonu grubundaki (C grubu) kollajen düzeyleri



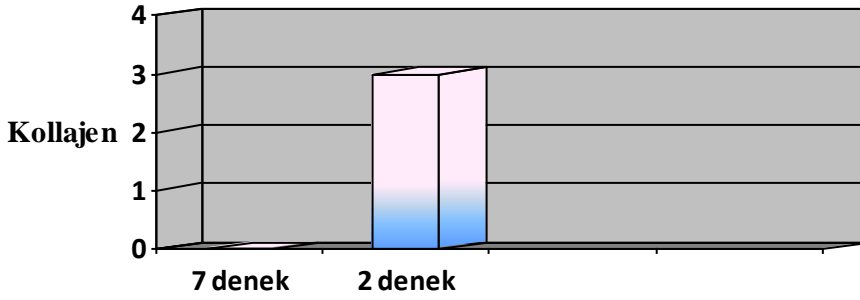
Kitosan grubundaki (B grubu) kollajen 4 denekte 1 pozitif, 2 denekte 2 pozitif, 1 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi. Kitosan grubundaki 1 denekte kollajen gözlenmedi.

Grafik 14: Kitosan grubundaki (B grubu) kollajen düzeyleri



Kontrol grubundaki (A grubu) kollajen 2 denekte 3 pozitif olarak gözlemlendi. Kontrol grubundaki 7 denekte kollajen gözlenmedi.

Grafik 15: Kontrol grubundaki (A grubu) kollajen düzeyleri



Tablo 11: Kollajenin grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı.

		TGF-β3 (C Grubu)	KITOSAN (B Grubu)	KONTROL (A Grubu)	TOPLAM	
Kollajen	negatif	Denek sayısı	1	1	7	9
		% kollajen	11,1%	11,1%	77,8%	100,0%
		% grup	14,3%	12,5%	77,8%	37,5%
	1 pozitif	Denek sayısı	2	4	0	6
		% kollajen	33,3%	66,7%	,0%	100,0%
		% grup	28,6%	50,0%	,0%	25,0%
	2 pozitif	Denek sayısı	4	2	0	6
		% kollajen	66,7%	33,3%	,0%	100,0%
		% grup	57,1%	25,0%	,0%	25,0%
	3 pozitif	Denek sayısı	0	1	2	3
		% kollajen	,0%	33,3%	66,7%	100,0%
		% grup	,0%	12,5%	22,2%	12,5%
Toplam	Denek sayısı	7	8	9	24	

Kollajen düzeylerine göre, TGF-β3/kitosan kombinasyon grubu (C grubu), kitosan grubu (B grubu) ve kontrol grubu (A grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Ki-Kare testi kullanıldı. Gruplar arasında kollajen düzeyleri açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($P>0,05$).

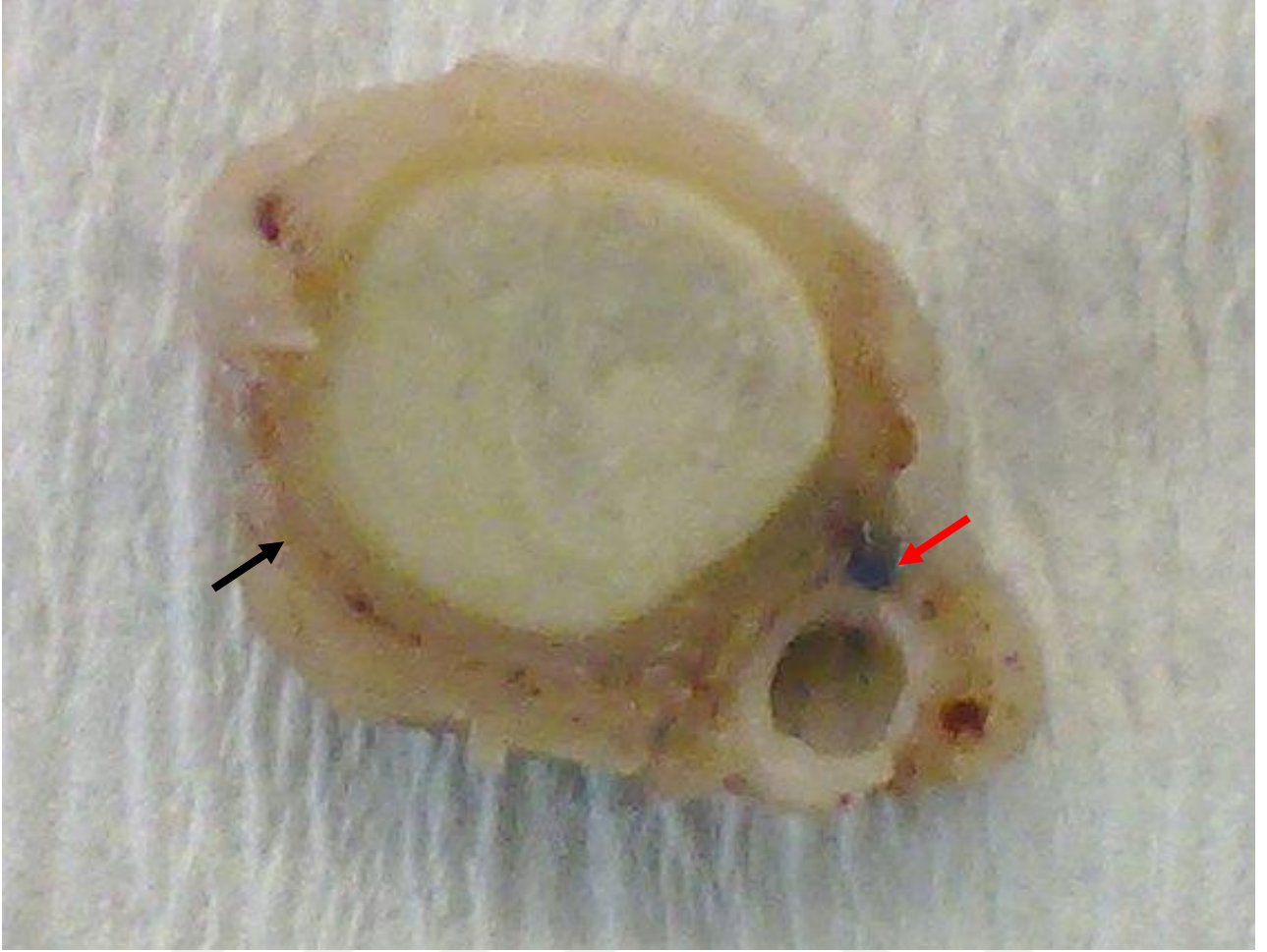
Tablo 12 : Kollajen sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P >0,05$).

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	17,217(a)	6	,009
Likelihood Ratio	21,080	6	,002
Linear-by-Linear Association	2,131	1	,144
N of Valid Cases	24		

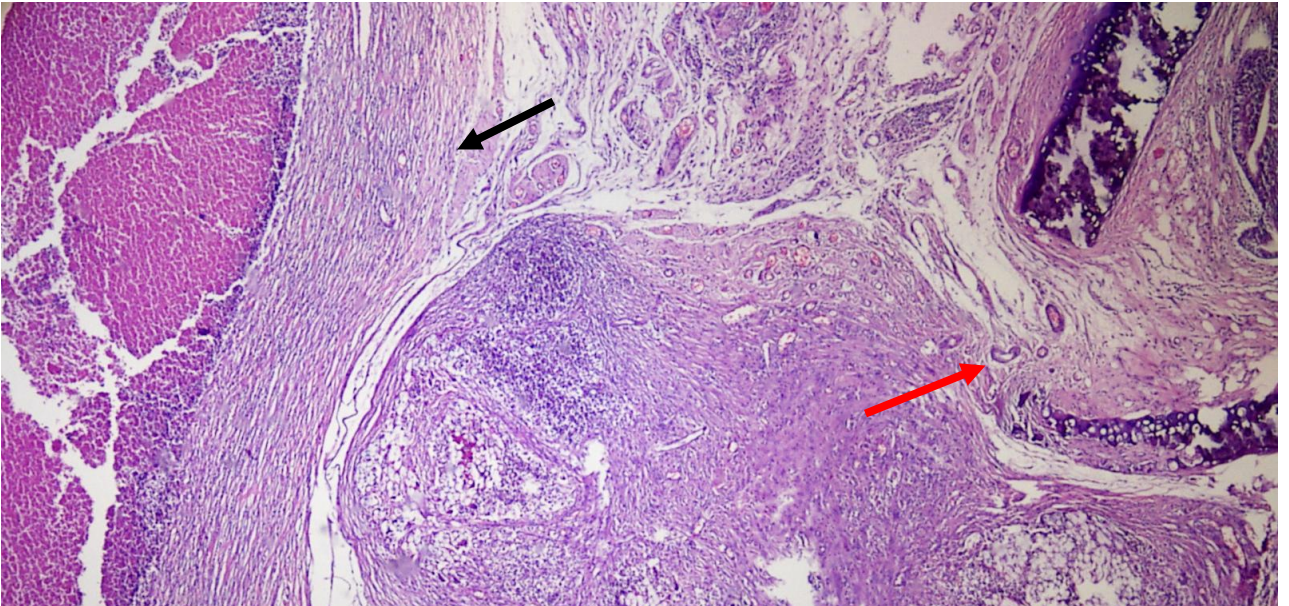
KOMPLİKASYON; TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubundaki (C grubu) 4 denekte ve kitosan grubundaki (B grubu) 5 denekte trakeal insizyon bölgesinde, paratrakeal yerleşim gösteren boyutları değişkenlik gösteren kitlesel lezyonlar palpe edildi (Resim10). Kontrol grubunda herhangi bir komplikasyon gözlenmedi. Histopatolojik incelemesinde her iki gruptaki lezyonların benzer özellikte olduğu görüldü. Lezyonlar histopatolojik inceleme sonucunda apse olarak değerlendirildi.



Resim 10: Trakea üzerinde oluşan absenin görünümü.



Resim 11: Apse ve trakeanın kesitsel görünümü. (Siyah ok: apse, kırmızı ok : trakeal insizyon bölgesi)



Resim 12: Apse ve trakeanın mikroskopik incelemedeki görünümü (HE x40) (Siyah ok: apse, kırmızı ok : trakeal insizyon bölgesi)

Tablo 13: Komplikasyonun grup içi ve gruplar arasındaki dağılımı

		TGFB3 (C Grubu)	KITOSAN (B Grubu)	KONTROL (A Grubu)	TOPLAM	
Komplikasyon	var	Denek sayısı	4	5	0	9
		% komplikasyon	44,4%	55,6%	,0%	100,0%
		% grup	57,1%	62,5%	,0%	37,5%
	yok	Denek sayısı	3	3	9	15
		% komplikasyon	20,0%	20,0%	60,0%	100,0%
		% grup	42,9%	37,5%	100,0%	62,5%
Toplam		Denek sayısı	7	8	9	24

Komplikasyon görülme sıklığına göre, TGF- β 3/kitosan kombinasyon grubu (C grubu), kitosan grubu (B grubu) ve kontrol grubu (A grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Ki-Kare testi kullanıldı. Komplikasyon açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$)

Tablo 14 : Kollajen sonuçlarında göre gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Ki-Kare testinin sonuçları ($P > 0,05$).

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,686(a)	2	,013
Likelihood Ratio	11,609	2	,003
Linear-by-Linear Association	5,827	1	,016
N of Valid Cases	24		

10. TARTIŞMA

Trakea cerrahisi anatomik ve teknik açıdan zor olsa da, benign lezyonlarda küratif olması, malign lezyonlarda ise ek radyoterapi ile başarılı sonuçlar alınması nedeniyle çok önemlidir. Trakeal rezeksiyon sıklıkla trakeal tümör, travma, doğuştan anomali veya vasküler lezyonlar neticesinde uygulanmaktadır.

Cerrahi tedavilerin birincil ve en önemli komplikasyonu granülasyon dokusu gelişmesine bağlı tekrarlayan stenozdur (3). Granülasyon dokusu yara iyileşmesi mekanizmasının son basamağıdır. Yara iyileşmesi iç içe geçmiş üç ayrı evreye ayrılır:

a) hemostaz ve enflamasyon,

b) proliferasyon (çoğalma),

c) matürasyon ve remodelizasyon (olgunlaşma ve yeniden şekillendirme, granülasyon dokusu veya skar ile tamir aşaması) (72).

Trakeal stenozlu hastalarda granülasyon oluşumunu önlemek için yeni tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Liman ŞT. Ve ark. (73) östrojen ve progesteron ile yaptıkları çalışmada seks hormonlarının trakea cerrahisi sonrasında yara iyileşmesinde masif kollajen ve fibroblast proliferasyonunu engellediğini göstermiştir.

Granülasyon dokusu oluşumunu engellemek için yara iyileşmesinin üç evresinin herhangi birini engellemek için tedaviler uygulanmıştır (74). Evrelere göre bu tedavi yöntemleri;

1. İnflamasyon evresine etki eden; antibiyotik ve kortikosteroidler, hiperbarik oksijen tedavisi,

2. Proliferasyon evresine etki eden; antibiyotik ve kortikosteroidler, mitomisin-C, 5-florourasil triamsinolon asetat kombinasyonu, karnitin, hiperbarik oksijen tedavisi,

3. Matürasyon evresine etki eden; halofuginon, beta-aminopropionitril, kolşisin, penisilamin, N-asetil-L-sistein.

Trakeal stenozu engellemek amaçlı kullanılan kortikosteroidler inflamasyon sürecini etkileyerek hücre migrasyonu, proliferasyonu ve anjiyogenezi bozmaktadır (75). Bozulan inflamatuvar yanıt, yara iyileşmesinde daha sonraki aşamaları etkileyerek granülasyon dokusu oluşumunu ve yara gerilim kuvvetini azaltır. Kortikosteroid kullanılan sıçanlarda 7. günde yara gerilme kuvveti ve granülasyon oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (76). Klinik kullanım da ise kortikosteroidler trakeal stenozu engellemede veya küçültmede çok sınırlı bir etkiye sahiptir (77,78).

5-Fluorourasil insan fibroblastları üzerinde antiproliferatif etkisi olan iyi bilinen bir antimetabolittir. Fibrozisi önlemek amacıyla yavaş salımlı 5-fluorourasil triamsinolon asetonid kombinasyonu daha önce göz cerrahisinde kullanılmıştır (79,80). Cıncık ve ark. (22) 16 tavşanda subglottik bölgeyi tek taraflı tahriş ettikten sonra 0.2 ml sodyum hyalürinat içinde 10 mg 5-fluorourasil/triamsinolon asetonidi paratrakeal dokulara uygulamışlardır. İkinci ve 6. haftada denekler sakrifiye edilip incelendiğinde, 5-fluorourasil/triamsinolon asetonid kombinasyonunun fibrozisi iki tedavi grubunda da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığını tespit etmişlerdir ($p < 0,05$). 5-Fluorourasil/triamsinolon asetonid uygulanan 2. hafta çalışma grubunda, kontrol grubuna göre inflamasyonda azalma olduğu gözlenirken, istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). 5-fluorourasil/triamsinolon asetonid uygulanan 6. hafta çalışma grubundaki inflamasyonda azalma gözlenmiş, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). İnflamasyondaki bu azalma yazarlar tarafından triamsinolon asetonidin antiinflamatuvar etkisine bağlanmıştır.

Mitomisin-C antineoplastik bir ajan olmasına rağmen yüksek dozlarda kullanılması ile antifibrotik etki etmektedir (20). Antineoplastik özelliği DNA sentezini bozarak gösterirken, yüksek dozlarda kullanılması ile RNA ve protein sentezini baskılayarak antifibrotik özellik kazanır (19). Mitomisin-C'nin antifibrotik etkisine bağlı olarak trakeal stenozda kullanılan ajanların arasında yer almıştır. Mitomisin-C'nin hangi yolla fibroblast aktivitesini engellediği tam olarak bilinmemekle birlikte mitomisin-C kullanımı ile fibroblast aktivitesinin apoptozise bağlı baskılandığını gösteren bazı bulgular vardır. Ayrıca mitomisin-C'nin bFGF (basic fibroblast growth factor) ve TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) seviyesini azaltarak inflamasyon ve proliferasyon aşamasında yara iyileşmesini yavaşlattığı bildirilmiştir (81). Occleston ve ark. (82) mitomisin-C'ye maruz kalan fibroblastların Tenon kapsüllerinde başlangıç döneminde bFGF ve TGF- β 1 üretiminde artış olduğunu göstermişlerdir. Tedaviden sonra 48. günle beraber kontrollerde bu değerlerde azalma görülmüştür. Bu çalışmada mitomisin-C'nin tip 1 kollajen ve fibronektin üretiminde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu görülmüştür. Oh ve ark. (83) tarafından yapılan bir çalışmada mitomisin-C maruziyeti ile tavşan ekstraoküler kaslarında kollajen proliferasyonunda ve fibroblastlarda azalma tesbit edilmiştir. Ekstraoküler kaslarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında immünohistokimyasal olarak bFGF salınımında azalma bulunmuştur.

Trakeal stenoz tedavisinde ilk kez 1998 yılında kullanılan mitomisin-C en çok araştırılan ilaç olmuştur (74). Topikal mitomisin-C kullanımının ana sınırlayıcı unsuru, ilacın

tüm dokular için toksik oluşudur. Havayolunda solunum epitelinin korunması, enfeksiyon riski ve diğer fonksiyonların devamı bakımından önemlidir (2,3,22). İngrams ve ark. (84) mitomisin-C'nin solunum yolu epiteli üzerinde zararlı bir etkisi olmadığını ve ilacın uygulanmasını takiben epitelyal fonksiyonların geri döndüğünü bildirmişlerdir. Choong ve ark. (85) elektron mikroskopla değerlendirdikleri çalışmalarında topikal mitomisin-C uygulanmasından sonra solunum epiteli ve silya fonksiyonunu normal olarak değerlendirmişlerdir.

Mitomisin-C'nin topikal olarak uygulanmasının enfeksiyon ve tüm dokulara zarar verebilme riski nedeniyle kullanımının kısıtlı olması ve halen topikal kullanıma uygun güvenilir bir ajan bulunmuyor olması topikal güvenilir bir ajan bulmak için yapılan çalışmalara hız kazandırmıştır. Çalışmamızda kullanılan TGF- β 3'ün ciltte hipertrofik skar dokularının tedavisinde güvenilir olarak topikal formda kullanıldığını gösterir çalışmalar bulunmaktadır. Hirsberg J. ve ark. (87) yaptıkları çalışmada TGF- β 3'ün jel formunu, bası yaralarında topikal olarak kullanmışlar ve oldukça efektif olduğunu göstermişlerdir (87). Saquier CA. ve ark. (88) oral mukozada topikal kullanılan TGF- β 3'ün permeabilite ve stabilitesini araştırmışlar ve topikal TGF- β 3'ün oral mukozada doku permeabilitesinin oldukça başarılı olduğunu ve hedef dokuda yeterli konsantrasyona ulaşıldığını göstermişlerdir.

Mitomisin-C'nin etki mekanizmasında da anlaşıldığı gibi TGF- β süperfamilyası yara iyileşmesi ve skarın şekillenmesinde önemli role sahip anabolik bir sitokindir. TGF- β 1 ve TGF- β 2 fibroblastların kollajen üretimini ve metalloproteazların ECM yıkımını inhibe ederek fibroze sebep olur. Zira TGF- β 1 profibrotik olmasına rağmen TGF- β 3 ise antifibrotik etkilidir. Shah ve ark. deneysel rat yara modeli çalışmalarında, TGF- β 1 ve TGF- β 2 nötralizan antikör ile eksojen TGF- β 3 uygulamaları sonucu kontrol grubuna göre yara bölgesi kollajen depolarında gerileme tespit etmişlerdir (86). TGF- β 3'ün yara iyileşmesini proliferatif faz başta olmak üzere tüm evreleri etkiliyor olması çalışmamızda kullanılmasının başlıca nedeni olmuştur.

Cox ve ark. (89) TGF- β 3'ün ratlarda yaptıkları çalışmada, yanıklarda ve insizyonel yaralarda epitelizeasyonu hızlandırdığını göstermişlerdir. Wu ve ark. (90) TGF- β 3'ün tavşanların kulaklarında yara iyileşmesini hızlandırdığını fakat skar dokusunda değişiklik olmadığını göstermişlerdir.

Loewen ve ark. (91) yaptıkları ratlarda krikoid kartilajı travmatize ederek yaptıkları çalışmada bir gruba 1μ TGF- β 3 ve bir gruba 0.18μ TGF- β 3 uygulayarak kontrol grubu ile

karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında sonuç olarak en iyi epitelizasyonu 1 μ TGF- β 3 verilen grupta gözlerken kontrol ve diğer grup arasında anlamlı bir değişiklik bulmamışlardır. İnflamasyon düzeyi bakımından üç grup arasında anlamlı bir fark bulmamışlardır. Çalışmamızda TGF- β 3'ün dozu literatürlere uygun olarak belirlenmiş ve 1 μ dozunda TGF- β 3 içeren yavaş salınım yapan preparatlar hazırlanmıştır. TGF- β 3 yavaş salınımlı preparat haline getirilmek için kitosan ile kombine hale getirildi. Çalışmamızda kitosanı tercih etmemizin nedeni farmasötik alanda kullanımının oldukça fazla olması, mikroküre, nanopartikül, mikrokapsül, film ve tablet formülasyonları gibi çeşitli dozaj şekillerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmasıdır. Ayrıca kitosanın biyomedikal alanda kullanımı, biyoparçalanabilir olması, toksik olmaması, vücut ile uyumlu bir yapıya sahip olması, hemostatik özelliğinin olması, yara iyileşmesini hızlandırıcı özelliği ve antimikrobiyal, antiviral ve hipokolesterolemik aktiviteye sahip olması da çalışmamızda baz madde olarak tercih etmemizin nedenleri olmuştur.

Çalışmamızda ratların trakealarına yapılan insizyon suture edildikten sonra bir gruba kitosan ile kombine edilerek yavaş salınımlı film tabaka haline getirilmiş 1 μ TGF- β 3 paratrakeal olarak yerleştirildi. Bir gruba trakeal insizyon kapatılarak insizyonun üzerini örtecek şekilde film tabaka haline getirilmiş kitosan paratrakeal olarak yerleştirildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Epitelizasyon ve inflamasyon bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamızda komplikasyon olarak gelişen apsenin TGF- β 3/ kitosan kombinasyonu ve kitosan grubunda gözlenirken kontrol grubunda hiç gözlenmemiş olması bu durumun kitosandan kaynaklandığını düşündürdü. Ancak daha önce kitosanla ilgili bildirilen bu şekilde bir komplikasyon olmadığından bu konu daha ileri araştırmalar yaparak incelenmelidir.

Çalışmamızdaki sonuçlar literatürler ile uyumlu değildir. Biz yara iyileşmesinde TGF- β 3'ü etkili bulmadık. Hipotezimizde yer alan kollajeni ve fibrozisi azaltıcı etkisini hava yolu yara iyileşmesinde göremedik. Ancak etkili olmadığını ispatlamak için bu apse gelişiminin araştırılması ve dokuda etken maddenin ne oranda bulunduğu daha ileri çalışmalarla ispatlanmalıdır. Kitosan nedeniyle oluşan abse bu çalışmada TGF- β 3'ün hedef dokuya penetrasyonunu engellemiş olabilir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre kitosan ile TGF β 3'ün kombine edilebilmesi için daha fazla üzerinde çalışılması gerektiği ve planlanacak çalışmalarda TGF β 3'ün doku konsantrasyonlarının ölçülerek yeterli konsantrasyonlara erişilip erişilmediği incelenmelidir.

11. ÖZET

Trakeal stenoz, son yıllarda artan entübasyon ve trakeotomi oranları sonrasında göğüs cerrahisi hekimlerinin karşılaştığı önemli problemlerden haline gelmiştir. Trakeal stenozda uygulanan tedavi seçeneğinde çeşitli yöntemler bulunmakta iken tedavi sonrasında karşılaşılan problemler nedeni ile yeni arayışlara yönelilmektedir. Çalışmamızda TGF-beta3/Kitosan kombinasyonunun skar ve fibrozis oluşumunu engellemedeki rolleri araştırıldı.

Çalışmamızda 30 adet “Wistar Albino” tipi rat kullanıldı. Tüm ratların 2 ve 5. trakeal halkalarının ön bölgesine 3 kıkırdağı içine alacak şekilde yaklaşık 0.5 cm’lik tam kat vertikal insizyon yapıldı. Trakeanın membranöz bölümü tüm ratlarda korundu. Trakeal insizyon suture edildi. A grubunda trakeal insizyon bölgesi sadece suture edildi ve kontrol grubu olarak değerlendirildi. B grubunda trakeal insizyon yapılan bölgeye baz madde olarak TGF-beta3’ü taşıyan ve yavaş salınım yapan kitosan film tabaka yerleştirildi. C grubunda suture edilen bölge üzerine paratrakeal olarak, kitosan içerisinde eritilerek oluşturulan yavaş salımlı film tabaka haline getirilmiş TGF-β3 preperatı yerleştirildi

Tüm gruplarındaki ratlar 30. Günde yüksek doz inhaler anestezi ile sakrifiye edildi. Bütün ratların larenksleri 6. trakeal halkanın alt, üstte tiroid kıkırdağın üst kenarından kesilerek çıkarıldı. Histopatolojik incelemede; epitelizasyon, fibroblast, anjiyogenez inflamasyon ve kollajen düzeyleri aynı histopatolog tarafından değerlendirildi.

Çalışmamızda TGF-beta3/kitosan kombinasyonu ile kontrol grubu arasında epitelizasyon, fibroblast, inflamasyon, anjiyogenez ve kollajen düzeyleri bakımından kontrol grubu ile fark saptanmadı. Literatür ile uyumlu olmayan bu sonucun kitason nedeniyle oluşan apseye bağlı olduğunu düşündük.

Anahtar kelimeler: trakeal stenoz, TGF-beta3/Kitosan kombinasyonu, kitosan

12. ABSTRACT

Tracheal stenosis constitutes one of the most challenging problems in thoracic surgery practice that a physician may face with, after accelerating tracheotomy and intubations of late years. Many treatment modalities have been in tracheal stenosis but new treatment alternatives have searched because of problems seen after treatment. The aim of the study was evaluate the role of TGF-beta3/chitosan combination on the development of fibrosis/ scar tissue formation.

Thirty "Wistar Albino" rat used in our study. Nearly 0.5 cm. vertical incision made from the anterior side between 2. and 5. tracheal rings including all tracheal compartments. Membranous trachea preserved. Tracheal incision is only sutured in group A and evaluated as control group. In group B tracheal incision is sutured and a chitosan based slow-release film coated substance placed on the incision line. In group C, tracheal incision is sutured and a chitosan- TGF- β 3 combination slow-release film coated substance placed on the incision line.

All rats sacrificed by high dose inhaler anesthesia on 30. day in all groups. The larynx of all rats excised by cutting between 6. tracheal ring's lower side and thyroid cartilage's upper side. Epitelisation, angiogenesis, inflammation fibroblast and collagen levels evaluated by the same histopatholog at th histopathological examination.

In our study, there was no difference between the groups by epitelisation, angiogenesis, inflammation fibroblast and collagen levels. This result is not consistent to literature and according to us it is because of the abcess which is due to chitosan.

Keywords: tracheal stenosis, TGF-beta3/Chitosan combination, chitosan

13. KAYNAKLAR

1. Correa AJ, Reinisch L, Sanders DL, Haung S, Deriso W, Duncavage JA, Garrett CG. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin-C in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108:1053-60.
2. Ertugrul EE, Cincik H, Dogru S, Cekin E, Berber U, Gungor A, Poyrazoglu IE. Effects of halofuginone on fibrosis formation secondary to experimentally induced subglottic trauma. *Laryngoscope* 2007;117:299-302.
3. Eliashar R, Eliachar I, Esclamado R, Gramlich T, Strome M. Can topical mitomycin prevent laryngotracheal stenosis? *Laryngoscope* 1999; 109: 1594-1600.
4. Brichet A, Verkindre C, Dupont J ve ark. Multidisciplinary approach to management of postintubation tracheal stenoses. *Eur Respir J* 1999; 13: 888-893.
5. Grillo HC, Donahue DM: Post intubation tracheal stenosis. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1996; 8: 370-380.
6. Hawkins DB: Pathogenesis of subglottic stenosis from endotracheal intubation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987; 96: 116 117.
7. Bennett NT. Growth factors and wound healing :Biochemical properties of growth factors and theirs receptors. *Am J Surg.* 1993; 165-728
8. Flanders CK, Burmester JK. Medical Applications of Transforming Growth Factor- β . *Clinical Medicine and Research.* 2003; 1: 13-20
9. Liu W, Wang DR, Cao YL. TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2004; 4(1): 123-36
10. Kirsner RS, Bogensberger G. The Normal Process of Healing, Luther C. VKloth J, McCulloch M. In: *Wound Healing Alternatives in Management.* 3th ed. Edition, Philadelphia, F.A. Davis Company, 2002:3-33
11. Robson MC. Fetal wound healing Current perspectives. *Clin Plastic Surg* 2003; 30: 57-6
12. Grillo, HC., Mathisen, D.J.: *Disease of the Trachea and Bronchi Otolaryngology,* (Eds) Paparella, M., Shumrick, A.D., Gluckman, J.C., Meyerhoff W.L. Third Edition 1991. Chapter 35: 2385-2392.
13. Arjmand EM, Spector JG. Airway control and laryngotracheal stenosis. *Otorhinolaryngology.* (Eds) Ballenger JJ Snow JB, 1996;27:478-9.

14. Weber AL, Grillo H. Tracheal lesions-assessment by conventional films, CT and MRI. *Israel Journal of Medical Science* 1992;28:233-40.
15. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth BH. The laboratory rat, Volume 1, Biology and Diseases.
16. Hebel R., Stromberg M.W.: Respiratory system. *Anatomy of the Laboratory Rat*. The Williams & Wilkins Company, 50-60, 1976.
17. McCaffrey TV. Management of laryngotracheal stenosis on the basis of site and severity. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* 1993;109: 468-73.
18. Arjmand EM, Spector JG. Airway control and laryngotracheal stenosis. *Otorhinolaryngology*. (Eds) Ballenger JJ Snow JB, 1996;27:478-9.
19. Aslan I, Ulubil A, Oysu Ç, Yazıcıoğlu E, Başerer N. Larengotrakeal stenozlarda topikal "mitomisin-C" uygulaması. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 39: 109-112, 2001.
20. Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycine. Effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110: 1-6.
21. Pata YS, Akbas Y, Unal M, Aydın O, Gorur K, Ozcan C, Polat G. Prevention of laryngotracheal stenosis with carnitine after tracheotomy: An experimental study on rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;67: 881-8.
22. Cincik H, Gungor A, Cakmak A, Omeroglu A, Poyrazoglu E, Yildirim S, Cekin E, Candan H. The effects of mitomycin C and 5-fluorouracil/triamcinolone on fibrosis/scar tissue formation secondary to subglottic trauma. *Am J Otolaryngol* 2005; 26: 45-50.
23. Delgado A, Pena-Garcia J, Marin J, Aguirre H. Tracheal reconstruction. *Rev. Laryngology Otolaryngology Rhinology* 1993; 114: 21-4.
24. Cotton RT. Management of subglottic stenosis. Andrew LJ, Ronald BK. *The Otolaryngologic Clinics of North America*. W.B. Saunders Company 2000;112-3.
25. Ward RF, Triglia JM. Airway growth after cricotracheal resection in a rabbit model and clinical application to the treatment of subglottic stenosis in children. *Laryngoscope* 2000; 110: 835-4
26. Jacob S, Bergman B, Nassiri M, Vincek V. Topical application of imiquimod 5% cream to keloids alters expression genes associated with apoptosis. *British Journal of Dermatology* 2003; 149 (Suppl. 66): 62-65
27. Prado A, Andrades P, Benitez S, et al. Scar management after breast surgery. Preliminary results of a prospective, randomized, and double-blind clinical study

28. Bulstrode N, Mudera V, Mc Grouther A. 5-Fluorouracil selectively inhibits collagen synthesis. *Plas Recon surg* 2005;116(1):209-21
29. Canter Hİ, Konas E, Bozdoğan Ö, et al. Effect of slow release 5-Fluorouracil on capsule formation around silicone breast implants: An experimental study with mice. *Aesthetic Plastic Surgery* 2007;31(6):674-9
30. Uppal RS, Khan U, Kakar S, Talas G, Chapman P, McGrouther AD. The effects of a single dose of 5-fluorouracil on keloid scars: a clinical trial of timed wound irrigation after extralesional excision. *Plast Reconstr Surg.* 2001;108(5):1218-24.
31. Khan U, Occleston NL, Khaw PT, McGrouther DA. Single exposures to 5-fluorouracil: a possible mode of targeted therapy to reduce contractile scarring in the injured tendon. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Feb;99(2):465-71.
32. Nanda S, Reddy BS. Intralesional 5-fluorouracil as a treatment modality of keloids. *Dermatol Surg* 2004;30:54 – 6.
33. Gupta S, Kalra A. Efficacy and safety of intralesional 5-fluorouracil in the treatment of keloids. *Dermatology* 2002;204:130- 2.
34. Kontochristopoulos G, Stefanaki C, Panagiotopoulos A, et al. Intralesional 5-fluorouracil in the treatment of keloids: an open clinical and histopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:474- 9.
35. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro- and antiangiogenic activities. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:47–54.
36. Asilian A, Darougheh A, Shariati F. New combination of triamcinolone, 5-Fluorouracil, and pulsed-dye laser for treatment of keloid and hypertrophic scars. *Dermatol Surg.* 2006 Jul;32(7):907-15.
37. Koepfli JB. An alkaloid with high antimalarial activity from *Dichroa febrifuga*. *J Am Chem Soc* 1947; 69:1837.
38. Koepfli JB, Brockman JA, Moffat J, Structure of febrifugine and isofebrifugine 1950. *J. Am. Chem. Soc.* 72:3323.
39. Pines M, Synder D, Yarkoni S, Nagler A. Halofuginone to treat fibrosis in Chronic graft versus host disease and scleroderma. *Biol Bl Marrow Transplant* 2003;9:417-25.
40. Nagler A, Katz A, Aingorn H, et al. Inhibition of glomerular mesangial cell proliferation and extracellular matrix deposition by halofuginone. *Kidney Int* 1997; 52: 1561–1569

41. Abramovitch R, Itzik A, Harel H, et al. Halofuginone inhibits angiogenesis and growth in implanted metastatic rat brain tumor model—an MRI study. *Neoplasia* 2004; 6: 480–489.
42. McGaha T, Koderer T, Phelps R, Spiera H, Pines M., Bona C. Effect of halofuginone on the development of tight skin (TSK) syndrome. *Autoimmunity* 2002;35: 277–282
43. McGaha TL, Phelps RG, Spiera H, Bona C. Halofuginone, an inhibitor of type-collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 118:461-470.
44. McGaha TL, Koderer T, Spiera H, Stan AC, Pines M, Bona C. Halofuginone inhibition of COL1A2 promoter activity via a c-Jun-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* 2002;46:2748-61.
45. Levi-Schaffer F, Nagler A, Slavin S, et al. Inhibition of collagen synthesis and changes in skin morphology in murine graft-versus-host disease and tight skin mice: Effect of halofuginone. *J Invest Dermatol* 1996;106:84-88.
46. Nagler A, Rivkind A, Raphael J, Schaffer L, Genina O, Lavelin I, Pines M. Halofuginone an Inhibitor of collagen type I synthesis- Prevents postoperative formation of abdominal adhesions. *Annals of Surgery* 1998; 227(4): 575-582
47. Chaubal M., Using chitosan as an excipient for oral drug delivery. <http://www.drugdeliverytech.com/cgi-bin/articles.cgi?idArticle=131>.
48. Peniche-Covas C., Alvarez L. W. ve Argüelles-Monal W. (1992). The adsorption of mercuric ions by chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 46, 1147-1150.
49. Peniche C., Argüelles-Monal W., Peniche H. ve Acosta N. (2003). Chitosan: An attractive polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*. 3, 511-520.
50. Hirano S., Hirochi K., Hayashi K., Mikami T. ve Tachibana H. (1991). Cosmetic and pharmaceutical use of chitin and chitosan. Gebelin ve diğ (Ed.) *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers* (s 95-104). NewYork: Plenum Press.
51. Kumbar S. G., Kulkarni A. R., Aminabhavari T. M. (2002). Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. *Journal of Microencapsulation*. 19(2), 173-180
52. Jameela S. R. ve Jayakrishnan A. (1995). Glutaraldehyde crosslinked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in the rat muscle. *Biomaterials*. 16, 769-775.

53. Ko J. A., Park H. J., Park Y. S., Hwang S. J. ve Park J. B. (2003). Chitosan microparticle preparation for controlled drug delivery by response surface methodology. *Journal of Microencapsulation*. 20(6), 791-797.
54. Saka O. M. (2003). Gen tedavisine yönelik DNA-kitosan nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ve in vitro değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
55. Eroğlu H., Sargon M. F. ve Öner L. (2007). Chitosan formulations for steroid delivery: Effect of formulation variables on in vitro characteristics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 33, 1-7.
56. Nunthanid J., Laungtana-anan M., Sriamornsak P., Limmatvapirat S., Puttipipatkachorn S., Lim L. Y. ve Khor E. (2004). Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. *Journal of Controlled Release*. 99, 15-26.
57. Arica B., Çalış S., Kaş H. S. ve Hincal A. A. (2002). Chitosan microspheres of ibuprofen: Evaluation and in vitro characterization. Muzzarelli R.A.A. ve Muzzarelli C. (Ed.) *Chitosan in pharmacy and chemistry* (s 71-76). Italy:Atec.
58. El-Gibaldy I. (2002). Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 249, 7-21.
59. Gurtner G. Woundhealing: Normal and abnormal; Grabb and Smith's Plastic Surgery. 6th edition. Lippincott-RavenPublishers, Philadelphia, 2007:15-22.
60. Baum C, Arpey C. Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events; *Dermatol Surg* 2005; 31(6):674-86.
61. Broughton G, Janis J, Attinger C. Wound Healing: An Overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2006;117 (7s):1-32.
62. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
63. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998;25:321-40.
64. Wener S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83,835-70.
65. Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov;281(5):L1257-63.

66. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.
67. Neely A, Clendening C, Gardner J, Greenhalgh D, Warden G. Gelatinase activity in keloids and fibroblasts. *Wound repair and regeneration* 1999; 7(3):166-171.
68. Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE et al. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292:988-94.
69. Uchida G, Yoshimura K, Kitano Y et al. Tretinoin reverses upregulation of matrix metalloproteinase-13 in human keloid-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* 2003; 12 (Suppl. 2):35-42.
70. Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972;51:2009-23.
71. Buck M, Houglum K, Chojkier M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha 1 (I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol* 1996;149:195-204.
72. Çelik O: Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi, 2. Cilt, Atlas Tıp Kitapevi 2007;1039-48.
73. Liman ST, Kara CO, Bir F, Yildirim B, Topcu S, Sahin B. The effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in tracheal surgery. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005 Oct;69(10):1327-31.
74. Hirshoren N, Eliashar R. Wound-healing modulation in upper airway stenosis-Myths and facts. *Head Neck* 2009;31:111-26.
75. Sreeram AB, Corey JP. Congenital angiotensin-converting enzyme deficiency presenting as recurrent angioedema of upper airway in adult life. *Head Neck Surg* 1995;112:421-3.
76. Dixon HS. Allergy and laryngeal disease. *Otolaryngology North Am* 1992;25:239-50.
77. Campbell BH, Dennison BF, Durkin GE, Strigenz MA, Toohill RJ. Early and late dilation for acquired subglottic stenosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 95:566-73.
78. O'Neill JA Jr. Experience with iatrogenic laryngeal and tracheal stenoses. *J Pediatr Surg* 1984;19:235-8.
79. Liebmann JM, Ritch R, Marmor M, Nunez J, Wolner B. Initial 5-fluorouracil trabeculectomy in uncomplicated glaucoma. *Ophthalmology* 1991;98:1036-41.

80. Smith S, D'Amore PA, Dreyer EB. Comparative toxicity of mitomycin-C and 5-fluorouracil in vitro. *Am J Ophthalmol* 1994;118:332-7.
81. Theodore C, Shaun SK, James K: Effects of mitomycin-C on normal dermal fibroblasts. *Laryngoscope* 2006;116:514-7.
82. Ocleston NL, Daniels JT, Tarnuzzer RW. Single exposures to antiproliferatives: long-term effects on ocular fibroblasts wound-healing behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1998-2007.
83. Oh SY, Park DW, Chang BL. The effect of mitomycin-C on the healing process in rabbit extraocular muscle surgery. *Ophthalm Surg Lasers* 1999;30:305-9.
84. Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM, Shapshay SM: Sinus surgery: Does mitomycin C reduce stenosis? *Laryngoscope* 1998;108:883-6.
85. Choong CK, Haddad FJ, Gee EY, Cooper JD. Feasibility and safety of airway bypass stent placement and influence of topical mitomycin C on stent patency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:632-8.
86. Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ. Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat tissue wound reduces scarring. *J Cell Sci* 1995;108:985-1002.
87. Hirshberg J, Coleman J, Marchant B, Rees RS. TGF-beta3 in the treatment of pressure ulcers: a preliminary report. *Adv Skin Wound Care*. 2001 Mar-Apr;14(2):91-5.
88. Squier CA, Kremer MJ, Bruskin A, Rose A, Haley JD. Oral mucosal permeability and stability of transforming growth factor beta-3 in vitro. *Pharm Res*. 1999 Oct;16(10):1557-63
89. Cox DA, McMaster GK, Burge R, Kunz S, Vaxelaire J, O'Reilly T, Schupp JPH. Experimental wound healing studies with TGF-b3. *Wound Rep Reg* 1994;2:208. [Abstract]
90. Wu L, Siddiqui A, Morris DE, Cox DA, Roth SI, Mustoe TA. Transforming growth factor beta 3 (TGF-B3) accelerates wound healing without alteration of scar prominence. Histologic and competitive reverse-transcription-polymerase chain reaction studies. *Arch Surgery* 1997;132:753-60.
91. Loewen MS, Walner DL, Caldarelli DD. Improved airway healing using transforming growth factor beta-3 in a rabbit model. *Wound Repair Regen*. 2001 Jan-Feb;9(1):44-9.