

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA (PRP) ve DEKSAMETAZON
ENJEKSİYONUNUN VOKAL KORD HASARI SONRASI SKAR
OLUŞUMUNA ETKİLERİNİN TAVŞANLARDA
KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Görkem DÜNDAR

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA (PRP) ve DEKSAMETAZON
ENJEKSİYONUNUN VOKAL KORD HASARI SONRASI SKAR
OLUŞUMUNA ETKİLERİNİN TAVŞANLARDA
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Görkem DÜNDAR

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Önder GÜNAYDIN

ANKARA
2021

TEŞEKKÜR

Başta Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. T. Metin ÖNERCİ olmak üzere uzmanlık eğitimi boyunca emeği geçen ve desteğini esirgemeyen öğretim üyesi tüm hocalarıma,

Tez danışmanım olan ve tez hazırlanması ve yazım sürecinde emeklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Önder GÜNAYDIN'A,

5 yıl boyunca beraber çalıştığımız tüm Kulak Burun Boğaz Baş ve Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı ailesi çalışanlarına ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Çalışmanın histopatolojik değerlendirmesini yapan ve çalışma verilerini elde etmemizi sağlayan ve yoğun mesaieleri içerisinde bana zaman ayırıp, yol gösteren Sayın Prof. Dr. Yeşim Gaye Güler TEZEL'E, Uzm. Dr. Olcay KURTULAN'A,

Küçük bir çocukken, dürüstlüğünü ve mertliğini örnek almaya başladığım, yaşam yolculuğunda her zaman yol gösteren harika bir baba ve arkadaş olmayı başaran babam Ecz. Yunus DÜNDAR'A, en zor zamanlarımda karşılıksız sevgisi ve sıcaklığıyla bana kol kanat geren ve beni büyüten annem Hülya DÜNDAR'A ve kendi çizdiği yolda yapmak istediklerini tek tek yapmayı başaran sevgili ablam Gizem DÜNDAR'A,

Ufkumun gelişmesine yardımcı olan, tıp fakültesi yıllarımda büyük desteklerini ve yol göstericiliğini esirgemeyen, sorgulamayı ve araştırma sevgisini kazandıran, kendi yoğun temposuna rağmen sabahın erken saatlerinde bizleri kırmayarak tıbbi ve sanatsal bilgi birikimimizin artmasını sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalından Prof. Dr. Sadık KILIÇTURGAY'A

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Dündar G., Trombosit Zengin Plazma (PRP) ve Dekسامetazon Enjeksiyonunun Vokal Kord Hasarı Sonrası Skar Oluşumuna Etkilerinin Tavşanlarda Karşılaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021.

Vokal kord skarının tedavisi zorlu ve maliyetlidir. Vokal kord hasarı oluşturulan hayvan deneylerinde pek çok molekülün ve biyomateryalin yara iyileşmesine etkileri araştırılmaktadır. Trombosit Zengin Plazma (PRP), farklı klinik disiplinlerde rejenerasyonu ve iyileşmeyi arttırıcı etkileri nedeniyle son yıllarda oldukça popüler olarak kullanılmakla birlikte; vokal kord hasarı sonrası iyileşme sürecine etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Vokal kord hasarı sonrası skar oluşumunun engellenmesinde deksametazon enjeksiyonu klinik pratikte sıkça kullanılmasına rağmen elde edilen sonuçlar tartışmalıdır. Bu çalışmada, vokal kord hasarı sonrasında skar oluşumunun engellenmesinde PRP enjeksiyonunun; deksametazon enjeksiyonundan histopatolojik olarak daha fazla katkı yapıp yapmayacağını araştırmak üzere bir hayvan deneyi planlandı. Toplam 12 adet Yeni Zelanda tavşanının sağ ve sol vokal korduna elektrokoterle hasar oluşturuldu. Sağ vokal korda tavşanların kendi kanlarından elde edilen PRP, sol vokal korda deksametazon enjeksiyonu yapıldı. 8 hafta sonra deney hayvanlarına ötenazi yapıldı ve histopatolojik değerlendirmede enflamatuar hücre infiltrasyonu, vaskülarizasyon, kolajen, elastin, hiyalüronik asit seviyeleri karşılaştırıldı. Elde edilen histopatolojik verilerin istatistiksel karşılaştırılmasında; plazma hücresi infiltrasyonu, vaskülarizasyon, ödem, fibrozis içerisinde vaskülarizasyon parametrelerinde PRP grubu lehine istatistiksel anlamlı sonuçlar alındı. PRP ve deksametazon enjeksiyonu sonrasında yabancı cisim reaksiyonu ve nekroz gibi komplikasyonlar izlenmedi. Vokal kord skar iyileşmesinde kritik öneme sahip kolajen ve elastin molekülleri arasında bulunan fark; PRP lehine daha olumlu olsada istatistiksel değerlendirmede anlamlı sonuç bulunmadı. *Sonuç:* Vokal kord hasarı oluşturulan tavşanlarda PRP enjeksiyonu, yara iyileşmesi fazında gerçekleşen reaksiyonları düzenleyerek skar oluşumunun engellenmesinde en az deksametazon kadar faydalı bir moleküldür. Yapılan karşılaştırmada vokal kordun hasar almış bölgelerinde belli dozlarda sağlıklı doku oluşumuna olumlu etki

edebileceğine dair histopatolojik sonuçlar vardır. Vokal kord hasarı sonrası PRP enjeksiyonu yapılması deksametazondan daha fazla anti-enflamatuar yanıt elde edilmesini sağlamıştır. Ancak bu etki, vokal kord skar oluşumunda rol oynayan başlıca moleküller olan kolajen ve elastin seviyelerinde beklenildiği kadar büyük bir etki yaratmamıştır. Vokal kord hasarı sonrası PRP'nin farklı dozlarda ve zamanlarda uygulandığı ve vokal kord hasar oluşumu fazında görev alan farklı moleküllere olan etkilerinin de sorgulandığı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Vokal kord skarı, PRP enjeksiyonu, deksametazon enjeksiyonu

ABSTRACT

Dündar G., Comparison of the Effects of Platelet Rich Plasma (PRP) and Dexamethasone Injection on Scar Formation After Vocal Fold Injury in Rabbits. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Otolaryngology, Thesis, Ankara, 2021.

Treatment of vocal fold scar is difficult and costly. The effects of many molecules and biomaterials on wound healing are investigated in animal experiments in which vocal fold damage is induced. Although Platelet Rich Plasma (PRP) has been used in different clinical disciplines due to its regeneration and enhancing the healing effects in recent years, its effects on the healing process after vocal fold injury are not fully identified yet. Although dexamethasone injection is frequently used in clinical practice to prevent scar formation after vocal fold injury, the results obtained are controversial. In this study, an animal experiment was planned to investigate whether PRP injection would make more histopathological contribution to the prevention of scar formation after vocal fold injury, as compared to dexamethasone injection. Electrocautery was applied to damage the right and left vocal folds of 12 New Zealand rabbits. PRP obtained from the rabbits' own blood was injected into the right vocal fold, and dexamethasone was injected into the left vocal fold. After 8 weeks, the experimental animals were euthanized, and the levels of inflammatory cell infiltration, vascularization, collagen, elastin, and hyaluronic acid were compared in histopathological evaluation. In statistical comparison of histopathological data obtained; in terms of plasma cell infiltration, vascularization, edema, and vascularization parameters in fibrosis, statistically significant results were obtained in favor of the PRP group. Complications such as foreign body reaction and necrosis were not observed after PRP and dexamethasone injection. Although the difference between collagen and elastin molecules, which are critical in vocal fold scar healing, was more positive in favor of PRP, no statistically significant result was revealed in the statistical evaluation. Conclusion: PRP injection in rabbits with vocal fold damage is at least as useful as dexamethasone injection in preventing scar formation by regulating the reactions taking place during the wound healing phase. Although it does not show a distinct advantage in the comparison, there are histopathological results

showing that certain doses may positively affect the formation of healthy tissue in damaged areas of the vocal fold. PRP injection after vocal fold injury provided more anti-inflammatory response from dexamethasone. However, this effect did not have as great an effect as expected on the levels of collagen and elastin, which are the main molecules involved in vocal fold scar formation. There is a need for new studies in which PRP is applied at different doses and times after vocal fold injury, and its effects on different molecules involved in the vocal fold injury phase are questioned.

Keywords: Vocal fold scar, PRP injection, dexamethasone injection

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Embriyoloji	3
2.1.1. Larinks	3
2.1.2. Trakea ve Akciğerler	4
2.2. Larinks Anatomisi	5
2.2.1. Laringeal Kartilajlar	5
2.2.2. Elastik Dokular	8
2.2.3. Laringeal Kaslar	9
2.2.4. İnternal Anatomi	12
2.2.5. Larinksin Vasküler Yapıları ve Nöronal Uyarılması	14
2.3. Vokal Kord Yapısı	16
2.4. Tavşan Larinks Anatomisi	17
2.5. Vokal Kordda Skar Oluşumu ve Yara İyileşmesi	18
2.6. Platelet Rich Plasma (PRP)	23
2.7. Kortikosteroidler	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Cerrahi İşlem Tekniği	28
3.2. Cerrahi Sonrası Dönem	31
3.2.1. Histopatolojik Değerlendirme	33
3.2.2. İstatistiksel Değerlendirme	34

4. BULGULAR	36
4.1. Histopatolojik Bulgular	36
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	55
7. KAYNAKÇA	56

KISALTMALAR

AKKH	: Adipoz kökenli kök hücre
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
H&E	: Hematoksilen-eozin
HA	: Hiyalüronik asit
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	: İnterlökin 1
mA	: Miliamper
MKKH	: Mezenkimal kökenli kök hücre
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PRP	: Trombosit zengin plazma
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
TNF	: Tümör nekroz faktör
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
3.1. Tavşan Aurikuler venden PRP için kan alınması	29
3.2. Tavşan vokal kordunun sağlıklı görüntüsü	30
3.3. Tavşan vokal korduna 0 derece endoskop altında hasar oluşumu	30
3.4. Tavşan vokal kordunun hasar oluşumundan sonraki görüntüsü	31
3.5. Tavşan vokal kordu hasar oluşumundan sonraki PRP ve deksametazon enjeksiyonu görüntüsü	31
4.1. H&E boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) plazma hücresi infiltrasyonu görüntüsü	38
4.2. H&E boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) lenfoid agregat görüntüsü	38
4.3. H&E boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) vaskülarizasyon açısından karşılaştırılması	38
4.4. Elastin-von-gieson boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) elastin açısından görüntüsü	39
4.5. Masson trikrom boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) kolajen yerleşimi açısından görüntüsü	39
4.6. Alcien blue boyama (a) deksametazon grubu ve PRP grubunun (b) HA yerleşimi açısından görüntüsü	39

Şekil 3.6. Ötenazi sonrası larenjektomi görüntüsü

Şekil 3.7. Ötenazi sonrası larenjektomi yapılan larenks spesmenlerinin vertikal görüntüsü

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Trombositlerin içinde bulunan büyüme faktörleri ve görevleri	25
3.1. Deney grupları	28
4.1. PRP ve deksametazon gruplarının vaskülarizasyon ve plazma hücre sayısı açısından karşılaştırılması	36
4.2. PRP ve deksametazon gruplarının karşılaştırılması	36

1. GİRİŞ

Vokal kord skarı oluşumu, ses kalitesinin bozulmasına, ses kısıklığına ve afoniye neden olarak hayat kalitesinin azalmasına neden olur. Laringoloji klinik pratiğinde halen çözüm bekleyen bu sorun için standart bir tedavi yaklaşımı yoktur. Etiyolojide enflamasyon, travma, radyoterapinin neden olduğu etkiler, vokal kord benign veya malign hastalıkları için yapılan cerrahilere bağlı gelişen defektler yer almaktadır (1). Farklı şekillerde oluşan travmalar sonucunda fibroblastlar yara yerine göç eder ve granülasyon dokusu oluşmaya başlar. Aşırı granülasyon oluşumu yara iyileşmesini geciktirerek skar oluşumuna neden olur. Oluşan bu skar dokusu, vibratuar yapılarda değişikliklere ve vokal kordun mukozal dalgalanma hareketinde azalmaya yol açarak ses bozukluğuna neden olur (2).

Skarlı vokal kord lamina propriasıyla yapılan histolojik çalışmalarda, kolajen ve elastin moleküllerinin düzensiz yerleşimine dair bulgulara rastlanılmıştır. Buna ek olarak, skarlı vokal kordun lamina propriasının süperfisiyel tabakasında, Hiyalüronik Asit (HA) seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir (3). Ekstraselüler Matriks (ECM) bileşenleri dağılımındaki bu dengesizliğin vokal kord mukozal dalga hareketinin bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Skar oluşumunu engellemek için iki farklı yaklaşım vardır (4). Birincisi dokuya uygulanan hasarı minimale indirmek iken, diğeri ise yara iyileşmesi fazında oluşan reaksiyonu azaltmaktır. Doku hasarını minimale indirmek için uygulanan mikroflep teknik, fonocerrahi esnasında kullanılan konservatif yöntemlerden birisidir. Yara iyileşme fazında ortaya çıkan reaksiyonu engellemek için kullanılan yöntemlerde ise kortikosteroid enjeksiyonu günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmalarda kortikosteroid enjeksiyonunun kolajen depozitlerini azalttığı gösterilmiş, ancak vokal kordun fonksiyonel kapasitesi için yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen veriler tartışmalı bulunmuştur (5). Literatürde bildirilen farklı sonuçların olması, klinik pratikte hala önemli bir sorun oluşturan skar oluşumunun engellenmesi üzerine yapılan çalışmaları popüler bir tartışma konusu yapmıştır. Vokal kord skar oluşumunu engellemeye yönelik yara iyileşmesi fazında oluşan reaksiyonları etkileyen maddelere; Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), doku iskeleti

uygulamaları, Adipoz kökenli kök hücre (AKKH), Mezenkimal kökenli kök hücre (MKKH), Transforming Growth faktör-B (TGF-B), Mitomisin-C örnek verilebilir (6-8). Birbirinden farklı etki basamakları olan maddelerle yapılan vokal kord skar oluşumu çalışmalarında bu maddelerin olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak; yüksek maliyet, enfeksiyon riski, immün reaksiyon, yabancı cisim reaksiyonu oluşturabilmesi bu maddelerin klinik pratikte kullanımını tartışmalı kılmaktadır. Yukarıda bahsedilen problemlerden dolayı maliyeti düşük, kolay elde edilebilen, hasta için güvenli ve yara iyileşme reaksiyonunu en aza indirecek farklı stratejiler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Platelet Rich Plasma (Trombosit zengin plazma - PRP), hastaların kendi kanlarından santrifüjle elde edilen maliyeti düşük ve kolay elde edilebilir özelliğinden dolayı farklı klinik disiplinlerde sıklıkla kullanılmaktadır (9). Trombositlerin içerisinde yer alan birçok büyüme faktörünün konsantre olarak elde edilmesi prensibine dayanan felsefesiyle; plastik cerrahi, ortopedik cerrahi, dermato-kozmetik uygulamalar, beyin cerrahi gibi birçok alanda iyileştirici etkilerinden yararlanılmaktadır (10). Cilt hasarı sonrası yara iyileşmesinde, osteoartritte ve kozmetik alanda olumlu etkileri gösterilmiş olan PRP'nin kulak burun boğaz alanında vokal kord hasarı sonrası iyileşme sürecine olumlu etkileri gösterilmiştir (11).

Laringoloji pratiğinde skar oluşumunun engellenmesinde sıklıkla başvuru alan kortikosteroid enjeksiyonu ile kullanımı deneysel pratikte kalan PRP'nin vokal kord üzerindeki iyileştirici etkilerini karşılaştıran çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda vokal kord hasarını takiben PRP enjeksiyonu yapılması, vokal kord skar oluşumunda en az kortikosteroid enjeksiyonu kadar iyi histopatolojik sonuçların elde edilmesini sağlar hipotezinden hareketle deneyler kurgulanmıştır. Vokal kord mukoza hasarı oluşturulan tavşanlarda PRP ve kortikosteroid enjeksiyonlarının skar oluşumuna etkilerinin rolü histopatolojik olarak araştırılmıştır. Vokal kord hastalıklarına bağlı gelişen skar formasyonunun engellenmesinde klinik pratiğe taşınabilecek maliyeti düşük, kolay elde edilebilen, immün ve yabancı cisim reaksiyonu oluşturmayan yeni bir materyal kazanılması düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyoloji

Larinks, trakea ve akciğerler embriyolojik gelişimin dördüncü haftasında oluşmaya başlarlar. Laringotrakeal divertikül olarak da bilinen respiratuar divertikül, dördüncü brankiyal arkın hemen kaudalinde ön barsak lümeninin ventral duvarında belirmeye başlar. Bu divertikül yüzeyi önbarsak endoderminden köken alır ve larinks, trakea ve akciğerlerin epitelyal yüzeylerinin ve bezlerinin oluşumunu sağlar. Divertikül uzayarak, alt solunum organlarının kartilajinöz ve musküler yapılarını oluşturacak olan splanknik mezenkimin oluşmasını sağlar. Divertikülün kaudal uzantısı dördüncü hafta sonunda dilate olmaya başlayarak, primordial akciğer tomurcuklarının ve bronkopulmoner tomurcukların oluşmasını sağlar.

2.1.1. Larinks

Yukarıda belirtildiği üzere, larinksin epitelyal yüzeyi endodermden köken alır. Laringeal kartilajlar dördüncü ve altıncı brankiyal arklardaki mezenkimal nöral krest elemanlarının bileşimi sonucu oluşurlar. Epiglot, kuneiform ve kornikulat kartilajlar elastik kartilaj iken tiroid, krikoid ve aritenoid kartilajlar hyalin kartilajlardır. Krikoid kartilaj, dorsal laminaya doğru ilerleyen ventral arktaki tek bir merkezden bilateral olarak kıkırdaklaşmaya başlar. Her bir aritenoid kıkırdak tek bir merkezden kıkırdaklaşır ve her bir tiroid ala iki kıkırdaklaşma merkezinden oluşur. Epiglot üçüncü ve dördüncü brankiyal arkların ventral uçlarındaki mezenkimin proliferasyonu ile oluşan hipobrankiyal eminensten köken alır.

Krikotiroid kas, dördüncü brankiyal arkta köken aldığından superior laringeal sinir tarafından innerve edilir. Öteki intrinsek laringeal kaslar altıncı brankiyal arkta köken aldıklarından rekürren laringeal sinir tarafından innerve edilirler.

Solunumsal divertikülün merkezinde yer alan primitif farengeal tabaka glottisi meydana getirir. Primitif farengeal tabakanın dördüncü brankiyal poştan meydana gelen farengeal tabakadan ayrılmasıyla, larinksin supraglottik parçasını oluşturacak

önbarsak parçası gelişir. Larinksin infraglottik parçası solunumsal divertikülün sefalik yüzünden gelişir. İleriki haftalarda ön barsak ve solunumsal divertikülün ilerlemesiyle özefagus uzayacak ve infraglottis trakeanın gelişmesiyle karinadan ayrılacaktır.

Altıncı haftadan itibaren gelişmekte olan larinksin ventral parçasındaki mezenkim hızla proliferasyon olarak lümen obliterasyonu ve epitelyal laminanın oluşumunu sağlar. Aritenoid kabartıları median farengeal tabakadan gelişerek oluşmakta olan epiglot ile aritenoid kabartıları arasındaki T şekilli görünümü laringeal girişte oluşturmaya başlar. Epitelyal lamina ventralden dorsale olacak şekilde büyümeye devam eder ve daralmış farengoepiglottik duktus haricinde ilkel laringofarenksi hemen hemen oblitere eder. Ayrıca aritenoid kabartılar ve epiglot arasında laringeal çekum ortaya çıkar ve glottis ventralindeki epitelyal laminaya ilerler.

Gelişimin onuncu haftasında, epitelyal lamina laringeal çekumla ventral olarak bağlanarak dorsal farengeal duktusa dorsoventral yönde rekanalize olmaya başlar ve süreç tamamlandığında supra ve infraglottik bölgeler bağlanmış olur. Rekanalizasyon sürecinde aynı zamanda laringeal ventriküllerde laringeal çekum kaudale doğru poşlaşma gösterir ve bunun alt dudaklarından vokal kordlar gelişir. Rekanalizasyon sürecinin kesintiye uğramasının konjenital laringeal weblerin ve atrezilerin oluşmasından sorumlu olduğuna inanılmaktadır.

İlerleyen fetal dönemlerde kartilajinöz elemanlar gelişmeye devam edecektir. Doğum sırasında larinks erişkindeki beşinci servikal vertebra seviyesinden daha yüksek bir pozisyonda, ikinci ya da üçüncü servikal vertebra düzeyindedir. Yaşamın ilk birkaç yılında larinks büyümesi hızlanacak epiglot matür halini alacaktır. Larinksin fizyolojik görevlerinde karmaşık işlevlerini yerine getirmesi için gerekli olan hiyoid kemikte büyümeye ve gelişmeye devam etmektedir.

2.1.2. Trakea ve Akciğerler

Larinks kaudalindeki solunumsal divertikül etrafındaki endodermden trakea ve akciğerlerin epitel ve bezleri gelişir. Trakeal kartilajlar divertikülü saran mezenkimden

gelişirler. Gelişimin dördüncü haftası ve bronkopulmoner tomurcukların oluşumundan sonra dışa poşlaşma ilerler ve primordiyal plevral kavitelere doğru genişler. Beşinci haftada sağ ve sol bronşlar gelişir. Yedinci haftada bu oluşumlar sekonder ve tersiyer bronş alt gruplarına ayrılacaktır.

2.2. Larinks Anatomisi

2.2.1. Laringeal Kartilajlar

Tiroid Kartilaj

Tiroid kartilaj kalkan şeklinde bir yapıdır ve larinksin iç anatomisini koruma görevi görür. Larinksin en geniş kartilajıdır ve iki kanat ya da laminadan oluşur. Laminalar orta hatta birleşir ve posteriora doğru açılır. Erkeklerde yaklaşık 90 derece açıyla birleşerek laringeal çıkıntı ya da Âdem elmasını oluşturur. Kadınlarda bu çıkıntının olmamasının nedeni 120 derece gibi daha geniş bir açılanmanın mevcut olmasıdır. Süperiorde laminaların birleşmesi eksiktir ve bu kısım tiroid çentiğini oluşturur. Posteriorde her bir laminanın süperior ve inferior boynuzları vardır. İnférieur boynuz krikoid kartilaj ile faset eklem yaparak krikotrioid eklemi oluşturur. Bu sinovyal bir eklemdir ve krikoid kartilajın rotasyon yapmasına izin verir. Bu rotasyon vokal kordlar üzerindeki gerilimin değiştirilebilmesini mümkün kılar. Süperior boynuz lateral tirohiyoid ligaman yoluyla hiyoid kemiğin büyük boynuzuna bağlanır. Bu ligaman bazen küçük kartilajlar içerir.

Median tirohiyoid ligaman ve her iki yandaki lateral tirohiyoid ligamanlar tirohiyoid membranın yoğunlaşması sonucu meydana gelir. Bu yapılar hiyoid kemiği tiroid kartilaja bağlar. Süperior boynuzun tiroid kartilaj alasına bağlantı yerinde protüberans olarak bilinen süperior tüberkül yer alır.

Bu tüberkülün yaklaşık 1 cm anterior ve süperiorunda larinksin supraglottik parçasını besleyen süperior laringeal arter, süperior laringeal sinirin internal dalı ve ilgili lenfatikler membranı delerek içeri girerler. Bu noktada internal dala transkütanöz olarak anestezi uygulanabilir. Süperior tüberkülden inferior tüberküle oblik olarak

ilerlerken (tiroid kartilajın inferior kenarı boyunca) oluşan çıkıntı oblik çizgi olarak bilinir ve bu tirohiyoid, sternotiroid ve inferior konstrüktör kaslarının bağlantı noktasıdır.

İç laringeal anatominin yüzey anatomisiyle olan ilişkisi önemlidir. En önemlisi tiroid kartilaj ile ilişkili olan gerçek vokal kordlar seviyesindedir. Bu ilişkinin bilinmesi supraglottik larinjektomi ve fonocerrahi (tiroplasti tip 1) yapılırken gereklidir. Tiroid çıkıntudan tiroid kartilajın inferior kenarına olan orta hat vertikal mesafe erkeklerde 20-47 mm ve kadınlarda 15-38 mm arasındadır. Anterior komissür bu noktaların ortasında yer alır. Kordların posterior uzantısı oblik çizginin orta üçte birlik kısmında yer alır.

Tiroid kartilaj, anterior komissür iç yüzeyi haricinde kalın bir perikondrium tabakası ile kaplanmıştır. Bu noktada laringeal katlantıların iskeletini oluşturan beş ligaman bulunur. Bunlar süperiordan inferiora doğru median tiroepiglottik ligaman, bilateral vestibüler ligamanlar ve bilateral vokal ligamanlardır.

Bu ligamanların bağlantıları iç perikondriumu delerek Broyle ligamanını oluşturur. Bu ligaman kan damarları ve lenfatikleri içerir ve laringeal neoplazmların yayılmasını önleyici önemli bir bariyer oluşturur.

Krikoid Kartilaj

Krikoid kartilaj tam bir halka oluşturur. Havayolunu çepeçevre saran larinks işlevine en fazla katkıda bulunan destekleyici yapıdır. Klasik olarak mühür yüzüğü şekilli olarak tanımlanır. Ön arkı 3-7 mm, arka laminası ise 20-30 mm yüksekliğindedir. Alt kenar hemen hemen horizontaldır ve krikotrakeal ligaman ile trakeal kartilaja bağlanır.

Krikoidin arka yüzeyinde orta vertikal çıkıntı ile ayrılmış olan posterior krikoaritenoid kaslar yer alır. Bunlar vokal kordlara abdüksiyon yaptıran tek kaslardır. Bu orta hat vertikal çıkıntısına özefagusun iki kas fasikülü tutunmaktadır.

Krikoidin arka laminasının üst yüzeyinde aritenoid kartilajlar yerleşmiştir. Krikoid lamina arkadan öne doğru ilerledikçe ön arkı meydana getirmek için aşağıya doğru dik bir eğim oluşturur. Orta hatta arkın üst parçası ile tiroid kartilajın alt kenarı arasında krikotiroid membran yer alır. Bu yapı acil krikotirotomi yapılırken insize edilmelidir.

Aritenoid Kartilajlar

Aritenoidler, krikoid kartilajın arka üst parçasıyla eklem yapan bir çift kartilajdır. Bu kartilajların ve ilişkisinde bulunan vokal foldların hareketi özellikler içerir ve larinksin karmaşık işlevlerindedir. Her bir aritenoid taban, apeks ve üçüncü yüzeyi içeren piramidal şekile sahiptir. Aritenoid tabanında artiküler yüzey oluşturan müsküler ve vokal çıkıntılar bulunur. Bu krikoaritenoid eklem karmaşık hareketler yapabilen sinovyal bir eklemdir. Bu eklemin en önemli hareketi uzun eksen çevresinde kartilajın sallanma hareketidir. Lateraldeki taban geniş bir musküler çıkıntı oluşturur ve anteriordaki vokal çıkıntı ise daha incedir. Anterolateral yüzey tiroaritenoid veya vokalis kasları olarakta bilinen vestibüler ligamanların tutunduğu kısımlardır. Posterior yüzeye kaslar tutunur ve medial yüzeye de posterior krikoaritenoid ligaman tutunmaktadır. Aritenoid apeksinde ise kornikulat kartilaj yerleşmiştir.

Kornikulat ve Kuneiform Kartilajlar

Kornikulat ve kuneiform kartilajlar küçük, çift fibroelastik kartilajlardır. Kornikulat ya da Santorini kartilajı aritenoid kartilajın apeksinde yerleşmiştir. Kuneiform ya da Wrisberg kartilajı eğer mevcutsa kornikulat kartilajların lateralinde bulunur ve ariepiglotik katlantıda gömülüdür. Her ne kadar bazıları bu kartilajların eser olarak bulunduğunu söylesede, ariepiglotik katlantının rijiditesini arttırıyor gibi görünmektedir. Bu rijidite bu katlantıların önemli siper fonksiyonunu güçlendirmekte ve çiğnenmiş olan lokmanın başka yöne gitmesini önleyerek larinks lateralinde priform sinüse doğru kaymasını sağlamaktadır.

Epiglot

Esas fonksiyonu çiğnenmiş lokmanın laringeal aditusa girişini engellemek olan yaprak şekilli elastik fibrokartilajdır. Çiğneme sırasında larinks anterosüperior olarak yükselir. Bu hareket sonucunda epiglot dil köküne doğru itilerek laringeal aditusun üzerinde posteriora doğru yer değiştirir. Epiglotun iki anterior bağlantısı vardır. Süperiorda hyoepiglotik ligamanla hiyoid kemiğe bağlanmıştır. İnferior kökünde ya da petiolusta tiroepiglotik ligamanla anterior komissürün hemen üzerinde tiroid kartilajın iç yüzüne bağlanmıştır. Epiglot kartilaj yüzeyinde çok sayıda çukurcuk ve mukoza bez bulunur. Bu çukurluklar kanserin epiglotun bir yüzeyinden diğerine geçmesine potansiyel olanak verir.

Epiglot, suprahiyoid ve infrahiyoid parçalara ayrılabilir. Suprahiyoid parça hem laringeal hemde lingual yüzeylerde serbesttir. Laringeal mukozal yüzeyi lingual yüzeyinden daha yapışkandır. Laringeal yüzey mukozasından dil köküne doğru geri katlanması sonucu üç katlantı meydana gelir: iki lateral glossoepiglotik katlantılar ve bir median glossoepiglotik katlantı. Bu katlantıların oluşturduğu iki çöküntü vallekula olarak bilinir. İnfrahiyoid parça ise sadece laringeal ve posterior yüzeyde serbesttir. Bu yüzeyde tüberkül olarak bilinen bir çıkıntı vardır. Anterior yüzey ile tirohiyoid membran ve tiroid kartilaj arasında preepiglottik boşlukta yağ yastığı yer alır. Her bir yandan kuadrangüler membran, aritenoid ve kornikulat kartilajlara uzanarak ariepiglotik katlantıyı oluştururlar.

2.2.2. Elastik Dokular

Larinksin elastik dokusu iki esas parçadan oluşur: (1) supraglottik larinksin kuadrangüler membranı ve (2) infraglottik larinksin konus elastikusu.

Kuadrangüler membran epiglotun lateral kenarına anterior olarak bağlanır ve aritenoid ve kornikulat kartilajlarla posteriorda eğimli olarak bağlantı kurar. Bu yapı ve üzerindeki mukoza ariepiglottik katlantıyı oluşturur. Her bir katlantı her bir piriform sinüsün medial duvarını oluşturur. Kuadrangüler membranın inferior kenarı vestibüler ligamanları meydana getirir.

Konus elastikus, kuadrangüler membrandan daha kalın bir elastik yapıdır ve krikoid kartilajın süperior kenarına inferiordan yapışır. Sonra süperior bağlantılarıyla tiroid kartilaj anterior komisürüne ve aritenoidlerin vokal çıkıntılarına doğru yönelir. Bu süperior bağlantılar arasında konus elastikus kalınlaşarak vokal ligamanları meydana getirir. Anteriorda krikotiroid membranı oluşturur ve orta hatta krikotiroid ligamanı oluşturmak için yoğunlaşır. Konusun süperior uzanımı (tiroepiglottik ligaman) gerçek vokal kordların süperior yüzeyine paraleldir. Normalde gelişimini tamamlamamış olabileceğinden dolayı transglottik kanserlerin inferiora yayılımına yetersiz bir bariyer oluşturur.

2.2.3. Laringeal Kaslar

Larinksin Ekstrinsik Kasları

Larinksin ekstrinsik kasları laringohiyoid kompleksin kaslarıdır ve larinksi yükseltme, alçaltma ve sabitleme görevlerini görürler. Larinksi eleve eden kaslar tirohiyoid, stilohiyoid, digastrik, geniohiyoid, mylohiyoid ve stilofarengus kaslarıdır. Bu kaslar çiğneme sırasında larinksin elevasyon ve anteriora yer değiştirmesi için önemlidir. Ayrıca larinksin hiyoid kemik vasıtasıyla kafa tabanı ve mandibulaya tutunmasını sağlarlar. Larinksin esas depresörleri omohiyoid, sternohiyoid ve sternotiroid'tir. Bu kaslar inspirasyon sırasında larinksi aşağı çekerler. Orta konstriktör, alt konstriktör ve krikofarengus kasları da önemli ekstrinsik kaslardır. Bu kasların uygun işlev görmesi çiğneme refleksinin doğru zamanlaması için gereklidir.

Larinksin İntrensik Kasları

Larinksin intrinsik kasları anatomik olarak larinks içine sınırlıdır ve vokal kordların uzunluk ve gerginliği ile birlikte glottik açıklığın boyutlarını ayarlarlar. Bir abdükör dışında diğerleri addüktördür. İnteraritenoid kas haricindeki intrinsik kaslar çifttir ve bu çift kaslar senkronize olarak hareket ederler.

Krikotiroid Kas

Krikotiroid kas laringeal kartilajların dış yüzeyinde yerleşmiştir. Klasik olarak iki karınlı olarak tanımlanır. Düz parça ya da pars recta, vertikal yönde krikoid kartilaj arkusu anterior parçasının lateralinden tiroid kartilaj inferior kenarına uzanır. İkinci karnı, pars obliqua, krikoid arkusu anterolateral kenarından inferior anterior parçasına oblik olarak ilerler. Sağ ve sol krikotiroid kaslar kasıldığında krikoid kartilajı krikotiroid laminayı ve aritenoid kartilajları inferiora yönlendirirken krikoid anterior arkusunu süperior olarak tiroid laminanın inferior kenarına yaklaştırır. Bu inferiora olan yer değiştirme vokal proses ve anterior komissür arasındaki mesafeyi arttırır. Bu hareket sonucunda vokal kordlar paramedian pozisyona gelirken alçalır, gerilir ve incelir. Vokal kordların gerilmesiyle aynı zamanda vokal kord kenarları keskinleşir ve tabakalar sertleşir. Biyomekanik olarak bu dönüşüm vokal kordlar tarafından daha yüksek temel frekanslar oluşmasını sağlar.

Posterior Krikoaritenoid Kas

Bu kas vokal kordların tek abdüktörüdür. Krikoid laminanın posterior yüzündeki bir çöküntüde yerleşmiştir ve lifleri aritenoid kartilaj musküler çıkıntısı üzerine süperior ve lateralden oblik olarak bağlanmıştır. Horizontal ve vertikal olmak üzere iki parçadan oluşur. Bu liflerin kasılması vokal çıkıntıları laterale döndürerek eleve ederken musküler çıkıntıyı medial, medial posterior ve inferiora getirir. Bu hareket vokal kord kenarlarını yuvarlarken aynı zamanda abdükte eder, uzatır ve inceltir. Vokal kordların gerilmesi tabakalarında pasif olarak sertleşmeye yol açar. Horizontal parçası primer olarak fonasyon sırasında çıkıntılarının pozisyonunu ayarlarken vertikal ve oblik karınlı solunum sırasında vokal kordların abdüksiyona geçmesini sağlar.

Lateral Krikoaritenoid Kas

Lateral krikoaritenoid kas, posterior krikoaritenoid kasın esas antagonistidir. Krikoid kartilajın süperior kenarına tutunur ve musküler çıkıntının anterior parçasına posteriordan lifler gönderir. Bu kasın kasılması vokal çıkıntıyı abdükte ederek

alçaltırken, musküler çıkıntıyı anterolaterale getirir. Sonuçta vokal kordların addüksiyonu, uzaması ve incilmesi meydana gelir. Vokal kordların serbest kenarları daha keskin hale gelir ve tabakalar pasif olarak sertleşir.

İnteraritenoid/Ariepiglottik Kas

İnteraritenoid kas çift olmayan tek intrinsik kastır ve iki tür kas lifinden oluşur. Kas hacmi bir aritenoid kartilajın posterior yüzünden diğerinin posterior yüzeyine geçen transvers liflerden meydana gelir. Bu kas kasıldığında aritenoid kartilajları biraraya getirir. Böylece glottis posteriorunun kapanmasına yardımcı olur. Bu hareket vokal kordların mekanik özelliklerini anlamlı derecede etkilemez. Oblik lifler aritenoid posterior parçasından öteki aritenoidin apeksine uzanır. Böylece orta hattı çaprazlar. Bazı lifler apekse girerken diğerleri kuadrangüler membran boyunca ilerler. Bu lifler kasılarak laringeal aditusu daraltır. Kuadrangüler membran boyunca ilerleyen diğer lifler ariepiglottik kası oluşturur.

Tiroaritenoid Kas

Tiroaritenoid kas klasik olarak tiroaritenoid internus ve eksternus olarak ayrılır. Bunlar bazı bağlantılar içerir. İnternus derine doğru ya da internalden eksternal olarak uzanır. Ayrıca internus eksternustan daha iyi gelişmiştir. Tiroaritenoid eksternus anterior komisürden doğar ve aritenoid kartilajın lateral yüzüne yapışır. Bu kas kasıldığında vokal çıkıntı ve anterior komisürü birbirine yaklaştırır, böylece vokal kordlarda addüksiyon olur. Bu kas ayrıca yalancı kordlara da addüksiyon yaptırır. Tiroepiglottik kası oluşturmak üzere eksternustan kuadrangüler membrana bir kas lifi uzanır. Bu kas ariepiglottik kas gibi laringeal girişi daraltır.

Tiroaritenoid internus ya da vokalis kası anterior komissüre ve vokal prosese yapışarak konus elastikus üzerindeki vokal ligamanın altına birkaç lif gönderir. Bu kas kasıldığında vokal kord yuvarlaklaşarak addükte olur, kısalır, kalınlaşır ve alçalır. Vokal kord kası aktif olarak sertleşirken üzeri pasif olarak gevşer.

2.2.4. İnternal Anatomi

Larinksin iç anatomisi iki katlantı ile ayrılan üç kısımdan oluşur. Bu üç kısım vestibül, ventrikül ve infraglottik kavitedir. Yalancı ve gerçek vokal kordlar üst kısımları ayırırlar. Bu mukoza sınırı iki önemli boşluğu ayırır: preepiglottik boşluk ve paraglottik boşluk.

Vestibül

Larinksin laringoskopik görünümünde vestibül, epiglot üst kısmından yalancı vokal ya da vestibüler kordlara kadar olan bir larinks kısmı olarak görülür. Böylece vestibül, anteriorda epiglot lateralde ariepiglottik katlantı ve posteriorda aritenoid ve kornikulat kartilajlar ile interaritenoid kas tarafından sınırlanır. Laringoskopik görünümde anterior komissür genellikle tüberkül olarak bilinen epiglot protüberansı tarafından gizlenmiştir. Önceden belirtildiği gibi vestibüler katlantılar vestibüler ligaman (kuadrangüler membran inferior kenarı) üzerindeki mukoza tarafından oluşturulur. Ventrikül submukozası çok sayıda serömüsinöz gland içerir. Bu ekzokrin bezler tarafından üretilen sekresyon vokal kordlar için hem mekanik hemde immün (lizozim) koruma sağlar.

Ventrikül

Ventrikül ya da Morgagni sinüsü yalancı ve gerçek vokal kordlar arasında küçük bir boşluktur. Ventrikül, yalancı vokal kordların lateralizasyonu sonucu görülür hale gelmemişse sıklıkla laringoskopik muayenede görülmez. Ventrikülün anterior ucu "laringeal sakkül" olarak bilinen divertiküldür. Sakkül vokal kordları kayganlaştırdığı düşünülen müköz bezlerle kaplıdır. Tiroaritenoid kas lifleri sakkül duvarlarını kaplar ve kasıldıklarında sakkülden sekresyon salınımına neden oldukları sanılmaktadır. Sakkül boyutları oldukça değişkendir. Bununla birlikte tiroid kartilajın süperior hizasını aşması nadirdir. Sakkülün anormal dilatasyonu, sakkül mukoseli (sakküler kist) ile ayırıcı tanısının yapılması gerekli olan içi hava dolu laringosel oluşumu ile sonuçlanır.

İnfraglottik Kavite

İnfraglottik kavite glottisten krikoid kartilaj inferior sınırına uzanır. Lateral sınırı konus elastikus ve krikoid kartilaj tarafından oluşturulur.

Piriform Sinüs

Piriform sinüs her ne kadar hipofarenksin bir parçası olsa da anatomisinin ve larinkle olan ilişkisinin bilinmesi önemlidir. Piriform sinüs, ariepiglottik katlantı, aritenoid kartilaj ve medialde krikoid kartilajın süperior parçası ile lateralde tiroid laminanın iç yüzü ve tirohiyoid membran tarafından oluşturulan oluk şeklinde bir oluşumdur. Süperiorda lateral glossoepiglotik katlantıdan başlar. İnferiorda sinüs apeksi krikoidin süperior kenarında özefagus girişine karışır. Bu nedenle eğer apeksin kanser tarafından invazyonu söz konusu ve koruyucu larinjektomi planlanıyorsa krikoidten de bir parça çıkarılmalıdır. Piriform sinüste iki önemli nokta vardır. Anteriorda sinüs tabanında süperior laringeal sinirin seyrettiği küçük bir kabartı görülebilir. Bu sinirin submukozal seyirli olması topikal anestezi uygulanmasına imkân tanır. İkinci ve daha değişken olan tiroid kartilaj süperior boynuzunun sinüs içine olan protrüzyonudur. Bu işaret genelde yaşlılarda daha belirgindir ve neoplazm ile karıştırılmamalıdır.

Mukoza

Larinkste iki türlü mukoza bulunur: yalancı çok katlı silyalı kolumnar (solunum) epitel ve yassı hücreli epitel. Larinksin çoğunluğu solunum epiteli ile kaplıdır. Bununla birlikte epiglotun süperior parçası, ariepiglottik katlantıların üst kısımları ve vokal kordların serbest uçları yassı epitelle kaplıdır. Bu epitel dokusunun altında değişken bazal membran bulunur ve bu ikisini ayıran zayıf bir fibröz stroma mevcuttur. Bu zayıf fibröz stromanın epiglotun laringeal (posterior) yüzü ve gerçek vokal kordlarda bulunmadığı bilinmelidir. Epiglot posterior yüzünde bu tabakanın olmaması larinksin enflamatuvar durumlarında epiglotun lingual (anterior) yüzünde daha yoğun şişlik meydana gelmesine neden olur.

Preepiglotik Boşluk

Preepiglotik boşluk adından da anlaşılacağı üzere epiglotun anteriorunda uzanır ve epiglot bu boşluğun posterior sınırını oluşturur. Süperiorde hiyoepiglotik ligaman ve vallekula mukozası, inferiorde tiroepiglotik ligaman ile sınırlıdır. Lateralde preepiglotik boşluk paraglotik boşluğa açılır. Epiglotun infrahiyoid parçasındaki kanser epiglotu penetre ederek preepiglottik boşluğa geçebilir.

Paraglottik Boşluk

Paraglottik boşluk adından da anlaşılacağı üzere glotisin her iki yanında uzanır. Bu boşluk gerçek ve yalancı vokal kordların yukarisından aşağısına uzanır ve neoplazmların transglottik ve ekstraglottik yayılımı için önemlidir. Medialde bu boşluk kuadrangüler membran, ventrikül ve konus elastikus ile çevrilidir. Lateralde tiroid lamina perikondriumu ve krikotiroid membran ile sınırlanmıştır. Anterosüperiorde preepiglotik boşluğun posterior parçasına açılır. Piriform sinüs mukozası posterior sınırı oluşturur. Laringeal kanser yayılımı göz önüne alındığında paraglottik boşluğun bağlantılarının önemi ortaya çıkar. Bu boşluğu tutan supraglottik kanser hızla ekstralaringeal yayılım gösterebilir.

2.2.5. Larinksin Vasküler Yapıları ve Nöronal Uyarılması

Larinksin Arterleri ve Venleri

Larinksin arteriyel beslenmesi süperior ve inferior laringeal arterlerden olur. Eksternal karotisten süperior tiroid arter dalı ayrıldıktan sonra laringohiyoid kompleksin lateralinde seyrederek hiyoid kemik seviyesinde süperior laringeal arter dalını verir. Daha sonra bu arter süperior laringeal sinir internal dalının anteromedialinde seyrederek tirohiyoid membranı deler. Sonra piriform sinüs submukozasına girer ve intralaringeal yapılara dağılır. Süperior tiroid arter aynı zamanda tiroid kartilaj altında horizontal seyreden krikotiroid dalını verir. Inferior laringeal arter, subklavyen arterin dalı olan tiroservikal trunkustan ayrılan inferior tiroid arterin dalıdır. Rekürren laringeal sinir ile birlikte krikotiroid eklem

posteriorunda seyrettikten sonra “Killian-Jameson alanı” diye bilinen inferior konstriktör kastaki aralığa yönelir. Sonra internal larinksin geri kalanına dağılarak süperior laringeal arterle multiple anastomoz yapar. Venöz sistem arteryel sisteme paraleldir.

Larinksin Lenfatikleri

Larinksin lenfatiklerinin bilinmesi uygulanacak operatif prosedürlerin belirlenmesi kadar kanser yayılımını anlamak için de önemlidir. Larinksin lenfatikleri yüzeysel (intramukozal) ve derin (submukozal) olarak ayrılır. Derin yayılım sağ ve sol yarılarında aralarında küçük bağlantıların bulunduğu daha detaylı parçalara ayrılır. Bu sağ ve sol yarı; supraglottik, glottik ve subglottik olarak ve özellik arzeden ventrikül kısımlarına ayrılır. Her ne kadar yüzeysel yayılımında zengin anastomoz olsa da derinde olan yayılım kanser yayılımı için daha fazla önem arzeder. Supraglottik yapıların (ariepiglotik ve yalancı kordlar) drenajı süperior laringeal ve süperior tiroid damarları takip eder. Böylece piriform sinüsten tirohiyoid membrana doğru lenfatik akım olur ve karotis bifurkasyonu çevresinde derin juguler zincirde sonlanır. Epiglot orta hat yapısı olduğundan lenfatik drenajı bilateraldir. Ventrikül lenfatik drenajı diğer supraglottik yapılardan farklıdır. Ventriküle enjekte edilen boya paraglottik boşluğa girer ve hızla krikotiroid membran ve ipsilateral tiroid lobuna yayılır. Yüksek oranda kanser tedavisinin söz konusu olduğu gerçek vokal kordlar lenfatiklerden yoksundur. Subglottik larinkste iki lenfatik drenaj sistemi bulunur. Bunlardan biri inferior tiroid damarları izleyerek subklavyen, paratrakeal ve trakeoozefageal zincir ile alt derin juguler lenf nodu zincirinde sonlanır. Öteki sistem krikotiroid membranı deler. Larinksin her iki tarafından da lenfatikler alır ve prelaringeal (Delphian) lenf nodları olarak orta derin servikal lenf nodlarına bilateral dağılır.

Larinksin Uyarılması

Uyarılma paterni, reseptörlerin tipi ve dağılımı larinks fonksiyonel kapasitesini belirler. Larinks, süperior ve inferior laringeal sinirlerle uyarılır. Süperior laringeal sinir, karotis arterleri ve laringohiyoid kompleks arasında ganglion nodozumdan ayrılır. Daha büyük internal ve daha küçük eksternal dallarını verir. İnternal dal,

süperior laringeal arterle birlikte tirohiyoid membranı deler ve larinksin ipsilateral supraglottik kısmının duyusunu alır. Eksternal dal, krikotiroid ve inferior konstriktör kaslarını uyarır. İnférieur laringeal sinir, rekürren laringeal sinirden köken alır ve trakeoözefageal olukta ilerler. Krikotiroid eklem posteriorunda larinkse girer ve klasik olarak anterior addüktör ve posterior abdüktör dallarına ayrılır. Bununla birlikte bu dallanma oldukça değişkendir.

Larinks reseptörleri mukozal, artiküler ve miyotatik olarak ayrılabilir. Mukozal reseptörler dokunma, mukozal deformasyon (mekanoreseptörler) ve sıvı uyaranlara cevap verirler. Artiküler reseptörler eklem kapsülünde yerleşmiştir ve kapsül deformasyonuna cevap verir. Miyotatik reseptörler de musküler gerilime cevap verir ve vokalis kasında bolca bulunur.

2.3. Vokal Kord Yapısı

Vokal kordların anatomisi karmaşıktır. Vokal kordlar aritenoidin vokal çıkıntıları ile anterior komissür arasındaki yapılardır. Vokal kordların arasında kalan yarık rima glottis olarak adlandırılır. Glottis, vokal çıkıntıların üst ucundan geçen horizontal bir çizgi ile ikiye ayrılabilir. Bu hayali çizgi glottisi intermembranöz ve interkartilajinöz kısımlara ayırır. İntermembranöz interkartilajinöz parçaya anteriordan posteriora uzunluk olarak oranı 3:2 olmakla birlikte kesitsel oran 2:3'tür. Böylece daha diktörgen biçiminden dolayı interkartilajinöz parça daha geniştir. Bazıları burayı rimanın solunumsal kısmı olarak nitelendirmektedir. Vokal kodların membranöz ya da titreşen kısımları üç tabakadan oluşur. Yüzeyelden derine doğru epitel, lamina propria (üç tabakalı) ve vokalis kası olarak bilinir. Hirano gövde-örtü kuramına göre bu tabakaları ayırmıştır (12). Örtü, üstteki epitel ve lamina proprianın süperfisyal katmanından oluşur. Gövde, lamina propria derin tabakası ve vokalis kasından oluşur ve kalın bantlar olarak tanımlanır. Bunlar arasında (elastik) lamina proprianin orta tabakası bulunur. Bu kurama göre vokal kordlar gövdeyi örten çok katlı titreşen kısımlardan oluşur. Böylece örtü kısmı vokal kordların titreşim hareketinin çoğunluğundan sorumludur. Vokal kordların anterior ve posterior uçları sırasıyla anterior ve posterior makula flavadır. Bunlar aslında lamina proprianin orta (elastik) tabakasının kalınlaşması ile oluşur ve vokal kord uçlarını titreşim hasarından "yastık"

şeklinde koruyucu görev gördükleri düşünülmektedir. Aynı gövde-örtü kuramı çocuk larinksi için geçerli değildir, çünkü lamina propria çocuklarda daha homojen bir yapıya sahiptir. Adölesan çağın neredeyse sonuna kadar lamina matür hale gelmemektedir. Yaşlı larinksinde elastik tabaka ve vokalis kası atrofi olmaya eğilimliken kolajen tabaka kalınlaşır. Örtü kalınlaşır ve laminanın süperfisiyal tabakasında ödematöz değişiklikler olurken epitelde çok az değişim izlenir.

Gerçek ve yalancı vokal kordların şeklinin biyomekanik önemi vardır. Koronal kesitte her ikisi de valf benzeri yapılara benzer ve yalancı kordlar inferiora gerçek kordlar süperiora dönüktür. Böylece yalancı kordlar havanın dışa yönelimini engellerken gerçek kordlar içe yönelimine pasif olarak engel olur. Her iki yapı da karşı hava akımına çok az direnç gösterir ve tek yönlü valf gibi çalışır.

2.4. Tavşan Larinks Anatomisi

Tavşanların ağız boşluğu bir bütün olarak dar ve uzundur (yaklaşık 3.5 - 5,0 cm) ve ağız boşluğu boyunca uzanan yumuşak damak glottik alanı hafifçe gizler. Aynı zamanda üst kesici dişler; zaten çok dar ve anterior eğimi oldukça dik olan farinks / larinks bölgesinin görülmesini engeller. Dil dorsal olarak şişer ve kalınlaşır; kalın tabanı sebebiyle dil ağız boşluğundan mümkün olduğunca çekilse bile, epiglotisin doğrudan görülmesini önler. Bu durum bilateral nazal boşlukları tıkanığında tavşanların neden ağız boşluğundan nefes almakta zorluk çektiğini açıklar. Ek olarak, temperomandibular eklemlerinin kızak şekilleri nedeniyle ağız boşluğu sadece minimal şekilde açılabilir. Bu nedenle anteroventral yalancı larinks bölgesi doğrudan görüntülenemez. Larinks iskeleti, oldukça farklı tasarlanmış birkaç kıkırdaktan oluşur. Larinksin en geniş kıkırdağı olan tiroid kıkırdak anterolateral olarak bulunur. Silindirik şeklindeki krikoid kıkırdak ise tiroid kartilaja kaudal olarak durur ve larinksin en güçlü kıkırdağıdır. Bu iki kartilaj birlikte larinksin büyük bölümünü oluşturur. Aritenoid kartilajlar larinkste dorsorostral bölgelerde karşılıklı olarak bulunan, daha küçük boyutlu kartilajlardır. Tavşanlarda ilkel vokal kordların veya kıvrımların kaynağı oldukları düşünülmektedir. Epiglot glottisin girişinde bulunur. Fonksiyon olarak trakeayı kapattığı için epiglota 'kapanış kıkırdağı' da denilir. Tavşanlarda nispeten daha büyük ve U şeklinde olan yumuşak/esnek trakea kartilajları epiglotu destekler.

Glottisin girişi trakeaya göre oldukça dardır. Bu nedenle entübasyon uygulanacaksa, tüplerin çapları glotise göre (rima glottis) belirlenmelidir. Tavşanlarda vokal kordlar larinkste kraniyal olarak uzanır ve dorsoventral yönde eğimlidirler. Bu vokal kordlar tavşanların laringeal aditusunu oluştururlar. Laringeal aditusu her iki tarafından hiyoid kemikler ve tiroid kartilajlar lateral olarak destekler. Burada faringeal mukoza, tiroid kartilajlar, hiyoid kemikler ve epiglotisin lateral kenarı arasında kalan dar bir açıklık oluşur. İnsana yüksek seviyede benzerlik gösteren bu anatomik ve histolojik organizasyon yapısı sayesinde vokal kord çalışmalarında tavşanlar sıklıkla kullanılmaktadır.

2.5. Vokal Kordda Skar Oluşumu ve Yara İyileşmesi

Vokal kord skarı, vokal kordun katmanlı yapısında meydana gelen travma sonucu oluşan ve vokal kordun titreşme fonksiyonunda belirgin bozulmaya neden olan bir durumdur. Vokal kordun viskoelastik özelliklerinin değişimine bağlı olarak disfoniye sonuçlanan süreçte, hastaların hayat kaliteleri bozulmaktadır. Vokal kord skarında gözlenen, organizasyonu bozulmuş kolajen ve elastin demetleri, ekstraselüler matriks bileşenlerinin kaybı, vokal kord hacminin azalması ve vokal kordun esnekliğinin kaybolması glottik açıklıkla sonlanan temel problemlerdir. İnsan vokal kord lamina propriasının oldukça kompleks  katmanlı yapısından dolayı vokal kord skarlarının tedavisi laringoloji pratiğinde çözüm bekleyen ve araştırmaların yoğunlaştığı popüler konular arasında yer almaktadır.

Skar oluşumu; konjenital ya da klinik pratikte daha fazla karşılaşılan Őekliyle edinsel olabilir. Lamina propriadaki konjenital defektler, vokal kord epitelinin doğrudan vokal ligaman ile temasıyla sonuçlanan sulkus vokalise neden olabilir. Ford ve ark. (13) sulkus vokalisi  alt tipe ayırmıştır: Tip 1'de mukozal dalga hareketinde bozulmaya neden olmayan superfisiyel yerleşimli defekt mevcuttur. Tip 2'de sulkus vergeture olarak adlandırılan lamina proprianın süperfisiyal tabakasının kaybolduğu izlenirken bu hastalarda orta seviyede disfoni görülmektedir. Tip 3'de lamina proprianın daha derin tabakalarına kadar ilerleyen vokal ligamana hatta bazı hastalarda tiroaritenoid kasa kadar ulaşan defekt görülebilir. Bu grupta yer alan hastalarda vokal kordun mukozal dalga hareketinde belirgin bozulma görülmektedir

ve bu durum disfoninin artmasıyla sonuçlanır. Bazı araştırmacılara göre, konjenital vokal kord kistinin rüptüre olması, o bölgede kontraktür ve sulkus vokalis oluşumuna neden olabilmektedir (14).

Edinsel vokal kord skarının en sık nedeni vokal kord travmasına bağlı olarak gerçekleşir. Sesin yanlış ya da fazla kullanılması, kimyasallara maruziyet (sigara, laringofaringeal reflü), termal (inhalasyon, lazer) hasar, künt veya penetran travma, iyatrojenik travma (cerrahi tedavi, entübasyon, radyoterapi), enflamatuvar hastalıklar (romatoid artrit, Sjögren gibi) edinsel vokal kord skarlarının nedenlerindedir. Larinks kanseri için yapılan genişletilmiş vokal kord eksizyonlarında ağır skar oluşumu neredeyse kaçınılmazdır. Benign vokal kord lezyonları için yapılan cerrahilerde, vokal kord mukozasının gereksiz harabiyetinin önlenmesi, fonocerrahi prensiplerine uygun davranılması, yanlış cerrahi teknikten kaçınılması hastayı istenmeyen cerrahi sonuçlarla karşılaşmaktan korumada hekime yardımcı olacaktır (15, 16). Martinez-Arias ve ark. (17) tarafından benign vokal kord hastalıkları için endolaringeal lazer cerrahisi yapılan 12 hastada vokal kord epitelinin, lamina proprianın derin tabakasına kadar hasarlandığını göstermiştir. Termal hasarın vokal kord lamina propriasında kolayca hasara neden olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan Beninger ve ark. (18) ve Remacle (19) tarafından benign vokal kord lezyonları için, uygun cerrahi teknikle yapılan cerrahilerde soğuk bıçak methodunun ve endolaringeal lazer cerrahisinin fonksiyonel sonuçlara negatif etkisinin olmadığını göstermiştir.

Vokal kord skarı için genel kabul görmüş bir sınıflandırma bulunmamakla birlikte, Hantzakos ve ark. (20) 2019 yılında yayınladıkları bir makalede, farklı etyolojik nedenlerle vokal kord mukozasında meydana gelen hasarın ve buna bağlı ortaya çıkan disfonileri göz önünde bulundurarak sulkus vokalis hastalığının da vokal kord skarları içerisinde değerlendirilmesini önermişler ve yeni bir sınıflama sistemi geliştirmişlerdir. Yeni sınıflandırmaya göre dört tipe ayrılan vokal kord skarlarında, mevcut defektin vokal kord lamina propriasında oluşturduğu değişiklikler ve bu değişikliklerin boyutları göz önünde bulundurulmuştur:

Tip 1 Lamina propria atrofisi ve eşlik eden veya etmeyen vokal kord epitelinde hasar vardır. Glottik kapanma yetersiz olmasına rağmen vokal kord esnekliği

korunmuştur. Süperfisial sulkus vokalis, sulkus vergeture ve sulkus vokalis bu başlıkta yer almaktadır. Ek olarak yaşa bağlı vokal kord atrofisi (presbilarinks) bu tip altında sınıflandırılmıştır.

Tip 2 Lamina propria, vokal ligaman ve vokalis kası etkilenmiştir. Vokal kordun esnekliği azalmış mukozal dalga hareketi bozulmuştur. Vokal kord lamina propriası ve epitelinde gerçekleşen hafif bir hasardan, vokal kasın veya hemilarinksin tamamını etkileyen skar dokusu görülebilir. Bu duruma bağlı olarak vokal kord mukozal dalga hareketi azalmış ya da tamamen kaybolmuş olabilir. Kordektomi tip I,II,III ve IV, parsiyel larinjektomi, entübasyon travması ve laringofarengeal reflü nedenleri arasında sayılabilir.

Tip 3 Skar dokusu Anterior kommissüre yerleşmiştir. Konjenital veya edinsel web, Kordektomi Tip V ve VI nedenleri arasında yer alabilir.

Tip 4 Vokal kordun titreşim özelliğini kaybettiği, skar dokusunun yaygın olarak anteroposterior ve kranio-kaudal yerleşim gösteren tipidir. Vertikal parsiyel larinjektomi veya subtotal parsiyel larinjektomi sonrasında oluşur. Larinksin fonatuar fonksiyonları belirgin seviyede azalmıştır.

Vokal kord skar oluşumunda gerçekleşen iyileşme dönemi, cilt hasarı sonrası ortaya çıkan iyileşme sürecine benzemekle birlikte kendine özgü eşsiz birtakım farklılıklar barındırmaktadır. Vokal kord yara iyileşme kaskadının birbiriyle iç içe geçmiş 3 fazı vardır: i. enflamatuar faz, ii. proliferatif faz, iii. Remodeling ve matürasyon fazı. Vokal kord yara iyileşmesi sürecindeki; hücreler, sitokinler, büyüme faktörleri, ECM bileşenleri arasında kompleks ilişki bulunmaktadır. Bu süreçte meydana gelen reaksiyonların büyük bir kısmı anlaşılmalı olmasına rağmen, tamamen iyileşmeye veya skar oluşumuna neden olan basamaklar ya da maddeler bilinmemektedir. İnsan vokal kord yapısıyla benzerlik gösteren deney hayvan modellerinde yapılan çalışmalar bu sorunu aydınlatmayı amaçlamaktadır (21).

İnflamatuar fazda, hasar oluşumundan 4 ile 8 saat sonra İnterlökin 1 (IL-1) ve Tumor Nekrosis Factor-a (TNF-a) mRNA ekspresyonlarında artış görülür. Hemostaz

olur ve enflamatuar mediatörler ortamda artış gösterir. Sonraki günlerde vazodilatasyon ve büyüme faktörlerinin lökosit ve fibroblastları yara bölgesine çekmesiyle iki hafta kadar süren proliferatif faz başlar. Anjiogenez artar ve ECM oluşmaya başlar. Remodelling fazı ortalama bir sene devam eder. Kolajen ve skar dokusunun yerleştiği ve olgunlaştığı fazdır. Fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar ve plazma hücreleri gibi akut ve kronik enflamasyon hücreleri yara iyileşmesi sürecindeki üç fazda da görülürler. Bu hücreler hasarlı doku bölgesine mevcut veya hasar esnasında oluşan vasküler kanallar vasıtasıyla ulaşarak anjiogenez faktörlerinin salınmasına dolayısıyla vaskülarizasyonun artmasına yol açarlar. Epitel altında yer alan fibrin ve kolajen, enflamatuar hücrelerin neden olduğu rezorpsiyona uğrar. Rezorbe olmayan fibrin ve kolajen depozitlerinin dağılımı ve miktarı, yara iyileşme esnasında ortaya çıkan farklılıklara neden olabilir. Yara iyileşmesi basamaklarının akut enflamatuar ve proliferatif evreleri skar oluşumundaki en önemli aşamalar olarak bilinir. İlk hasardan 2-3 gün sonra başlayan proliferatif evre 2-3 haftaya kadar devam eder. Bu dönemde fibroblastlar hasarlanan bölgeye göç ederler, kolajeni de içeren ECM bileşenlerini üretmeye başlarlar. Fetal dokularda yapılan yara iyileşmesi çalışmalarında hiyalüronik asidin (HA) anahtar görevi sahiplendiği gösterilmiştir (22). Erişkin yara iyileşmesi sürecinde HA hasardan 2-3 gün sonra pik seviyelere ulaşır, ardından hızlıca normal seviyelere inerken fetal dokuda HA seviyeleri yüksek kalmaya devam eder. Ayrıca HA'nın fibroblastlardan kolajen sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu özelliğinden dolayı yara iyileşmesi sürecinin akut fazında HA seviyelerinin korunmasının skar oluşumunun önüne geçilmesinde yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Ek olarak erişkin doku hasarı sonrası yüksek molekül ağırlıklı HA uygulanmasıyla yapılan timpanik membran perforasyonu, kornea abrazyonu ve cilt yanıkları çalışmalarında daha hızlı iyileşme görülmüş ve hasarlı alanda daha az fibrozis olduğu rapor edilmiştir (23).

Vokal kord skarı, ses telinde mukozal sertlik artışı ve fonasyon sırasında oluşan ses dalgası amplitüdünde azalmayla karakterizedir. Bugüne kadar uygun tedavisi belirlenememiş olmakla birlikte, insan vokal kord histolojisinin oldukça kompleks üç katmanlı tabakasından dolayı hastalığın tedavisinin zor olduğu bilinmektedir. Vokal kord skarı oluşumu mekanizmasında yatan histolojik değişiklikleri anlamak, karışık

ve kompleks vokal kord mimarisini, normal veya normale yakınlaştıran tedavi olanaklarının gelişimi için önemlidir. Multi-tabakalı ve oldukça özelleşmiş vokal kord katmanlarını biraraya getiren yapıtaşlarının ve vokal kord hasarında meydana gelen moleküler mekanizmaların bilinmesinin, vokal kord skar tedavisi için ortaya atılan yaklaşımların esas dayanak noktası olduğunu düşünmekteyiz. Son yıllarda bu probleme yönelik yapılan araştırmalarda anlaşılan interstisyel proteinler (fibronektin, dekorin, fibromodulin vb.), glikozaminoglikanlar (hiyalüronik asit vb.) ve çeşitli ekstraselüler matriks proteinlerinin (kolajen, prokolajen, elastik vb.) birbirleriyle olan ilişkileri bu sorunun tedavisine yeni bakış açıları getirmiştir (24).

Vokal kordda bulunan makula flava alanı vokal kordların hücre rezervini içerir. Bu bölgenin, büyüme ve gelişme esnasında sahip olduğu kritik fonksiyonlara akut veya kronik enflamasyon sürecindeki önemli görevleri de eklenebilir. Vokal kord üzerinde iğ şekilli fibroblastlar birkaç bölgede yerleşmiştir. Bu hücreler normal şartlar altında fonksiyon göstermezler. Buna karşın anterior ve posterior makula flavaya yerleşen fibroblastlar yıldız şekline sahip olup, sayıca ve morfolojik açıdan farklılık göstermektedir. Bu hücrelerden kolajen, elastin ve retiküler liflerin yanında hiyalüronik asit gibi glukozaminoglikanlar da üretilir (25).

Kolajen lifleri, skar dokusunda bulunan en önemli bileşendir. Hasardan sonraki 3 ile 6 hafta arasında kolajen sentezinin düzensiz olduğu bilinmektedir. Normal vokal kordda epitelyal tabakaya paralel yerleşim gösteren kolajen lifleri, sahip oldukları karakteristik görüntüyü kaybederek lamina proprianın bütün katmanlarına yayılan düzensiz kolajen depositleri meydana getirirler. Normal vokal kordla karşılaştırıldığında yoğunlukları belirgin seviyede azalmıştır. Hasarlı vokal kordda kolajenin prekürsörü olarak bilinen prokolajen tip 1, lamina proprianın süperfisial tabakasında artmaktadır. Hasardan 6 ay sonra kolajen depositleri yüksek seviyelerde kalmaya devam ederken, prokolajen tip 1 normal değerlere yaklaşmaktadır. Sağlıklı vokal kordda sayıca baskın olan kolajen tip 3 yapısal olarak daha kalındır. Hasarlanmış vokal kordda iyileşme süreci devam ederken daha farklı moleküler ve mikroskobik yapıya sahip kolajen tip 1 ile yer değiştirir (26). Elastin vokal kord skarında azalmış ve yapısal olarak dağınık yerleşmiştir.

HA seviyeleri vokal kordun viskoelastik özellikleri üzerinde belirgin etki sahibidir; yukarıda da bahsedildiği üzere vokal kord hasarı sonrası iyileşme sürecinde ve skar oluşumunda anahtar rol oynar (27). HA seviyelerinin yüksekliği yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkilerken skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (28). HA vokal kordun biyomekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir yer tutar. Hyalüronik asitin ortamdaki uzaklaşması, viskozitenin artmasına ve vokal kord esnekliğinin azalmasına neden olurken titreşim hareketi olumsuz yönde etkiler.

Fibronektin, ekstraselüler matriks proteinlerinden bir tanesi olup travma sonrası iyileşme döneminde adezyon ve migrasyon molekülü olarak görevlidir. İnflamatuar hücreler ve fibroblastlar için kemotaktik işlev yaparken matriks organizasyonunda rol alır. Bu glikoprotein sağlıklı vokal kordun süperfisial lamina propriası ve bazal membranda bulunur. Vokal kord hasarı sonrası 6 ay kadar süreyle fibronektin seviyelerinin yüksek seyrettiği gösterilmiştir (29). Dekorin, kolajen fibril organizasyonunu devam ettirmede görevli bir başka ECM proteindir. Beta-integrinlerle etkileşime girerek hücre adezyonu ve migrasyonunu inhibe eder. Vokal kord hasarı sonrası dekorin düzeylerinin incelendiği tavşan çalışmasında skarlı dokuda dekorin seviyelerinin belirgin seviyede azaldığı gösterilmiştir.

2.6. Platelet Rich Plasma (PRP)

PRP tam kanın santrifüj edilmesi ile elde edilen ve tam kandan daha yüksek kontrasyonda platelet içeren plazma komponentidir. PRP enjeksiyonlarının içeriğinde çok sayıda büyüme faktörü bulundurması; kas iskelet sistemi hastalıklarında, plastik cerrahi uygulama alanlarında, dermatoloji ve kozmetik alanında, beyin cerrahisi ve kulak burun boğaz hastalıklarının tedavisinde yaygın kullanımını mümkün kılmıştır. İyileşme sürecine olumlu etkisi olan büyüme faktörlerinin, lezyon yerine lokal enjeksiyon şeklinde uygulanması doku rejenerasyonunu ve yara iyileşmesini artırıcı etkileri ile tedavi potansiyeli taşımaktadır. PRP ilk olarak 1987 yılında kalp cerrahları tarafından otolog kan ürünü transfüzyon komponenti olarak kullanılmıştır (30). Uzun bir aradan sonra 2000'li yıllarda, PRP kullanımı maksillofasiyal cerrahlar tarafından bir kez daha güncel olarak ortaya konmuştur. Ancak, 2002 yılında FDA onayı ile, PRP

başta birçok kas iskelet sorunlarında daha sonra kozmetik ve diğer alanlarda da yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır.

Trombositler, primer olarak hemostazdaki rolleri ile bilinen periferik kandaki küçük ve çekirdeksiz hücrelerdir. Trombositlerin bir diğer önemli görevi içerdikleri bir takım büyüme faktörleri ile yara iyileşmesini başlatması ve düzenlemesidir. Trombositler iyileşmenin ilk günlerinde erken pik gösterirler. Yara yerinde istirahat halinde diskoid şekilde bulunan trombositler, trombin ile aktive olmaları sonrasında şekil değiştirerek psödopod adı verilen uzanımlar gösterirler. Aktive plateletler alfa granüllerinde bulunan pıhtılaşma ve büyüme faktörlerini ortama salarlar. Büyüme faktörleri membran reseptörlerine bağlanan ve çeşitli biyolojik yolların başlatıcısı olan küçük peptidlerdir. İyileşme sürecinde büyüme faktörlerinin hücre regülasyonunda, diferansiyasyonda, proliferasyonda, kemotaksiste, anjiogenezde ve matriks sentezinde önemli etkileri vardır. Alfa granüllerinden salgılanan temel büyüme faktörleri; platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforme edici büyüme faktör b (TGF-b), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve görevleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Normalde plazmanın hücresel komponenti; %93 eritrosit, %6 platelet ve %1 lökositten oluşur. PRP’de ise tam kana göre 3-5 kat daha yüksek oranda trombosit bulunur. PRP olarak tanımlanabilecek plazma için, genel kabul görmüş net bir trombosit konsantrasyonu değeri yoktur. Ancak tam kanda 150 000/ μ l ile 350 000 / μ l kadar bulunan plateletlerin sayısının, 5 ml plazmada 1 000 000 / μ l üzerinde olduğu zaman iyileşmeyi arttırıcı etkisinden bahseden çalışmalar mevcuttur (31). PRP’nin, sahip olduğu yüksek platelet konsantrasyonu nedeniyle hiperfizyolojik oranda büyüme faktörü içermesinden dolayı iyileşme sürecini hızlandırıcı etki gösterdiği düşünülmektedir. PRP, içerdiği çeşitli sayıda büyüme faktörü ve sitokinler sayesinde klinik pratikte hala önemli sorun oluşturan ve çözüm bekleyen anormalliklerde kullanılmaktadır. Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen nedenler dolayısıyla PRP’nin vokal kord hasarı sonrası yara iyileşme sürecinde olumlu etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Tablo 2.1. Trombositlerin içinde bulunan büyüme faktörleri ve görevleri

Trombosit Büyüme Faktörleri	Biyolojik Görevi
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Büyüme faktörlerinin regülasyonu Kök hücre kemotaksisinde artış Anjiogenez artışı
Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF)	İmmünsüpresyon Fibroblast sayısının artışı
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	Anjiogenez artışı
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Endotelial hücrelerde kemotaksis artışı
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	Fibroblastların kolajen üretimini regüle eder Granülasyon dokusu artışı Hücre migrasyonuna yardımcı
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF 1)	Anabolik etki gösterir Protein sentezi, Fibroblast proliferasyonu Matriks ve kolajen sentezini artırır

2.7. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler, anti-enflamatuar ve immünomodülatör özelliklerinden dolayı yaygın kullanım alanına sahiptir. Kortikosteroidlerin hedef genlerde aktivasyona veya inhibisyona neden olan çeşitli etkileri bulunmaktadır. Bu moleküller, doğal (makrofajlar, mast hücreleri ve granüositler) ve adaptif (lenfositler) immün reaksiyondan sorumlu hücrelere ek olarak; fibroblastlar, epitelial hücreler ve endotelial hücreler gibi birçok farklı hücre grubunda aktivasyona neden olur. Kortikosteroidler, birtakım sitokinlerin, enzimlerin ve enflamatuar maddelerin inhibisyonunu sağlarken; vazoaaktif maddelerin ve kemotaktik ajanların salınımını önlemekten sorumlu olan diğer sitokinlerin ve lipokortin gibi anti-enflamatuar moleküllerin indüklenmesini sağlar (32).

Glukokortikoidler anti-enflamatuar özelliklerinden sıklıkla faydalanılan ajanlardır. Piyasada kullanılabilen sentetik kortikosteroidler içerdikleri glukokortikoid etkinliklerine göre farklılık göstermektedir. Çeşitli klinik semptomların tedavisinde kortikosteroidlerden faydalanılmaktadır. Tedavi edici etkinliklerinin yanında dozaj ve verilen tedavi süresine bağımlı olarak yan etkilere neden olabilirler. İki haftadan kısa süreli kullanımlarda, yüksek dozajda tedaviye rağmen yan etki daha az görülür. Lokal steroid enjeksiyonlarının klinik pratiğe sokulması, steroidlerin yan etkilerinden korumaktadır. Steroidlerin intralezyoner kullanımı yüksek doz ilaç

konsantrasyonlarına ulaşmakta kolaylık yaratırken, tedaviye bağlı ortaya çıkan advers ilaç reaksiyonlarını azaltmaktadır.

Kortikosteroidler, üst solunum yolu hastalıkları tedavisinde sıklıkla kullanılmakla birlikte özellikle epiglotit veya krup gibi akut enflamatuvar hastalıklara bağlı gelişen üst aerodigestif sistem yollarında meydana gelen ödemi azaltmak için kullanılmaktadır (33). Bazı çalışmalarda, kronik hastalıklara bağlı olarak gelişen laringeal lezyonlarda steroid enjeksiyonlarının etkili olduğu gösterilmiştir (34). Mikrolaringeal cerrahiye bağlı vokal kord skarını engellemek için steroidler uzun zamandır kullanılmaktadır. Bouchayer ve Cornut benign mukozal lezyonlar için yapılan mikrocerrahi eksizyonu sonunda vokal korda hidrokortizon enjeksiyonunu tanımlamıştır (35). Bu teknikle vokal kord esnekliğinin, vokal kord iyileşmesinin ve ses kalitesinin daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Courey ve ark. (36) benign mukozal lezyon eksizyonu sonunda vokal korda enjekte edilen kortikosteroidlerin, vokal kord skarını azaltabileceğini belirtmiştir. Tavşanlarda, vokal kord hasarı sonrası vokal kord lateraline steroid enjeksiyonu yapılan çalışmanın histopatolojik sonuçlarını analiz eden bir araştırmada steroid enjeksiyonunun kolajen depozitlerini olumlu etkilediği ve skar formasyonunu azalttığı gösterilmiştir (37). Skar dokusu genellikle fibrozisle ilişkilidir. Histolojik çalışmalarda vokal kord skarında mukozal esnekliğin azaldığı izlenmiştir. Fibröz dokuda izlenen skar oluşumunda kolajen depozitlerinin dağınık bir şekilde yerleştiği raporlanmıştır (38). Steroid enjeksiyonunun sitokinlerin sekresyonunu değiştirerek fibrozisi azalttığı, yara iyileşmesi sürecinde ortaya çıkan reaksiyonları yavaşlattığı; vokal kordun vibratuar karakterini sağlıklı düzeyde tutmasına yardımcı olabileceği in vitro çalışmada gösterilmiştir (39).

Yukarıda bahsedildiği gibi kortikosteroidlerin vokal kord hasarı sonrası iyileşme aşamasına olumlu etkileri olmasına karşın, bu patolojik süreci tamamen geri döndürecek bir molekül arayışı devam etmektedir. PRP, içeriğinde bulunan zengin büyüme faktörleri sayesinde doku hasarı sonrası iyileşme potansiyeli olan bir moleküldür. Çalışmamızda vokal kord hasarı oluşturulan tavşanlarda PRP enjeksiyonu yapılmasının, anti-enflamatuvar etkisi ön plana çıkan ve laringeal cerrahiler sonrasında en sık kullanılan kortikosteroid ajan olan deksametazondan histopatolojik olarak daha iyi iyileşme sağlar hipotezini test etmeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, 27.08.2019 tarihli Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul toplantısının 2019/08-11 numaralı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın mali desteği Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tıpta Uzmanlık Programı tarafından TTU-2019-18399 proje kodu onayı ile sağlanmıştır.

Çalışmada 12 adet ağırlıkları 2,9-3,2 kg arasında olan 10 aylık ve üzeri erkek Yeni Zelanda cinsi tavşan kullanılmıştır. Deney hayvanı sayısı güç analizi yapılarak literatüre uygun olarak belirlenmiştir. Cerrahi girişimler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş ve işlem öncesi ve sonrası dönemde burada takip edilmiştir. Çalışma süresince deney hayvanlarının refahı ve rahatı gözetilmiş olup, bütün işlemler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu kurallarına uygun olarak yapılmıştır.

Deneyde kullanılan PRP tavşanlardan otolog olarak elde edilmiştir. Kortikosteroid olarak deksametozon (Dekort 4 mg/mL, Deva Holding, Türkiye) kullanılmıştır.

Deneyin bitirilmesinin ardından elde edilen spesmenlerin histopatolojik incelemesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Deneyde kullanılan tavşanlar 2 gruba ayrılmıştır (Tablo 3.1.) ;

1.grup: 12 adet tavşanın sağ vokal korduna mukozal defekt oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşumunu takiben sağ vokal kord lateraline PRP enjekte edilmiştir. 8 hafta boyunca iyileşme beklenmiş, bu sürede vokal kord hasar onarım mekanizmasına etki edebilecek ek bir işlem veya ilaç uygulaması yapılmamıştır.

2.grup: Aynı 12 adet tavşanın sol vokal korduna mukozal defekt oluşturulmuştur. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşumunu takiben sol vokal kord lateraline deksametazon enjekte edilmiştir. 8 hafta boyunca iyileşme beklenmiş, bu sürede vokal kord hasar onarım mekanizmasına etki edebilecek ek bir işlem veya ilaç uygulaması yapılmamıştır.

Tablo 3.1. Deney grupları

	İşlem	Örnek Sayısı
1.Grup	PRP Grubu (8 hafta)	12
2.Grup	Deksametazon Grubu (8 hafta)	12

3.1. Cerrahi İşlem Tekniği

Çalışmanın cerrahi kısmına başlamadan önce, yapacağımız cerrahi işlemler bir adet daha önceki çalışmalarda kullanılmış ancak deney sürecinde yaşanan problemlerden dolayı çalışmadan çıkartılmış, doğal ömrünün sonuna yaklaşan, Yeni Zelanda cinsi tavşan ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda pilot deney şeklinde uygulanmıştır. Aşağıda anlatılan tüm yöntemler bu tavşan üzerinde denendikten ve deney süreci anlaşıldıktan sonra deney başlatılmıştır.

Tavşanların genel anestezisi için 70 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine hidroklorid karışımı intramusküler olarak kullanıldı. Cerrahi işlemler, ağrılı uyarana yanıt kaybolduktan sonra spontan solunum devam ederken gerçekleştirildi. Tavşanların kalp atış hızları, vücut sıcaklıkları ve oksijen saturasyon seviyeleri monitörize edildi.

PRP elde edebilmek için her tavşanın auriküler veninden, aseptik cerrahi temellere uygun 21 gauge (G) iğne uçlu enjektörle 8.5 mL kan, 1.5 mL sitrat dekstroz içeren tüplere alındı (Şekil 3.1). Her tüpten kan sayımı için 1 mL kan örneği ayrıldı. Kan örnekleri 300 devir/dk 12 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra en alt katmanda eritrositler, orta katmanda beyaz kan hücreleri ve üst katmanda plazmayı barındıran heterojen karışım elde edildi. Üst katmanda yer alan plazma toplanarak PRP

elde edilmesi için steril başka bir tüpe alındıktan sonra 700 devir/dk 15 dakika ikinci bir santrifüj işlemine tabii tutuldu. Santrifüj işleminden sonra oluşan iki tabakalı karışımda üst katmanında trombositten fakir plazma bulunurken, alt katmanda bulunan PRP pipet yardımıyla, içerisinde %10'luk kalsiyum klorid bulunan enjektöre çekildi.

Deney hayvanları 75 mm pediatrik boy laringoskop (1 numaralı Miller laringoskop San Antonio, TX) ile asıldı. 0 derece 2.7 mm pediatrik kulak endoskopunun (Karl Storz Endoscopy) görüşü altında sağ vokal korda kalibrasyonu tamamlanmış monopolar koter yardımıyla 1 saniyenin üzerinde 40 miliamper (mA) elektrokoterizasyonla insizyon yapılarak kordların lamina proprialarına hasar oluşturuldu (Şekil 3.2.-3.3-3.4). Ardından 0.1 ml kadar, 27 G iğne ile, PRP tiroaritenoid kasa enjekte edildi (Şekil 3.5.). Sol vokal korda da aynı şekilde elektrokoterizasyonla insizyon yapılarak hasar oluşturuldu. Takiben 0.1 ml deksametazon (Dekort 4 mg/mL, Deva Holding, Türkiye) enjeksiyonu sol tiroaritenoid kasa yapıldı.



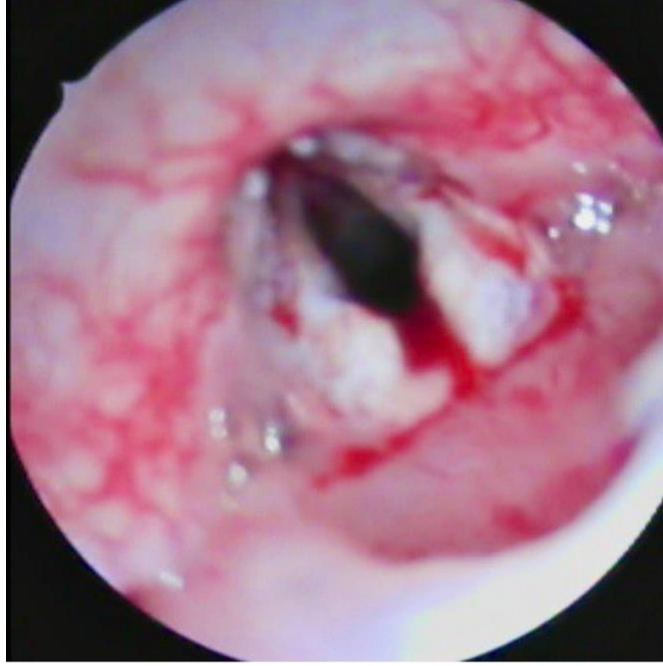
Şekil 3.1. Tavşan Aurikuler venden PRP için kan alınması



Şekil 3.2. Tavşan vokal kordunun sağlıklı görüntüsü



Şekil 3.3. Tavşan vokal korduna 0 derece endoskop altında hasar oluşumu



Şekil 3.4. Tavşan vokal kordunun hasar oluşumundan sonraki görüntüsü



Şekil 3.5. Tavşan vokal kordu hasar oluşumundan sonraki PRP ve deksametazon enjeksiyonu görüntüsü

3.2. Cerrahi Sonrası Dönem

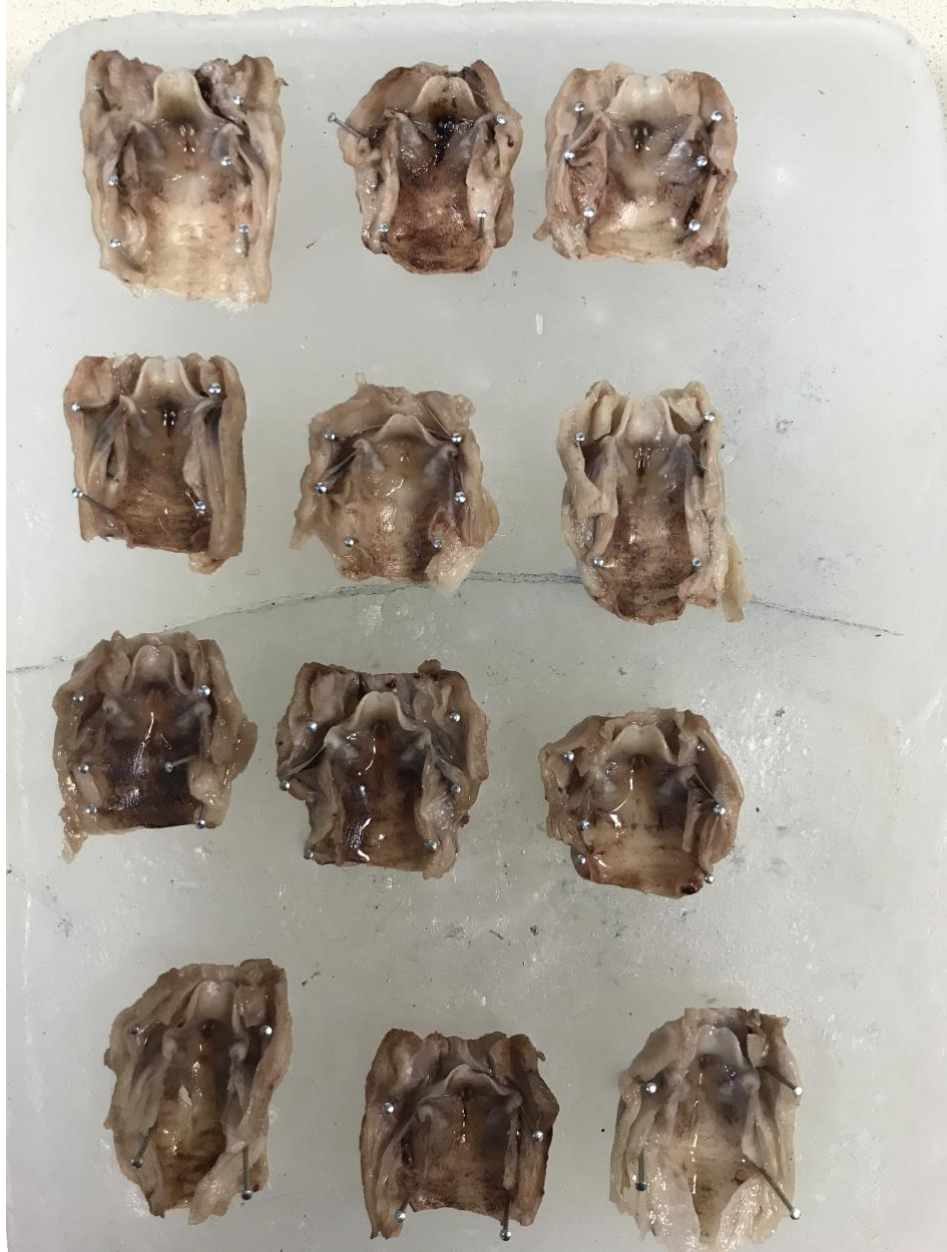
Cerrahi işlemlerden sonra deney hayvanlarında postoperatif komplikasyon izlenmedi. Kafeslerinde serbest dolaşmalarına ve beslenmelerine izin verildi. Ağırlık

değişimi, tüylerde azalma ya da dökülme takibi yapılarak değişimler not edildi. Süreç boyunca herhangi bir enfeksiyon ve komplikasyon izlenmedi.

Tavşanlar 8 hafta kadar takip edildi ve haftalık muayeneleri yapıldı. 8 hafta sonra deney hayvanlarına histopatolojik inceleme için yüksek doz intravenöz sodyum pentobarbital (54 mg/mL, 100 mg/mL; Ceva Sante, Fransa) ile ötenazi yapıldı. Ötenazi yapılan hayvanların boyun ventral kısmına 1,5 cm boyutunda transvers insizyon yapıldıktan sonra submandibular glandlar orta hattan ayrıldı. Sternohiyoid kas laterale ekarte edildikten sonra trakea ve larinks görüldü. İkinci trakea halka arasına insizyon yapılarak trakea ve larinks histopatolojik inceleme için çıkarıldı (Şekil3.6-3.7).



Şekil 3.6. Ötenazi yapılan tavşanlarda larenjektomi görüntüsü



Şekil 3.7. Ötenazi sonrası larenjektomi yapılan larenks spesmenlerinin vertikal görüntüsü

3.2.1. Histopatolojik Değerlendirme

Tavşanlardan elde edilen larinks spesmenleri %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde tespit edildi. Daha sonra Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji

Anabilim Dalı laboratuvarında 5 mikron kalınlığında koronal kesitler alındı ve Hematoksilen-eozin (H&E) ile boyandı. Mikroskopik incelemede ödem; enflamatuar hücre infiltrasyonu, yabancı cisim reaksiyonu, fibrozis ve vasküler organizasyon varlığı değerlendirildi. Elastin, kolajen ve HA dağılımının değerlendirilmesi için histokimyasal olarak Alcian Blue, Masson Trikrom ve Elastin-von-Gieson boyamaları uygulandı. Preparatlar iki ayrı patolog tarafından kör biçimde değerlendirildi. Vaskülarizasyon değerlendirilmesinde, x100 büyütme alanında damar sayıları hesaplandı. Plazma hücresi ve nötrofil lökosit sayısı, ödem ve lenfoid agregat oluşumu, x100 ve x400 büyütme alanında değerlendirildi. Lenfosit sayıları mikroskopik olarak x100 ve x400 büyütme alanında 1-10, 11-50, >50 şeklinde gruplandırıldı. Kolajen ve elastin dağılımları organizasyon açısından H&E, Alcian Blue ve Masson Trikrom boyamalarıyla değerlendirildi, derecelendirildi (0= Normal dağılımı, 1= Organize depozitler 2= Disorganize depozitler, 3= Disorganize ve Azalmış depozitleri) ve skorlandı.

3.2.2. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS Statistics 23) ve R (R package “DescTools” available on CRAN) paket programları kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değişkenlere ilişkin dağılımların normal dağılıma uyup uymadığını test etmek için Shapiro-Wilk uyum iyiliği testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum gibi tanımlayıcı istatistikler verildi. Normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenler için ise ortanca, çeyrekler arası dağılım aralığı, minimum ve maksimum gibi tanımlayıcı istatistikler verildi. Kategorik değişkenler için yüzde değerleri ve frekans tabloları verildi. Sağ ve sol vokal korda uygulanan PRP ve Dekametazon tedavileri arasında sayısal parametreler (vaskülarizasyon ve plazma hücre sayıları) bakımından fark olup olmadığı, parametrik varsayımlar sağlandığı için İki Eş Arasındaki Farkın Önemlilik testi ile incelendi. Sağ ve sol vokal korda uygulanan PRP ve Dekametazon tedavileri arasında iki kategoriden oluşan niteliksel parametreler (nötrofil, ödem vb.) bakımından fark olup olmadığı Bağımlı gruplarda 2×2 Ki-kare testi (McNemar testi) ile incelendi. Sağ ve sol ses teline uygulanan PRP ve Dekametazon tedavileri arasında $k \times k$ kategoriden oluşan niteliksel parametreler (fibrozis, lenfosit vb.) bakımından fark

olup olmadığı Marjinal Homojenlik testi (Stuart-Maxwell testi) ile incelendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

8 hafta sonra sakrifiye edilen deney hayvanlarından elde edilen spesmenler, vaskülarizasyon, plazma hücre sayısı, nötrofil sayısı, lenfosit sayısı, lenfoid agregat, ödem, kolajen, elastin ve HA organizasyonları açısından histopatolojik inceleme ile iki ayrı patoloj tarafından kör şekilde değerlendirildi.

PRP ve deksametazon grupları, vaskülarizasyon açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark bulundu ($t=2.591$; $p=0.025$) (Tablo 4.1).

PRP ve deksametazon grupları, plazma hücre sayısı açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark bulundu ($t= -4.33$; $p=0.001$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. PRP ve deksametazon gruplarının vaskülarizasyon ve plazma hücre sayısı açısından karşılaştırılması

	PRP	Deksametazon	t değeri	p değeri
Vaskülarizasyon	8.75 (\pm 3.74)	5.67 (\pm 2.74)	2.591	0.025
Plazma hücre sayısı	6.5 (4)	10 (8)	-4.33	0.001

Tablo 4.2. PRP ve deksametazon gruplarının karşılaştırılması

		PRP	Deksametazon	p değeri
Nötrofil	Var	11 (%91,67)	11 (%91,67)	$p=1.000 > \alpha=0,05$
	Yok	1 (%8,33)	1 (%8,33)	
Lenfosit sayıları	1-10	6 (%46,2)	7 (%53,8)	$p=0.8465 > \alpha=0,05$
	11-50	1 (%50,0)	1 (%50,0)	
	>50	5 (%55,6)	4 (%44,4)	
Ödem	Var	2 (%15,4)	11 (%84,6)	$p=0.012 < \alpha=0,05$
	Yok	10 (%90,9)	1 (%9,1)	
Lenfoid agregat	Var	7 (%77,8)	2 (%22,2)	$p=0.063 > \alpha=0,05$
	Yok	5 (%33,3)	10 (%66,7)	
Kolajen	Organize kolajen demetleri	8 (%61,5)	5 (%38,5)	$p=0,4346 > \alpha=0,05$
	Disorganize kolajen demetleri	3 (%37,5)	5 (%62,5)	
	Disorganize ve azalmış kolajen demetleri	1 (%33,3)	2 (%67,7)	
Elastin	Organize elastin demetleri	3 (%75,0)	1 (%25,0)	$p=0,08208 > \alpha=0,05$
	Disorganize elastin demetleri	9 (%56,3)	7 (%43,7)	
	Disorganize ve azalmış elastin demetleri	0 (%0,0)	4 (%100,0)	
Kolajen içinde vaskülarizasyon	Yok	0 (%0,0)	6 (%100,0)	$p=0,01111 < \alpha=0,05$
	Seyrek	8 (%61,5)	5 (%38,5)	
	Yoğun	4 (%80,0)	1 (%20,0)	

Nötrofil sayıları bakımından PRP enjeksiyonu ve deksametazon enjeksiyonu arasındaki fark McNemar testiyle değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p= 1.000 > \alpha=0,05$).

Lenfosit sayıları bakımından PRP enjeksiyonu ve deksametazon enjeksiyonu arasındaki fark McNemar testiyle değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p= 0.8465 > \alpha=0,05$).

Lenfoid agregat bakımından PRP enjeksiyonu ve deksametazon enjeksiyonu arasındaki fark McNemar testiyle değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p= 0.063 > \alpha=0,05$).

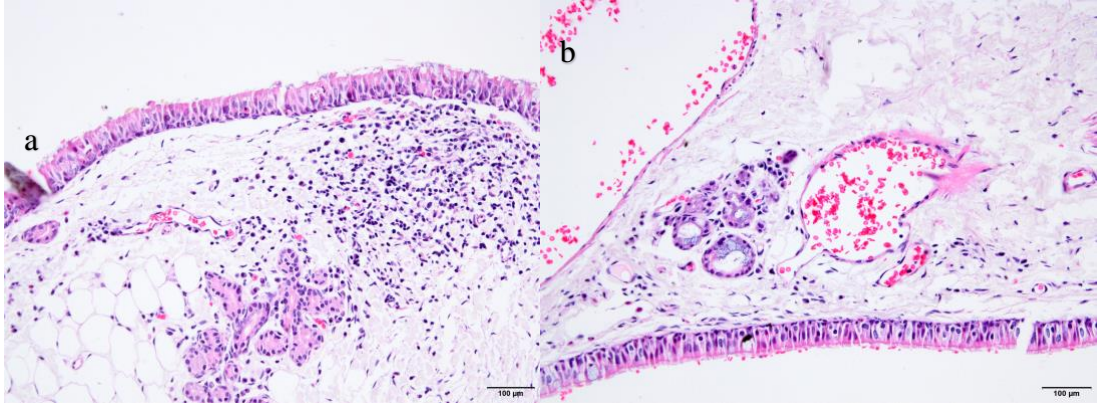
Ödem bakımından PRP enjeksiyonu ve deksametazon enjeksiyonu arasındaki fark McNemar testiyle değerlendirildiğinde PRP grubunda daha az ödem olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p= 0.012 < \alpha=0,05$).

Kolajen organizasyonu ve miktarı bakımından PRP ve deksametazon enjeksiyonu arasındaki fark Stuart Maxwell testi ile değerlendirildiğinde PRP grubunda daha fazla sayıda organize kollajen yerleşimi görülmesine rağmen bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($\chi^2=1,6667$; $p=0,4346 > \alpha=0,05$).

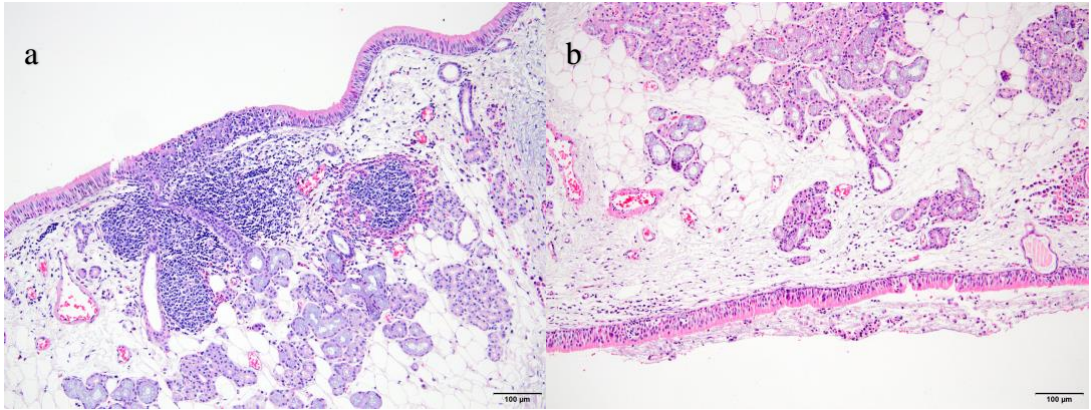
Elastin organizasyonu ve miktarı bakımından PRP ve deksametazon maddeleri arasındaki fark Stuart Maxwell testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($\chi^2=5$; $p=0,08208 > \alpha=0,05$).

Kolajen içerisinde vaskülarizasyon miktarı bakımından PRP ve deksametazon maddeleri arasındaki fark Stuart Maxwell testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($\chi^2=9$; $p=0,01111 < \alpha=0,05$).

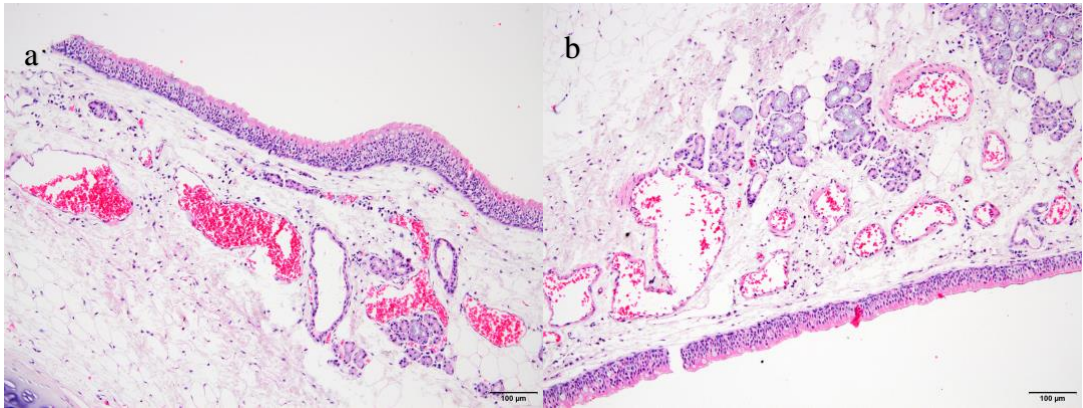
HA miktarı bakımından PRP ve deksametazon grupları arasında bakılan spesmenlerin benzer şekilde iyileşme gösterdiği izlendi.



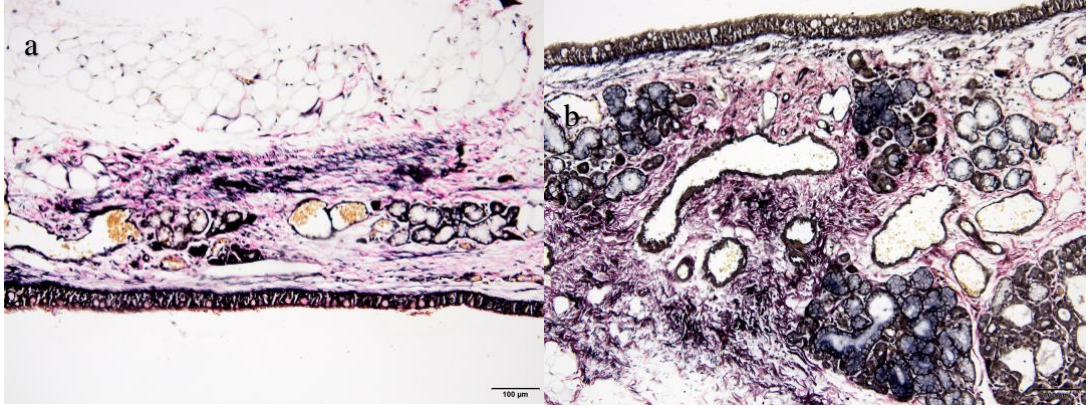
Şekil 4.1. H&E boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) plazma hücresi infiltrasyonu görüntüsü



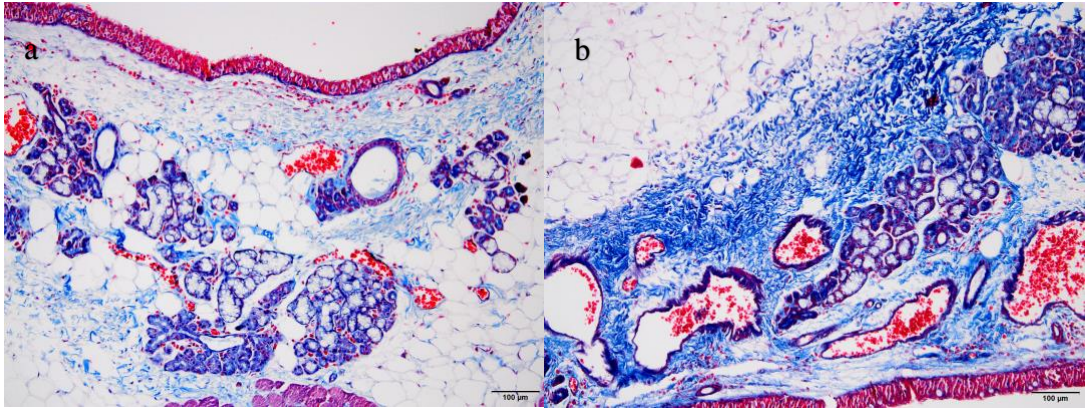
Şekil 4.2. H&E boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) lenfoid agregat görüntüsü



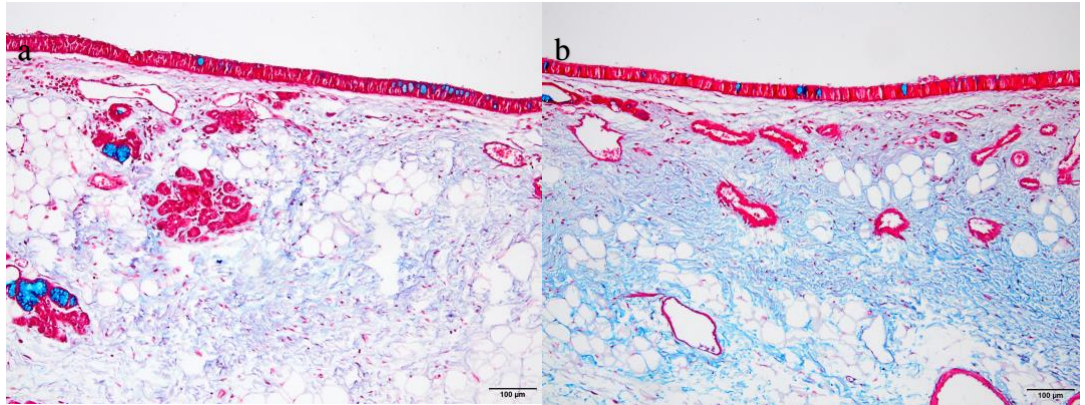
Şekil 4.3. H&E boyama deksametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) vaskülarizasyon açısından karşılaştırılması



Şekil 4.4. Elastin-von-gieson boyama dexametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) elastin açısından görüntüsü



Şekil 4.5. Masson trikrom boyama dexametazon grubu (a) ve PRP grubunun (b) kolajen yerleşimi açısından görüntüsü



Şekil 4.6. Alcien blue boyama (a) dexametazon grubu ve PRP grubunun (b) HA yerleşimi açısından görüntüsü

5. TARTIŞMA

Vokal kord skarı, ses kalitesinin azalmasına yol açan en önemli nedenlerden birisidir (40). Skar oluşumu esnasında görülen mukozal deformite; katmanlı vokal kord lamina propria tabakasının viskoelastik yapısında bozulmaya, vokal kord vibratuar yapılarında esnekliğin azalmasına ve glottik açıklığa neden olur. Vokal kord mimarisinde bozulmayla seyreden bu kompleks hastalığın güncel tedavisinin sonuçları değişken ve yetersizdir. Literatürde, vokal kord skarı ile ilgili insidans ve prevelans değerleri hakkında oldukça az bilgi bulunmakla birlikte, artan mikrolaringolojik prosedürlerin sayısına bağlı olarak yakın gelecekte çözüm ve tedavi arayışı süren majör problemlerden biri olmaya aday olduğu düşünülmektedir (38). Yukarıda bahsedilen seyrin neticesi olarak, temel ve klinik bilimlerde vokal kord skarını anlamaya ve çözümlenmeye yönelik yapılan araştırmalar son yıllarda popülerlik kazanmıştır.

Vokal kord skarı; travma, radyoterapi, laringeal cerrahi, iyatrojenik nedenler, enfeksiyon gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişebilir (1). Vokal kord lamina propriasında meydana gelen skar dokusu, vokal kordun visköz özelliklerinin ve gerilim gücünün değişmesine neden olarak fonasyon esnasında normal mukozal dalga hareketinde bozulmaya yol açar. Ses kısıklığı ve ses yorgunluğuyla kendini gösteren mukozal dalga hareketindeki skara bağlı gelişen bu bozukluk, hastaların hayat kalitesinin azalmasına ve ses sanatçılarının işlerini yapamaz hale gelmesine neden olur. ECM bileşenlerinin vokal kord içerisindeki dağılımlarının ve yoğunluklarının birbiriyle olan ilişkisi, vokal kordun biyomekanik özelliğini korumasına yardımcı olur. Temel bilimler alanında yapılan çoğu çalışma; skar oluşumunun farklı evrelerinde ECM'in bileşenlerini, yoğunluklarını ve dağılımlarını daha iyi anlamaya odaklanmıştır. Bu problematik alanda yapılan klinik çalışmalar ise, vokal kord yağ enjeksiyonu, kolajen uygulamaları ve vokal kordun biyomekanik ve biyolojik özelliklerini geliştirebilecek yeni biyomateryallerle test edilmiştir. Güncel çalışmada, tavşan modelinde vokal kord skarı oluşturulmuş ve skar oluşumunun engellenmesinde sıklıkla başvurulan deksametazon enjeksiyonu ile bu yönteme alternatif olabilecek PRP enjeksiyonu arasındaki farklılıklar, skar oluşumu sürecinde gerçekleşen

moleküler ve mikroskobik değişiklikler histopatolojik düzeyde aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Vokal kord skarı, vokal kord lamina propriasının ECM komponentinin organizasyonundaki değişikliklerle karakterizedir. Bu değişikliklere neden olan başlıca faktörler arasında; kolajen ve elastin demetlerinin miktarının azalması, doku içerisindeki organizasyonlarının bozulması ve HA molekülünün azalması sayılabilir. Vokal kord hasarı sonrası iyileşme sırasında oluşan rejenerasyonun optimal seviyede olması, hasarlı vokal kord ECM bileşenlerinin sentezindeki değişimlere ve bu değişimlere neden olan maddeleri etkileyen tedavilere bağlıdır. Vokal kord fibroblastları ECM organizasyonunda görev alan temel hücrelerdir. Tedavi stratejisinde bu hücre grubunun manipülasyonu, ECM sentezini değiştirebilen güçlü tedavi stratejilerinden bir tanesidir. Doku mühendisliğinde kullanılan büyüme faktörleri, doku iskeletleri ve hücre tedavileri, yara iyileşme sürecinde ortaya çıkan enflamatuvar reaksiyonlara olumlu etki göstermesi nedeniyle vokal kord skar oluşumu engellenmesinde rejeneratif yaklaşım için alternatif tedaviler olarak denenmektedir. Bu amaçla laboratuvar şartlarında çalışılan TGF-B, ineklerden elde edilen aselüler doku iskeletleri, fibroblastlarla yapılan çalışmalar, insan Mezenkimal kökenli kök hücre (MKKH) ve Adipoz kökenli kök hücre (AKKH) uygulamaları ve daha birçok madde bu gruba örnek verilebilir (41). Skar dokusunda rejeneratif potansiyelleri deneysel çalışmalarla gösterilmiş olmasına rağmen bu moleküllerin rutin kullanılması; etik sorunlar ve güvenlik endişeleri, uygulandıkları dokularda neden oldukları immün yanıtlar hakkında az veri olması, tümör oluşumuna neden olup olmadıklarıyla ilgili tartışmalı sonuçların varlığı, ticari preparatların sayısının az ve ulaşılabilirliğinin zor olmasından dolayı klinik uygulamalarını tartışmalı kılmaktadır.

Tavşan veya rat gibi küçük hayvan modellerinde oluşturulan vokal kord hasarı sonrası iyileşme döneminin incelendiği çalışmalarda doku mühendisliğinin de katkılarıyla yeni tedavilerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. İyi kurgulanmış deneysel prosedürlerde, vokal kord hasarı öncesinde ya da sonrasında olmak üzere yara iyileşmesini olumlu etkileyebileceği düşünülen materyal, farklı zamanlarda kullanılabilir. Hayvanlarda yapılan pek çok deneysel modelde vokal kord skarı yaratılmaya çalışılmıştır. Ortaya çıkan skar boyutu yöntemden yöntem farklılık

göstermekle birlikte kullanılan deney hayvanı larinks boyutlarının, insan vokal kord boyutlarından çok daha küçük olması mümkün olan optimal cerrahi engellemektedir. Bu yöntemler arasında Kojima ve ark. (42) tarafından tavşanlarda yapılan mikroflep elevasyon tekniğiyle oluşturulmuş hasar sonrasında vokal kord iyileşmesinde skar dokusu minimal izlenmiş ve vokal kordun vibratuar fonksiyonlarının bir hafta içerisinde normale döndüğü rapor edilmiştir. Bu nedenle skar oluşturmak için daha farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Deney hayvanı modelinde ideal vokal kord hasarı oluşturma yöntemi olarak cupped forseps biyopsi denenmiştir. Bu alet ile yaratılan mukozal defektin boyutu teorik olarak kullanılan forsepsin boyutlarına bağlıdır. Fakat pratikte bakıldığında, vokal kord mukozasının oldukça esnek olmasından ve defekt yaratma esnasında hasarın kesme eyleminden ziyade yırtılma ile oluşmasından ötürü, cupped forceps boyutundan daha büyük defektler görülmüştür. Küçük hayvan modellerinde oluşturulan bu kontrolsüz vokal kord hasarı yöntemleri, abartılı bir yara iyileşme yanıtı üreterek yanıltıcı sonuçlara neden olabilir. İdeal vokal kord hasar modellerinde tiroaritenoid kasın korunduğu ve hasarın vokal kord lamina propriası ile sınırlı kalması arzulanır. Bu temeller ışığında, güncel laringoloji cerrahi pratiğinde sıkça kullanılan lazer veya elektrokoagülasyon yöntemiyle oluşturulan hasar daha kontrollü bir yaralanma oluşturması nedeniyle bir adım öne çıkmaktadır (43). Bu nedenle çalışmamızda bütün deney hayvanlarına eşit boyutlarda ve koşullarda doku hasarı yaratabilmek ve hasarın seviyesini deney hayvanlarında optimize etmek için elektrokoagülasyon yöntemi tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesini ve skar oluşumunu etkileyen birçok sitokin ve büyüme faktörü bulunmaktadır. Bu faktörler arasında yer alan HGF, yara iyileşmesi sırasında antifibrotik aktivite gösterdiği için son zamanlarda önemli ölçüde dikkat çekmiştir (7). Yara iyileşmesi sırasındaki ana işlevi ECM düzenlenmesinden sorumlu proteaz aktivitesini stimüle etmek ve stromal epitelyal etkileşim yoluyla epitelyal ve endotelyal hücreleri rejenere etmektir. Hirano ve ark. (44) tarafından köpek vokal kordu fibroblastları ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilen çalışmada, HGF'nin HA üretimini stimüle ettiği ve kolajen tip I üretimini baskıladığı bulunmuştur. Yine aynı araştırmacılar tarafından daha sonraki yıllarda *in vivo* ortamda hasarlı vokal kord lamina propriası ile yapılan çalışmada HGF'nin aşırı kolajen depoziti oluşmasını

engellediği bulunurken, kontrol grubunda daha yoğun kolajen birikimleri olduğu gösterilmiştir (7). Elde edilen bu sonuç; HGF'nin fibroblastlar üzerinde gösterdiği HA üretiminin stimülasyonu ve kolajen üretiminin süpresyonu ile açıklanmıştır. Ayrıca elastin organizasyonunun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında HGF uygulanan tarafta daha düzenli olduğu bulunmuştur. Hayvan deneylerinde umut vadeden sonuçların yayınlanmasının ardından klinik pratikte ve insanlar üzerinde deneyler yapılması gereksinimi duyulmuştur. Bu gereksinim, Hirano ve ark. (45) matür skar dokusu bulunan 18 insanda yaptıkları faz I/II çalışması ile karşılanmıştır. Sulkus vokalis veya vokal kord skarı nedeniyle tedavi edilen hastalara, üç farklı doz içeren HGF enjeksiyonları yapılmıştır. Enjeksiyondan 1. 2. ve 6. ay sonunda hastalara ses analizi yapılmıştır ve HGF'nin intrakordal kullanımının güvenliğiyle ilgili sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışma süresinde hastaların hiçbirisinde ilaca bağlı reaksiyon gelişmediği için HGF kullanımının güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen ses analizi sonuçlarında da düzelme olması nedeniyle, HGF enjeksiyonu ile faz III çalışması ve kontrol grubu içeren çalışmaların yapılması planlanmıştır. Ancak insan üzerinde dizayn edilen çalışmaların histopatolojik incelemesinin yapılamaması, bu konuda yapılan araştırmaları kısıtlamaktadır. Yukarıda bahsedilen avantajlarına rağmen HGF gibi büyüme faktörlerinin dezavantajları ve çözülmeyi bekleyen birkaç sorun vardır. Bunlardan bir tanesi HGF'nin yüksek maliyetlerle elde edilmesi ve enjeksiyon sırasında refakatçi sentetik malzemelere ihtiyaç duyulmasıdır. Diğer dezavantajı yara iyileşme sürecinin tek bir büyüme faktörüyle ilişkilendirilemeyecek kadar kompleks ve karmaşık bir dizi reaksiyonla gerçekleşmesidir. Son olarak; HGF uygulamasının dozajı, zamanlaması ve uygulanan dokudaki etki süresinin tam olarak bilinmemesi bu faktörün rutin klinik uygulamadaki yerini tartışmalı kılmakla beraber ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Vokal kord skar tedavisinde rejeneratif yaklaşımlar birçok hayvan deneyi modelinde test edilmiştir. MKKH ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda kök hücre rezervi açısından yoğun olan kemik iliği veya adipoz doku tercih edilmektedir (46). MKKH, immünomodülatör, anti-enflamatuar ve T-hücre yanıtını baskılayıcı özelliği olan; kemik, yağ dokusu, kıkırdak doku ve miyelodestek bağ doku gibi mezenkim kaynaklı dokulara dönüşme potansiyeli olan pluripotent hücrelerdir. Vokal

kord hasarı sonrası skar oluşumunun önüne geçilmesi adına ilk kullanım fikri; renal, nöral ve akciğer parankiminde hasar oluşturulduktan sonra, intravenöz MKKH uygulanan deney hayvanı çalışmalarında gösterilen anti-enflamatuar ve immünomodülatör etkili sitokinlerin sentezini arttırmasıyla bulunmuştur (6). Bu çalışmaları takiben, Kanemaru ve ark. (47, 48) köpek vokal kord deney modelinde kemik iliğinden kök hücre toplayıp bu hücreleri kültür ortamında yaşatmışlardır. Kültür ortamında yaşatılan MKKH'ler daha sonra hasar oluşturulan vokal korda, kolajen koruyucu doku iskeleleri ile birlikte enjekte edilmiştir. İki ay sonra histopatolojik inceleme için sakrifiye edilen deney hayvanlarının, deney grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında deney grubunda daha az skar oluşumunun izlendiği rapor edilmiştir. Morfolojik inceleme yapıldığında ise deney grubunda atrofi, granülom gibi iyileşme bozuklukları daha az görülmüştür. Daha sonra Hertegard ve ark. (6) vokal kord skarı oluşturdukları 12 adet tavşanın vokal kord lateraline insan kökenli MKKH enjekte etmişlerdir. Deney hayvanlarına immünsüpresif ilaç (Tacrolimus) verilerek gelişebilecek immün reaksiyonların önüne geçilmiştir. Cerrahi prosedürden sonra 4 hafta izlenen hayvanlar sakrifiye edilmiş histopatolojik ve immünohistokimyasal preparatları hazırlanmıştır. Ek olarak hasar oluşturulmuş vokal kordların viskoelastik ölçümleride yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; MKKH uygulanan tarafta reolojik veriler daha iyi bulunmuş, immünohistokimyasal boyama sonucunda skar oluşumu öncüsü olarak kabul edilen kolajen tip 1 miktarında azalma tespit edilmiştir.

Vokal kord skar oluşumunun engellenmesi için deneysel çalışmalarda sıkça kullanılan diğer rejeneratif molekül AKKH'dir. AKKH, immünomodülatör etkileri ve hücre farklılaşması özellikleri nedeniyle doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Yağ dokudan elde edilen multipotent hücreler açısından zengin olan AKKH, skar formasyonunun engellenmesinde ve hasarlı vokal kordun rejenerasyonunda tedavi potansiyeli taşımaktadır (49). Lee ve ark. 10 adet deneğin kullanıldığı kanin hayvan modelinde vokal kord hasarı oluşturmuş ve inguinal bölgeden elde ettikleri AKKH'leri doku iskeletiyle birlikte deney hayvanlarının sağ vokal korduna enjekte etmiştir (50). Hasar oluşumundan 6 ay sonra histopatolojik ve morfolojik değişiklikler kaydedilmiştir. Deneklerin laringoskopik bulgularında; deney grubunda granülasyon

dokusu oluşumunun ve atrofik değişikliklerin kontrol grubuna göre daha az olduğu raporlanmıştır. Daha sonra ötenazi yapılan deney hayvanlarının vokal kordlarında AKKH varlığı araştırılmıştır. Histopatolojik incelemenin sonucu olarak AKKH'lerin 6 ay kadar enjekte edildikleri alanda kaldığı ve iyileşme sürecine aktif yardımcı oldukları bulunmuştur. Goel ve ark. tarafından yapılan çalışmada; vokal kord lamina propriası rezeke edilen 4 adet dişi tavşanın, erkek tavşan yağ dokusundan elde edilen AKKH'leri fibrin jelle sarılarak vokal kord serbest kenarına implante edilmiştir (51). 4 hafta sonra PCR ve in situ hibridizasyonla vokal kordda Y kromozomu varlığı araştırılmıştır. 4 hafta sonra yapılan incelemede, Y kromozomu taşıyan tavşana ait AKKH'ler implante edilen vokal kordda tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucu olarak, implante edilen AKKH uzun süre dokuda kalarak uzamış hücresel onarım basamaklarına katkıda buldukları için vokal kord skar oluşumunun engellenmesinde faydalı olduğu belirtilmiştir. Morusaki ve ark. tarafından vokal kordun lamina propria tabakası hasarı oluşturulan sıçanlarda, tirohiyoid kasa AKKH enjeksiyonunun gen ekspresyonuna ve translasyonuna olan etkileri araştırılmıştır (52). Enjeksiyon zamanından 3, 14 ve 56 gün sonra sıçanların larinksleri çıkarılarak histopatolojik inceleme yapılmıştır. Gen ekspresyonlarını ve translasyonlarını incelemek için ise enjeksiyondan sonra 3. ve 14. günlerde kuantitatif PCR yapılmıştır. Yapılan değerlendirmede implante edilen AKKH yalnızca 3. günde laringeal dokularda izlendiği raporlanmıştır. 14. ve 56. günlerde yapılan histopatolojik çalışmada; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında AKKH enjekte edilen grupta daha yüksek miktarda HA ve daha organize yerleşimli kolajen demetleri olduğu bildirilmiştir. Yapılan kuantitatif PCR çalışmasında ise, AKKH grubunda prokolajen (1a1-1a3) ve matriks metalloproteinaz (Mmp1-Mmp8) seviyelerinin bütün zaman dilimlerinde daha az eksprese edildiği bulunmuştur. 14. gün sonuçları; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında HGF ve fibroblast büyüme faktörü seviyeleri AKKH grubunda daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, vokal kord hasarı sonrası iyileşme döneminde AKKH enjeksiyonunun, düzensiz kolajen demetleri oluşumunu azalttığı, fibroblast büyüme faktörü ve HGF seviyesini arttırdığı bulunmuştur. Enjekte edilen dokuda 14 günden fazla yaşayamayan AKKH'nin, çevre dokularda yerleşen hücrelerde büyüme faktörü genlerini arttırarak yara iyileşmesi sürecine etki ettiği düşünülmüştür.

AKKH'nin donör vücudunda bol miktarda bulunması, kolay elde edilmesi, daha fazla proliferatif etkisinin olması ve aynı doku miktarında KKKH'ne oranla 500 kat fazla hücre elde edilebilmesi KKKH ile karşılaştırıldığında önemli üstünlükleridir (53). Ek olarak AKKH'lerin HGF gibi bazı diğer güçlü antifibrotik molekülleri içerisinde barındırdığı rapor edilmiştir (54). Kronik vokal kord skar oluşumuna AKKH ve KKKH tedavilerinin etkinliklerini inceleyen araştırmada; histolojik rejenerasyon ve lamina propria tabakasındaki hücrelerin gen ekspresyonları sıçanlarda karşılaştırılmıştır (55). Histolojik olarak yapılan değerlendirmede her iki molekülün benzer iyileşme sağladıkları bulunurken, AKKH'lerin Has1, Has2 ve HGF gen ekspresyonlarını daha fazla arttırdığı rapor edilmiştir. Bu bulguların ışığında AKKH'lerin HA üretimini arttırabileceği ve vokal kord skar oluşumunda antifibrotik özellik gösterebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Vokal kord skar oluşumu engellenmesinde deneysel modelleme yapılan büyüme faktörlerinden bir diğeride FGF-b'dir. FGF-b, endotelial hücreler ve fibroblastlar için mitojenik etki gösterir ve bu hücrelerin kemotaksisinden sorumlu moleküllerden bir tanesidir. Anjiogenezin artışı, mezoderm kökenli hücrelerin hareketini ve ECM dağılımını düzenlemekte görev alır. Yara iyileşmesine sağladığı katkılarında ötürü, yanık hastalarında ve cilt ülserlerinde oldukça yaygın kullanılır. Bu özelliklerinden dolayı literatürde vokal kord skar tedavisinde in vivo ve in vitro araştırmalarla etkisi test edilmiştir. Vokal kord hücre kültüründe yapılan gen ekspresyon deneyinde; FGF uygulanmasının, HGF sentetazı arttırdığı, Prokollejen I oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (56). Yapılan in vivo deneylerden; Suehiro ve ark. (57) köpek modellemesinde oluşturdukları vokal kord hasarı sonrası skar oluşumunun tedavisinde FGF-b etkisini incelemiştir. Beagle cinsi sekiz adet köpeğin unilateral vokal kord mukozasında direkt laringoskopi altında hasar oluşturulmuştur. Deney hayvanlarının dört tanesine vokal kord hasar oluşumundan 1 ay sonra lokal enjeksiyon ile FGF-b tedavisi uygulanmıştır. Serum fizyolojik enjekte edilen diğer dört beagle ise kontrol grubu yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde FGF-b grubunda daha az skar dokusu olduğu izlenmiştir. 45 adet Sprague-Dawley cinsi rat barındıran örneklem grubuyla yapılan başka bir deney hayvanı modellemesinde ise, FGF-b enjeksiyonu hasar oluşumunu takiben uygulanmıştır (58). Cerrahi prosedürle vokal

kord hasarı oluşumundan iki ay sonra sakrifiye edilen deney hayvanlarında yapılan histopatolojik incelemede; HA seviyesinde yükselme, kolajen depozitlerinde azalma tespit edilmesi neticesinde FGF-b'nin vokal kord hasarı sonrası akut enjeksiyonunun vokal kord skar oluşumunu engellemede başarılı olduğu düşünülmüştür.

FGF-b enjeksiyonunun vokal kord hastalıklarındaki etkileri klinik çalışmalarla da test edilmiştir. Çeşitli vokal kord patolojilerine bağlı ses kısıklığı olan hastalardan FGF-b enjeksiyonu yapılanlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir (59). Vokal kord atrofisi olan 43 hasta, vokal kord skarı olan 41 hasta, sulkus vokalis olan 16 hasta olmak üzere toplam 100 hastaya intrakordal FGF-b enjeksiyonu yapılmıştır. On mikrogram TGF-b içeren solüsyon topikal anestezi altında vokal kord laterale enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrasında bir yıl kadar takip edilen hastalar videolaringostroboskopi ile muayene edilmiş, maksimum fonasyon zamanı ve ses handikap indeksi parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Ses handikap indeksinin ve maksimum fonasyon zamanının bütün hasta gruplarında belirgin olarak düzeldiği bulunmakla birlikte en iyi etkiyi vokal kord atrofisi olan hastaların gösterdiği raporlanmıştır. Çalışma süresince yan etki görülmeyen hastalarda, intrakordal FGF-b enjeksiyonunun vokal kord skar ve vokal kord atrofisi hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Mitomisin - C (MMC) vokal kord skarı ve subglottik stenoz oluşumunu engellemek için kullanılan, fibroblast proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş anti-metabolit bir maddedir. Subglottik stenoz tedavisinde olumlu sonuçlar elde edilmekle birlikte vokal kord hasarı sonrası iyileşme dönemini araştıran çalışmalarda vokal kord vibratuar paterninde negatif sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir (7). Garrett ve ark. (60) köpek vokal kordunda hasar oluşturduktan sonra topikal MMC uygulamasının yapıldığı çalışmada fibroblastların azaldığı, kolajen depozitlerinin organizasyonunun bozulduğu ve lamina propriada mukozal dalga hareketinin azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar; MMC uygulamasının fibroblast proliferasyonunu inhibe ettiği, kolajen sentezini ve optimal vibrasyon yeteneği için gerekli olan diğer interstisyel proteinlerin sentezini de azalttığını göstermektedir. Gray ve ark. (61) tarafından ratlarda cilt hasarı sonrası topikal MMC uygulamasının yapıldığı deneysel çalışmada; dermal fibroblastlardaki elastaz, hiyaluronidaz ve prokolajen sentezleyen genlerin down-

regülasyonuna neden olarak yara iyileşme sonuçlarını olumsuz yönde etkilediği raporlanmıştır. Bu nedenle MMC'nin vokal kord hasarında kullanımı tartışmalıdır.

Güncel klinik pratikte vokal kord skar oluşumunu engellemek için yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemlerinden birtanesi de kortikosteroid enjeksiyonudur. Vokal kord hasarı sonrasında yapılan kortikosteroid enjeksiyonunun glottik kapanmayı iyileştirdiği, ses kalitesini arttırdığı ve vokal kordun elastiki yapısının korunmasında etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (62). Bu nedenle vokal kord skar oluşumunun engellenmesinde PRP etkilerini araştırdığımız çalışmamızda; laringoloji klinik pratiğinde faydalı etkilerinden oldukça geniş yelpazede yararlanan deksametazonla karşılaştırmanın uygun olduğunu düşündük.

Kortikosteroidler yara iyileşme sürecindeki etkilerini kolajen matürasyonunu ve sentezini etkileyerek, yara dokusunun direncini değiştirerek, fibroblastların fonksiyonlarını inhibe ederek, hasar yerine ulaşan defans hücrelerinin fagositik ve antibakteriyel özelliklerini süprese ederek yaparlar. Kortikosteroidler, yara oluşumunun ilk dört gün içerisinde gerçekleşen reaksiyonlara etki gösterdikten sonra zamanla etkileri minimuma iner. Yapılan çalışmalara göre; hasar oluşumundan sonraki 2 ile 3 gün içinde hasar oluşumunu azaltabilecek maddelerin uygulanması, ECM komponentlerini sentezlemeye başlayan fibroblastları ve enflamatuar hücreleri etkileyerek vokal kord skarında oluşabilecek direncin azalmasında kritik yere sahiptir (5, 63). Tateya ve ark. (5) tarafından yapılan çalışma, HA, kolajen ve fibronektin gibi ECM bileşenlerinin yapılan insizyondan hemen sonra üretilmeye başlandığını ve hasardan sonraki üçüncü ve beşinci günler arasında daha belirgin olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar; vokal kord hasarı sonrası fibröz skar oluşumunun engellenmesini sorgulayan araştırmalar için, optimum tedavi zamanının hasar oluşumundan sonraki akut periyodun daha önemli olduğu sonucuna götürmüştür. Bu nedenle, skar oluşumunun önlenmesini amaçlayan araştırmalarda, uzun süreli kortikosteroidlerin uygulanması için ideal zaman, enflamatuar sürecin başlangıcı, yani hasar oluşumunu takiben yapılmasıdır. Vokal kord hasar oluşturma modellerinde yapılan yukardaki araştırmalar temel alındığında güncel çalışmada da hasar yaratılmasının hemen ardından yara iyileşme fazının akut döneminde PRP ve deksametazon enjeksiyonu yapılmıştır.

Hayvan deneyi çalışmalarında anti-enflamatuar etkisi, kolajen sentezinin azalması, glikozaminoglikan sentezi artışı ve fibroblast proliferasyonu gibi birçok olumlu etkileri gösterilen deksametazon enjeksiyonu, vokal kord cerrahisi sonrası skar oluşumunun engellenmesinde günümüz laringoloji pratiğinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (64). Mortensen ve Woo (65) tarafından vokal kord skarına yönelik poliklinik ortamında lokal anestezi altında deksametazon enjeksiyonu yapılan çalışmada, 12 hastanın 11 tanesinde videostroboskopik olarak daha iyi muayene bulguları elde edilmiştir. Young ve ark. (66) çeşitli etiyolojik faktörlere bağlı gelişen vokal kord skarı nedeniyle deksametazon enjekte edilen hastaları retrospektif olarak analiz etmiştir. Yapılan çalışmada, poliklinik şartlarında deksametazon enjekte edilen hastaların aerodinamik özellikleri, akustik özellikleri gibi kapsamlı testlerle birlikte VLS muayene görüntüleri incelenmiştir. Deksametazon enjeksiyonu sonrası ses analizi ve VLS yapılan hastaların preoperatif dönemle karşılaştırılan ses handicap indexi ve glottik gap düzeylerinde istatistiksel olarak anlam ifade eden sonuçlara erişilmiştir. Çalışmamızda elden edilen verilerin sonucunda, vokal kord skarı tedavisinde sıkça başvurulan ve faydalı sonuçlarının birçok makalede gösterildiği deksametazon yerine, büyüme faktörleri açısından zengin, hastanın kanından hızlıca ve kolayca elde edilebilen, maliyeti düşük, anti-enflamatuar özelliği gösterilmiş ve bilinen yan etkisi bulunmayan PRP enjeksiyonunun poliklinik şartlarında enjekte edilebilir yeni bir materyal olabileceğini düşündürmektedir.

Coleman ve ark. (4) lateral mikroflep oluşturduktan sonra sağ vokal korda triamsinolon enjeksiyonu sol tarafa da aynı tip hasar oluşturduktan sonra kontrol grup olarak dizayn ettikleri araştırmada; triamsinolon uygulanan tarafta 2, 4 ve 6. haftada yapılan değerlendirmede enflamatuar hücre infiltrasyonunda artış tespit etmiştir. Bu çalışmada triamsinolon enjeksiyonu, vokal kordda enflamatuar hücre yanıtında 12 günlük gecikme ve vaskülarizasyon yanıtının oluşmasında 21 günlük gecikmeye neden olmuştur. Çalışmamızda her iki deney grubunda da hasar oluşumundan 8 hafta sonra histopatolojik inceleme yapılmasından dolayı erken enflamatuar yanıtta gecikmeye neden olduğu ile ilgili bir yargıya varamamaktayız. Ancak, PRP ve deksametazon enjeksiyonu yapılan vokal kordda enflamatuar hücre sayısı değerlendirildiğinde; plazma hücre infiltrasyonu PRP grubunda, deksametazon

grubuna göre daha az elde edilmiş ve bu farkın istatistiksel değerlendirilmesi anlamlı bulunmuştur. PRP grubunda görülen plazma hücre sayısının az olması, PRP maddesinin içinde bulundurduğu zengin büyüme faktörleri ve anti-enflamatuar sitokinlerin, deksametazondan daha fazla anti-enflamatuar yanıtı neden olmasından dolayı olabilir. PRP ve deksametazon grubu; enflamasyon oluşumu basamaklarında yer alan ödem oluşumu açısından değerlendirildiğinde, PRP grubunda daha az ödem varlığı tespit edilmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Enflamasyon ve skar oluşumu denklemine rol alan plazma hücre sayısı ve bu durumun sonucu niteliğinde gerçekleşen ödem oluşumunun PRP grubunda daha az olması çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin sağlaması niteliğindedir. PRP ve deksametazon enjeksiyonlarının vaskülarizasyona etkisi karşılaştırıldığında PRP grubunda daha fazla vaskülarizasyon gözlenmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Vaskülarizasyon artışı enflamatuar hücrelerin kemotaksisini kolaylaştırıcı bir faktör olmakla birlikte enflamasyonu arttırıcı rol de oynayabilir. Ancak PRP'nin içinde vaskülarizasyon artışına katkı sağlayan VEGF gibi güçlü büyüme faktörlerinin bulunması, PRP grubunda daha fazla vaskülarizasyon elde edilmesiyle sonuçlanmış olabilir. PRP ile yapılacak ileriki çalışmalarda VEGF gibi anjiojenik özellik gösteren moleküllerin genetik ve moleküler düzeyde incelenmesi aydınlatıcı olabilir. Lenfosit sayısı açısından grupların değerlendirilmesinde ise PRP grubuyla benzer sayılar elde edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Bilindiği gibi kortikosteroidler kan hücrelerinde nötrofil ve eritrosit sayılarını arttırırken, lenfosit, bazofil ve monosit sayılarını azaltmaktadır. Çalışmamızda, PRP ve deksametazon gruplarında elde ettiğimiz yakın sayılar, PRP enjeksiyonunun lenfositler üzerinde deksametazon enjeksiyonuyla benzer etkinlik gösterdiğini düşündürebilir. Bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı çıkmayan bu bulguyla alakalı örneklem büyüklüğü daha fazla olan çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Lenfoid agregat açısından değerlendirildiğinde PRP enjeksiyonu yapılan grupta, deksametazon enjekte edilen gruba göre daha fazla lenfoid agregat görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, tavşan vokal kord hasarı sonrası PRP ve deksametazon enjeksiyonunun anti-enflamatuar özelliklerinin birkaç parametre (plazma hücresi ve vaskülarizasyon) dışında benzer olduğunu düşünmekteyiz.

PRP gibi ortaya çıkan yeni tedaviler, standardize edilmiş, uygun tedavi planı kurulmasında yardımcı rol oynayabilir. Otolog PRP'nin yumuşak doku iyileşmesinde kullanılması, son yirmi yıldır bu problematik alanda büyük ilgi toplamış bir araştırma konusudur. PRP içerisinde yüksek konsantrasyonlarda büyüme faktörü mevcuttur. Bunların en önemlilerinden bazıları PDGF, TGF-b, VEGF, EGF ve IGF'dir. PDGF, TGF-b, VEGF ve EGF'nin otolog PRP'de bazal seviyelere kıyasla 3 ile 7 kat arttığı gösterilmiştir (67). PRP'nin yumuşak doku iyileşmesini başlattığı ve düzenlediği gösterilmiş; yapılan in vitro araştırmalarda trombositlerin yara iyileşmesi için gerekli bileşenleri ve elemanları içerdiği bildirilmiştir (68). Literatürde in vivo prospektif kontrollü çalışmalarda ve retrospektif araştırmalarda PRP tedavisinin yara iyileşmesinde olumlu etkilerini rapor eden çalışmalar yayınlanmıştır (69-72). Biyolojik olarak uyumlu olması ve doku içerisinde ayrışabilen özellikleri sayesinde, PRP enjeksiyonu yapılan dokuda yabancı cisim reaksiyonu, doku nekrozu veya fibrozis oluşumu görülmemiştir (73-76). PRP'nin maliyet etkin bir seçenek olması, ameliyat esnasında kolayca elde edilebilir olması, hasarlı dokuda hızlıca kullanılabilir olması, yabancı cisim reaksiyonu ve doku nekrozu oluşturmaması nedeniyle yaptığımız bu çalışmada PRP'yi tercih ettik.

Çalışmamızda vokal kord skarının önlenmesinde PRP'nin ve deksametazonun etkisi tavşan modelinde test edilmiştir. Otolog PRP'nin hazırlanması ortalama 45 dakika sürmüştür. Anitua ve ark. (77) doku hasarı sonrası otolog trombositlerin etkisini araştırdığı çalışmada belirttiği efektif ortalama trombosit konsantrasyonu olan 1.300.000 trombosit / mm³ güncel çalışmada da benzer konsantrasyonda elde edilmiş ve uygulanmıştır. Woo ve ark. (78) tarafından 12 adet tavşanda vokal kord hasarı sonrası PRP enjeksiyonu yapılmış olup; bu tavşanların iki tanesinde 14. günde Western blot testi ile vokal korddaki büyüme faktörlerinin miktarına bakılmıştır. PDGF, TGF-B, VEGF ve EGF düzeylerinin PRP enjeksiyonu yapılan vokal kord grubunda cerrahiden 14 gün sonra belirgin seviyede daha yüksek olduğu gösterilmiş; PRP'nin büyüme faktörü açısından zengin olduğu ve vokal kord rejenerasyonunu artırıcı özelliği olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak 12 hafta sonra sakrifiye edilen deney hayvanlarında aynı büyüme faktörlerinin ekspresyonlarında izlenen artış görülmemiştir. Bu durum, PRP'nin vokal kord hasarı sonrası ortaya çıkan iyileşme

fazının erken dönemine etki etmesi ve bu etkinin uzun dönemde azalarak kaybolması ile açıklanmaktadır. Muhtemelen trombositler büyüme faktörlerini salgıladıktan sonra erken fazda diğer büyüme faktörlerini ortamdaki çekmektedir. Bizim çalışmamızda büyüme faktörlerinin miktarları moleküler düzeyde ölçülmemiş olmakla birlikte; vaskülarizasyon artışının PRP grubunda daha yüksek olmasını dolaylı olarak büyüme faktörleri artışının sağladığı bir etki olarak kabul etmekteyiz. Skar oluşumunun anahtar evresi olarak kabul edilen erken dönemde tekrarlayan PRP enjeksiyonu uygulamaları uzun dönemde azalmış olan büyüme faktörü miktarının yüksek seyretmesine yardımcı olarak vokal kord iyileşmesine katkı sağlayabilir. PRP ve deksametazon enjeksiyonun tekrarlayan dozajlar şeklinde uygulandığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Büyüme faktörlerinin yabancı cisim reaksiyonunu, doku nekrozunu ve aşırı fibrozis oluşumunu engellediği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (74-76). Çalışmamızda hem deksametazon uygulanan grupta hem de PRP uygulanan grupta yabancı cisim reaksiyonu ve doku nekrozu gibi enjekte edilen materyale bağlı doku reaksiyonları izlenmemiştir. Kortikosteroidlerin uzun yıllardır vokal kord skar engellenmesinde güvenle kullanıldıkları göz önüne alındığında; elde edilen bu sonuçlarla PRP kullanımının güvenli olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Çalışmamızda hasar oluşumunu takiben PRP enjeksiyonu yapılan tavşan vokal kordunda düzenli ve organize kolajen yerleşiminin oransal olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir. Deksametazon uygulanan tarafta ise PRP grubuyla karşılaştırıldığında organize ve düzenli kolajen adalarının sayısı daha az olarak izlenmiştir. Oransal olarak PRP'nin daha düzenli ve organize kolajen yerleşimini sağladığı gösterilmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kolajen üretimi ve düzenlenişi, vokal kord hasar oluşumu sonrasında uzun dönemlerde devam etmektedir. Bizim çalışmamızda vokal kord hasarından 8 hafta sonra histopatolojik inceleme yapılmış olup bu dönem yara iyileşmesinin tamamını kapsamamaktadır. Vokal kord hasar oluşumu aşamalarının erken dönemden başlayan ve uzun dönemde gerçekleşen moleküler ve genetik değişikliklerinin de araştırıldığı daha ileri araştırmalar bu karanlık alanın aydınlatılmasına yardımcı olabilir.

Vokal kord hasarı sonrası, PRP ve deksametazon enjeksiyonunun, vokal kord viskoelastik özellikleri üzerinde büyük önemi olan elastin molekülünün yerleşimine etkileri de değerlendirilmiştir. PRP enjekte edilen vokal kordda elastin organizasyonu ve sayısı, deksametazon enjekte edilen tarafa göre daha fazla ve düzenli olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu sonuçla PRP enjeksiyonunun vokal kord skar oluşumunda gerçekleşen elastin organizasyonu üzerine tedavi edici özellikte olduğu düşünülebilir. Grupların HA açısından değerlendirilmesinde her iki grupta benzer iyileşme gösterilmiş ve PRP enjeksiyonunun deksametazon enjeksiyonu ile karşılaştırıldığında tedavi edici olduğunu düşündürür sonuçlar elde edilmiştir.

Güncel çalışmanın temel kısıtlılıkları arasında; kontrol grubunun olmaması, küçük örneklem sayısının olması ve deney gruplarının histopatolojik incelemesini gösterecek skorlama sistemi yapılırken subjektif ve semikantitatif methodların kullanılması sayılabilir. Kontrol grubu yapılmamasının nedeni; daha önce literatürde vokal kord skar önlenmesi adına etkisi kanıtlanmış kortikosteroid kullanımının verilerini temel alarak, deney hayvanları etik kurulu çalışma disiplinin en önemli kurallarından bir tanesi olan örneklem boyutunu küçük tutmak için başvurduğumuz bir yaklaşımdır. Histopatolojik bulguların incelemesinde ortaya çıkan bias durumunu minimize etmek için çalışmanın bulguları iki farklı otolaringolog ve iki ayrı patolog tarafından değerlendirilmiştir. Güncel çalışmada deksametazon ve PRP'nin etkisi hasar oluşumundan iki ay sonra histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu süre, yara iyileşme sürecini değerlendirmek için uygun bir zaman olmakla beraber yara iyileşmesi sürecinin bütün aşamalarını göstermemektedir. Vokal kord hasarı sonrası PRP enjeksiyonu ile ilgili kısa ve uzun dönem reaksiyonların etkilerini inceleyen daha fazla çalışma yapılmalıdır. Güncel çalışmada PRP ve steroidin hasarlı vokal kordun viskoelastik özellikleri, biyomekanik özellikleri, reolojik ölçümleri, vibratuar ve fonksiyonel sonuçlara ilişkin değerlendirilmesinin yapılmamış olması ayrı bir kısıtlılığdır. PRP uygulamasının farklı dozlarda ve zaman dilimlerinde uygulanmasına ek olarak hasarlı vokal kordun iyileşme dönemindeki fonksiyonel sonuçlarını da kapsayan daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Vokal kord hasarı oluşturulan tavşanlarda PRP enjeksiyonu, yara iyileşmesi fazında gerçekleşen reaksiyonları düzenleyerek skar oluşumunun engellenmesinde en az deksametazon kadar faydalı bir moleküldür. Yapılan karşılaştırmada vokal kordun hasar almış bölgelerinde belli dozlarda sağlıklı doku oluşumuna olumlu etki edebileceğine dair histopatolojik sonuçlar vardır. Vokal kord hasarı sonrası PRP enjeksiyonu yapılması deksametazondan daha fazla anti-enflamatuar yanıt elde edilmesini sağlamıştır. Ancak bu etki, vokal kord skar oluşumunda rol oynayan başlıca moleküller olan kolajen ve elastin seviyelerinde beklenildiği kadar büyük bir etki yaratmamıştır.

Genel olarak PRP enjeksiyonunun yararlarının 3 madde ile özetlenebilir olduğunu düşünmekteyiz: 1- Çok sayıda büyüme faktörünü yüksek konsantrasyonlarda içermesi sayesinde vokal kord üzerinde daha az ödem ve enflamatuar hücre artışına neden olması 2- Düzensiz kolajen üretimini engellediği ve kolajen depozitlerinin daha iyi organize olmasını sağlayarak deksametazondan daha az skar oluşumuna neden oldukları 3- Vokal kordun kompleks tabakalı mimarisinin korunmasında ve normal fizyolojisini sürdürmede en az deksametazon kadar başarılı olduklarıdır. Bu nedenle PRP enjeksiyonunun, laringeal cerrahi hastalarında skar önlenmesinde ve hasar iyileşmesinde en az deksametazon kadar efektif bir materyal olarak kullanılabileceğini vurgulamaktayız. Vokal kord hasarı sonrası PRP'nin farklı dozlarda ve zamanlarda uygulandığı ve vokal kord hasar oluşumu fazında görev alan farklı moleküllere olan etkilerinin de sorgulandığı, ses kalitesinin fonksiyonel özellikleriyle birlikte reolojik ölçümleri de içeren yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKÇA

1. Allen J. Cause of vocal fold scar. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;18(6):475-80.
2. Rousseau B, Hirano S, Chan RW, Welham NV, Thibeault SL, Ford CN, et al. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model. *Journal of Voice.* 2004;18(1):116-24.
3. Ferdous Z, Peterson SB, Tseng H, Anderson DK, Iozzo RV, Grande-Allen KJ. A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(2):419-28.
4. Coleman JR, Jr., Smith S, Reinisch L, Billante CR, Ossoff JP, Deriso W, et al. Histomorphometric and laryngeal videostroboscopic analysis of the effects of corticosteroids on microflap healing in the dog larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(2):119-27.
5. 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):285-92.
6. Hertegard S, Cedervall J, Svensson B, Forsberg K, Maurer FH, Vidovska D, et al. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. *Laryngoscope.* 2006;116(7):1248-54.
7. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, et al. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. *Laryngoscope.* 2004;114(3):548-56.
8. Ohno S, Hirano S, Kanemaru S, Kitani Y, Kojima T, Tateya I, et al. Implantation of an atelocollagen sponge with autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for treatment of vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2011;120(6):401-8.
9. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry.* 2001;10(4):225-8.
10. Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clin J Sport Med.* 2011;21(1):37-45.
11. Bhatt NK, Gao WZ, Timmons Sund L, Castro ME, O'Dell K, Johns MM, 3rd. Platelet-Rich Plasma for Vocal Fold Scar: A Preliminary Report of Concept. *J Voice.* 2021.
12. Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otol (Fukuoka).* 1975;21:239-42.
13. Ford CN, Inagi K, Khidr A, Bless DM, Gilchrist KW. Sulcus vocalis: a rational analytical approach to diagnosis and management. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996;105(3):189-200.
14. Cakir ZA, Yigit O, Kocak I, Sunter AV, Dogan M. Sulcus vocalis in monozygotic twins. *Auris Nasus Larynx.* 2010;37(2):255-7.
15. Friedrich G. [Basic principles for indications in phonosurgery]. *Laryngorhinootologie.* 1995;74(11):663-5.
16. Friedrich G, Rémacle M, Birchall M, Marie JP, Arens C. Defining phonosurgery: a proposal for classification and nomenclature by the Phonosurgery Committee of the European Laryngological Society (ELS). *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264(10):1191-200.

17. Martinez Arias A, Remacle M, Lawson G. Treatment of vocal fold scar by carbon dioxide laser and collagen injection: retrospective study on 12 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010;267(9):1409-14.
18. Benninger MS. Microdissection or microspot CO2 laser for limited vocal fold benign lesions: a prospective randomized trial. *Laryngoscope.* 2000;110(2 Pt 2 Suppl 92):1-17.
19. Remacle M, Lawson G, Watelet JB. Carbon dioxide laser microsurgery of benign vocal fold lesions: indications, techniques, and results in 251 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(2):156-64.
20. Hantzakos A, Dikkers FG, Giovanni A, Benninger MS, Remacle M, Sjogren EV, et al. Vocal fold scars: a common classification proposal by the American Laryngological Association and European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019;276(8):2289-92.
21. Gugatschka M, Kojima T, Ohno S, Kanemaru S, Hirano S. Recruitment patterns of side population cells during wound healing in rat vocal folds. *Laryngoscope.* 2011;121(8):1662-7.
22. Croce MA, Dyne K, Boraldi F, Quaglino D, Jr., Cetta G, Tiozzo R, et al. Hyaluronan affects protein and collagen synthesis by in vitro human skin fibroblasts. *Tissue Cell.* 2001;33(4):326-31.
23. Savani R, Bagli D, Harrison R, Turley EA. The Role of Hyaluronan–Receptor Interactions in Wound Repair. 192000. p. 115-42.
24. Friedrich G, Dikkers FG, Arens C, Remacle M, Hess M, Giovanni A, et al. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the Phonosurgery Committee of the European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(9):2491-507.
25. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Stellate cells in the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001;110(4):319-25.
26. Rousseau B, Ge PJ, Ohno T, French LC, Thibeault SL. Extracellular matrix gene expression after vocal fold injury in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117(8):598-603.
27. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope.* 1999;109(6):845-54.
28. Thibeault SL, Rousseau B, Welham NV, Hirano S, Bless DM. Hyaluronan levels in acute vocal fold scar. *Laryngoscope.* 2004;114(4):760-4.
29. 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):966-72.
30. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs.* 1987;10(1):47-50.
31. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014;7(4):189-97.
32. Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R. Steroid injection in chronic inflammatory vocal fold disorders, literature review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008;74(6):926-32.
33. Ossoff RH, Wolff AP, Ballenger JJ. Acute epiglottitis in adults: experience with fifteen cases. *Laryngoscope.* 1980;90(7 Pt 1):1155-61.

34. Ridder GJ, Strohacker H, Lohle E, Golz A, Fradis M. Laryngeal sarcoidosis: treatment with the antileprosy drug clofazimine. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109(12 Pt 1):1146-9.
35. Bouchayer M, Cornut G. Microsurgical treatment of benign vocal fold lesions: indications, technique, results. *Folia Phoniatr (Basel)*. 1992;44(3-4):155-84.
36. Courey MS, Garrett CG, Ossoff RH. Medial microflap for excision of benign vocal fold lesions. *Laryngoscope*. 1997;107(3):340-4.
37. Campagnolo AM, Tsuji DH, Sennes LU, Imamura R, Saldiva PH. Histologic study of acute vocal fold wound healing after corticosteroid injection in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010;119(2):133-9.
38. Hansen JK, Thibeault SL. Current understanding and review of the literature: vocal fold scarring. *J Voice*. 2006;20(1):110-20.
39. Carroll LA, Hanasono MM, Mikulec AA, Kita M, Koch RJ. Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. *Dermatol Surg*. 2002;28(8):704-9.
40. Woo P, Casper J, Colton R, Brewer D. Diagnosis and treatment of persistent dysphonia after laryngeal surgery: a retrospective analysis of 62 patients. *Laryngoscope*. 1994;104(9):1084-91.
41. Gugatschka M, Ohno S, Saxena A, Hirano S. Regenerative medicine of the larynx. Where are we today? A review. *J Voice*. 2012;26(5):670 e7-13.
42. Kojima T, Mitchell JR, Garrett CG, Rousseau B. Recovery of vibratory function after vocal fold microflap in a rabbit model. *Laryngoscope*. 2014;124(2):481-6.
43. Mau T, Du M, Xu CC. A rabbit vocal fold laser scarring model for testing lamina propria tissue-engineering therapies. *Laryngoscope*. 2014;124(10):2321-6.
44. Hirano S, Bless D, Heisey D, Ford C. Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope*. 2003;113(1):144-8.
45. Hirano S, Kawamoto A, Tateya I, Mizuta M, Kishimoto Y, Hiwatashi N, et al. A phase I/II exploratory clinical trial for intracordal injection of recombinant hepatocyte growth factor for vocal fold scar and sulcus. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(4):1031-8.
46. Mattei A, Magalon J, Bertrand B, Philandrianos C, Veran J, Giovanni A. Cell therapy and vocal fold scarring. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2017;134(5):339-45.
47. Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, et al. Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(12):907-12.
48. Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, et al. Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(11):915-20.
49. de Bonnacaze G, Chaput B, Woisard V, Uro-Coste E, Swider P, Vergez S, et al. Adipose stromal cells improve healing of vocal fold scar: Morphological and functional evidences. *Laryngoscope*. 2016;126(8):E278-85.
50. Lee BJ, Wang SG, Lee JC, Jung JS, Bae YC, Jeong HJ, et al. The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):198-204.

51. Goel AN, Gowda BS, Veena MS, Shiba TL, Long JL. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Persist in Tissue-Engineered Vocal Fold Replacement in Rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2018;127(12):962-8.
52. Morisaki T, Kishimoto Y, Tateya I, Kawai Y, Suzuki R, Tsuji T, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells prevented rat vocal fold scarring. *Laryngoscope*. 2018;128(1):E33-E40.
53. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(3):313-25.
54. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.
55. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Tateya I, Kanemaru S, Nakamura T, et al. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope*. 2014;124(12):E461-9.
56. Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Tateya I, Rousseau B, Ito J. Effects of basic fibroblast growth factor on rat vocal fold fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010;119(10):690-6.
57. Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Rousseau B, Nakamura T, Ito J. Treatment of acute vocal fold scar with local injection of basic fibroblast growth factor: a canine study. *Acta Otolaryngol*. 2010;130(7):844-50.
58. Suzuki R, Kawai Y, Tsuji T, Hiwatashi N, Kishimoto Y, Tateya I, et al. Prevention of vocal fold scarring by local application of basic fibroblast growth factor in a rat vocal fold injury model. *Laryngoscope*. 2017;127(2):E67-E74.
59. Hirano S, Sugiyama Y, Kaneko M, Mukudai S, Fuse S, Hashimoto K. Intracordal Injection of Basic Fibroblast Growth Factor in 100 Cases of Vocal Fold Atrophy and Scar. *Laryngoscope*. 2020.
60. Garrett CG, Soto J, Riddick J, Billante CR, Reinisch L. Effect of mitomycin-C on vocal fold healing in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110(1):25-30.
61. Gray SD, Tritle N, Li W. The effect of mitomycin on extracellular matrix proteins in a rat wound model. *Laryngoscope*. 2003;113(2):237-42.
62. Hirano S. Current treatment of vocal fold scarring. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13(3):143-7.
63. Branski RC, Rosen CA, Verdolini K, Hebda PA. Acute vocal fold wound healing in a rabbit model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114(1 Pt 1):19-24.
64. Shi LL, Giraldez-Rodriguez LA, Johns MM, 3rd. The Risk of Vocal Fold Atrophy after Serial Corticosteroid Injections of the Vocal Fold. *J Voice*. 2016;30(6):762 e11- e13.
65. Mortensen M, Woo P. Office steroid injections of the larynx. *Laryngoscope*. 2006;116(10):1735-9.
66. Young WG, Hoffman MR, Koszewski IJ, Whited CW, Ruel BN, Dailey SH. Voice Outcomes following a Single Office-Based Steroid Injection for Vocal Fold Scar. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016;155(5):820-8.
67. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(6):1502-8.
68. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg*. 1993;166(1):74-81.

69. Glover JL, Weingarten MS, Buchbinder DS, Poucher RL, Deitrick GA, 3rd, Fylling CP. A 4-year outcome-based retrospective study of wound healing and limb salvage in patients with chronic wounds. *Adv Wound Care*. 1997;10(1):33-8.
70. Doucette MM, Fylling C, Knighton DR. Amputation prevention in a high-risk population through comprehensive wound-healing protocol. *Arch Phys Med Rehabil*. 1989;70(10):780-5.
71. Keyser JE. Diabetic wound healing and limb salvage in an outpatient wound care program. *South Med J*. 1993;86(3):311-7.
72. Atri SC, Misra J, Bisht D, Misra K. Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers. *Surgery*. 1990;108(3):508-12.
73. Woo SH, Son YI, Lee SH, Park JJ, Kim JP. Comparative analysis on the efficiency of the injection laryngoplasty technique using calcium hydroxyapatite (CaHA): the thyrohyoid approach versus the cricothyroid approach. *J Voice*. 2013;27(2):236-41.
74. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004;34(4):665-71.
75. Kassolis JD, Reynolds MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg*. 2005;16(2):280-7.
76. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004;13(4):301-9.
77. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004;91(1):4-15.
78. Woo SH, Jeong HS, Kim JP, Koh EH, Lee SU, Jin SM, et al. Favorable vocal fold wound healing induced by platelet-rich plasma injection. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2014;7(1):47-52.