



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı

**REİNKE ÖDEMİ İMMUNOPATOGENEZİNDE EPİTEL KAYNAKLI
SİTOKİNLERİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Araş. Gör. Dr. Ceren Baş Erol

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Alper Köycü

Ankara, 2022

TEŞEKKÜR

Beni dünyaya getirip bugünlere ulaştıran, hayatta her şeyi başarabileceğimi hissettiren ve her daim yanımda olan canım annem Meltem Baş ve babam Okan Baş' a bana verdikleri hayat ve sevgi için teşekkür ederim. Dünyada bir eşi daha olmadığına emin olduğum biricik kardeşim Selen Baş' a hayatımı güzelleştirdiği ve her zaman gülümsetip sıcacık hissettirdiği için teşekkür ederim. Eşim Ozan Erol' a oldukça zorlu asistanlık sürecini baştan sona bir kere daha benimle yaşadığı, bana yol gösterdiği için ve bana her konuda desteğini ve sevgisini en güzel şekilde hissettirmeyi başardığı için teşekkür ederim.

Kulak burun boğaz uzmanı olarak beni yetiştiren ve bana mesleğimi kazandıran hocalarım Prof. Dr. Levent Naci Özlüoğlu, Prof. Dr. Erdinç Aydın, Prof. Dr. Seyra Erbek, Prof. Dr. Selim Erbek ve Prof. Dr. Fuat Büyüklü' ye hayata ve doktorluğa dair öğrettikleri için teşekkür ederim. Beş yıllık asistanlık serüvenimde gerek cerrahi gerek bilimsel yaklaşım konusunda örnek teşkil eden tez danışmanım Doç. Dr. Alper Köycü' ye bana kattıkları için teşekkür ederim. Tez projesinin her adımında olduğu kadar asistanlıkta sendelediğim zamanlarda sevgisini hissettiren, yanımda olan ve akıl hocalığı yapan Doç. Dr. Seda Türkoğlu Babakurban' a teşekkür ederim. Bana hocalık yanında abilik, ablalık yapan; sayısız mesleki beceri kazandıran Doç. Dr. Arzu Tüzüner, Doç. Dr. Işıl Öz, Uzm. Dr. Gülfem Beyazpınar, Yrd. Doç. Dr. Sabuhi Jafarov, Uzm. Dr. Serhat İnan'a teşekkür ederim.

Bütün zorlukları birlikte aştığımız, yorucu günlere gecelere neşe katan, her zaman takım gibi hissettiren asistan arkadaşlarım Dr. Ömer Vural, Dr. Ertuğrul İsazade, Dr. Göknıl Gültekin, Dr. Alican Akaslan, Dr. Gökay Yıldız, Dr. Hakan Yüce' ye başta dostlukları için; bunun yanında tez çalışmam süresince yetişemediğim noktalarda eksiksiz ilerlememi sağladıkları için teşekkür ederim.

Çalışmamızın yapılması süresince patolojik incelemeleri yapan Yrd. Doç. Dr. Eda Yılmaz Akçay' a ve tüm patoloji teknikerlerimize, genetik çalışmaları özenle yürüten Doç. Dr. Yunus Kasım Terzi' ye ve deneyleri yapan Dilan Baştuğ' a, istatistiksel analizleri gerçekleştiren Serhat Akay' a bu çalışmanın ortaya çıkmasındaki tüm emekleri için teşekkür ederim. Çalışmamızı suluboya çizimleriyle renklendiren annem Meltem Baş' a emekleri için ayrıca teşekkür ederim.

ÖZET

Reinke ödemi vokal kordların benign bir hastalığıdır ve sigara ile yakın etiyolojik bağı net olarak bilinmekle birlikte karakteristik değişikliklerin ortaya çıkmasında görevli moleküler yolaklar net olarak ortaya konmuş değildir.

Çalışmamızda sigara ile üretiminin arttığı bilinen, iritanlara bağlı epitel dokusundan salgılanarak immün yanıt ile arada bir köprü oluşturan *TSLP*, *IL25* ve *IL33*' ün Reinke ödemi immünopatogenezinde de rol oynayıp oynamadığını araştırmayı amaçladık.

12 aktif sigara içicisi Reinke ödemi hastası ile 14 sigara içmeyen kontrol grubu hastası (vokal kordun diğer benign lezyonları) olmak üzere toplam 26 hasta ile çalışmamız tamamlanmıştır. Hastalardan vokal kord mikrocerrahisi sırasında alınan örneklerde *TSLP* varlığı immünohistokimya metodu ile çalışılmıştır. Bunun yanında *TSLP*, *IL25*, *IL33*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL13*, *TNF-alfa*, *CCL17*, *CCL22*, *IL10*, *IFN γ* ve *TGF-beta* genlerinin ifadenmelerindeki değişimler semikantitatif RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir.

İmmünohistokimyasal boyanma şiddetlerinde Reinke ödemi ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir. Stromal boyanmaya bakıldığında ise Reinke ödemi hastalarının örneklerinde optik dansite ölçümü ile yapılan analizlerde anlamlı şekilde daha kuvvetli boyanma görülmüştür ($p=0,004$). Sitokinlerin ifadenme düzeyi ölçümlerinde de *TSLP* ifadenme miktarları Reinke ödemi grubunda 27,4 kat daha fazla görülmüş olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,300$). *IL25* ve *IL33* ifadenmelerinde ise tam tersi bir sonuç elde edilmiştir, bu sitokinlerin kontrol grubunda sırasıyla 2.08 ve 7 kat olmak üzere daha fazla ifadelendiği görülmüştür fakat fark istatistiksel anlamlı bulunmamıştır ($p=0,449$; $p=0,179$).

Sonuç olarak bulgularımız Reinke ödemi immünopatogenezinde *TSLP*' rolü olabileceğini desteklese de tip 2 inflamasyondan farklı bir sürece işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Reinke ödemi, patofizyoloji, *TSLP*, vokal kord, sigara

ABSTRACT

Role of Epithelium Derived Cytokines in Immunopathogenesis of Reinke 's Edema

Reinke 's edema is a benign disorder of vocal cords. The etiologic relation with cigarette smoke is well established; however the molecular pathways taking part in the disease process are not yet identified.

Our objective was to determine if epithelium derived cytokines (*TSLP*, *IL25* ve *IL33*) bridging the epithelium to immune response play a role in immunopathogenesis of Reinke 's edema.

12 patients with Reinke 's edema who are active smokers and 14 non smoker control patients (with other benign lesions of the vocal cords) are included in the study. Biopsies taken during microlaryngosurgery are analyzed. *TSLP* is studied with immunohistochemistry. Also expression levels of *TSLP*, *IL25*, *IL33*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL13*, *TNF-alfa*, *CCL17*, *CCL22*, *IL10*, *IFN γ* ve *TGF-beta* genes are determined by RT-PCR.

Epithelial immunohistochemical staining intensity did not differ between Reinke 's edema and control group. Optical density measurements showed that stromal staining of *TSLP* was more intense in Reinke's edema compared to controls ($p=0.004$). *TSLP* expression level in Reinke's edema was 27.4 times higher compared to controls but this difference was not statistically significant ($p=0.300$). *IL25* and *IL33* expression levels were higher in controls compared to Reinke's edema, 2.08 ($p=0.449$) and 7 ($p=0.179$) times respectively.

In conclusion our findings suggest that *TSLP* may play a role in immunopathogenesis however the process differs from Th2 mediated inflammation.

Keywords: Reinke 's edema, *TSLP*, pathophysiology, vocal cords, cigarette, smoking

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	ii
Özet	iii
İngilizce Özet (Abstract)	iv
İçindekiler dizini.....	v
Kısaltmalar ve simgeler dizini.....	vi
Şekiller dizini.....	vii
Tablolar dizini.....	viii
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. Larinks, Glottik Bölge Anatomisi.....	2
2.2. Vokal kordlar Histolojisi.....	3
2.3. Reinke Ödemi	6
2.3.1. Tanım	6
2.3.2. Etiyoloji.....	6
2.3.3. Patofizyolojisi ve İmmunopatogenezi.....	7
2.3.4. Maligniteye Dönüşme Potansiyeli	9
2.3.5. Klinik Prezantasyon.....	9
2.3.6. Tedavi Yöntemleri.....	12
2.4. Epitel Kaynaklı Sitokinler.....	12
2.4.1. Timik Stromal Lenfopoetin (TSLP).....	12
2.4.2. TSLP Yolağı ve Tetikleyici Faktörler.....	13
2.4.3. İnflamatuar Hastalıklardaki Yeri	13
2.4.4. Larinks ve Üst Solunum Yolu Diğer Yapılarında TSLP İzolasyonu.....	14
3. Gereç ve Yöntem.....	15
3.1. Çalışma Tasarımı	15
3.2. Gönüllülerin Çalışmaya Alınışı ve Örnek Toplanması	16
3.2.1. Anamnez	16
3.2.2. Videolaringostroboskopik İnceleme.....	16
3.2.3. Laringofaringeal Reflü Açısından Değerlendirme.....	16
3.3. Patolojik İnceleme.....	17
3.3.1. Histopatolojik İnceleme	17
3.3.2. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	17
3.4. Moleküler İnceleme	22
3.4.1. Ribonükleik Asit (RNA) İzolasyonu	22
3.4.2. Komplemanter deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi	22
3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi	23
3.5. İstatistiksel Analiz	25
4. Bulgular	26
5. Tartışma.....	37
6. Sonuç	43
7. Kaynaklar	44

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

AD:	Atopik dermatit
BM:	Bazal membran
DC:	Dendridik hücre
cDNA:	komplemanter deoksiribonükleik asit
ESM:	Ekstraselüler matriks
HO:	Hem oksijenaz
İHK:	İmmünohistokimya
IL:	İnterlökin
IFN:	İnterferon
KOAH:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LFR:	Laringofaringeal reflü
LP:	Lamina Propria
RÖ:	Reinke Ödemi
RT-PCR:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TEM:	Transmisyon elektron mikroskopisi
Th:	Yardımcı T hücresi
TGF:	Dönüştürücü büyüme faktörü
TNF:	Tümör nekroz faktörü
TSLP:	Timik stromal lenfopoetin
TSLPR:	Timik stromal lenfopoetin reseptörü
VK:	Vokal kord

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	Larinks intrensek kasları, aksiyel kesit, süperiordan görünüm2
Şekil 2.2:	Larinks intrensek kasları, sagittal kesit, lateralden görünüm3
Şekil 2.3:	Vokal kord histolojik katmanları, illüstrasyon.....5
Şekil 2.4:	Reinke boşluğu ile epitelin bir bütün olarak fonksiyon göstermesini sağlayan liflerin dizilimini5
Şekil 2.5:	Reinke ödemi evrelemesi, illüstrasyon11
Şekil 3.1:	TSLP immunhistokimya boyanması19
Şekil 3.2:	IHC profiler eklentisi ile ters renk evrişimi.....20
Şekil 3.3:	IHC profiler eklentisi DAB spektrumunun piksel analizi ve optik dansite skor grafiği.....20
Şekil 3.4:	Slayt görüntüsünün taranmış, 20x büyütme görüntüsü.....21
Şekil 3.5:	Adobe Illustrator programında epitel ölçümleri görüntünün yalnızca epitel dokusu dahil edilecek şekilde kırplışı21
Şekil 4.1:	Dijital epitel skor yüzdelерinin hasta gruplarına göre ortalama değерleri...29
Şekil 4.2:	Dijital stroma skor yüzdelерinin hasta gruplarına göre ortalama değерleri..30
Şekil 4.3:	Çalışma grubunda epitel ve stroma yüzdelерinin ortalama değерleri31
Şekil 4.4:	Kontrol grubunda epitel ve stroma yüzdelерinin ortalama değерleri.....32
Şekil 4.5:	<i>TSLP, IL33 ve IL25</i> her iki gruptaki ifadenmelerinin histogram grafiği olarak gösterimi.....34
Şekil 4.6:	<i>CCL22, CCL17, IL6 ve IL4'</i> ün her iki gruptaki ifadenmelerinin histogram grafiği olarak gösterimi.....35
Şekil 4.7:	<i>IL5, IL13, IL10, TNF-α, TGF-β, IFN-γ</i> ün her iki gruptaki ifadenmelerinin histogram grafiği olarak gösterimi.....36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1:	İfadelenme analizi sırasında kullanılan primer dizileri.....	24
Tablo 3.2:	RT-PCR analizinde uygulanan sıcaklık döngüsü.....	25
Tablo 4.1:	Çalışma ve kontrol grubundaki hastaların demografik verilerinin karşılaştırması.....	27
Tablo 4.2:	İmmünohistokimya Manuel Semikuantifikasyon bulgularının Çalışma ve Kontrol grubundaki hastalarda karşılaştırılması.....	28
Tablo 4.3:	Epitel için dijital optik dansite ölçümleri ve skorlarının çalışma ve kontrol grubunda karşılaştırılması.....	29
Tablo 4.4:	Dijital stroma optik dansite ölçümleri ve skorlarının çalışma ve kontrol grubunda karşılaştırılması.....	30
Tablo 4.5:	Çalışma grubunda epitel ve stroma optik dansite ölçüm değerlerinin karşılaştırılması.....	31
Tablo 4.6:	Kontrol grubunda epitel ve stroma değerlerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.7:	Sitokinlerin RT-PCR ile ölçülen ifadenme oranlarının çalışma ve kontrol grubundaki hastalarda karşılaştırılması.....	33

1. GİRİŞ

İnsan epitel hücrelerinin timik stromal lenfopoetin (TSLP) üreterek dendritik hücre yoluyla alerjik inflamasyonu tetikleyebileceğini göstermiştir (1). Larinks epiteline histolojik olarak en yakın benzerlik gösteren üst ve alt solunum yolu epitelinin bulunduğu burun ve akciğerdeki hastalıkların oluşumunda da TSLP' nin rol oynadığı gösterilmiştir. Üst ve alt solunum yollarında hasarlı veya uyarılmış epitel hücresinden salınan TSLP, IL25 (interlökin), ve IL-33 'ün epitel hasarı aşamasında hem alerjik hem de non-alerjik eozinofilik inflamasyonda kritik rol aldıkları gösterilmiştir (2). Epitelin yalnızca bariyer fonksiyonu olmadığı, astımın immunopatogenezinde edinilmiş bağışıklıkla arada bir köprü olduğunun altı çizilmiştir. Allerjenler, virüsler, kimyasallar, sigara dumanı gibi çevresel faktörlerin TSLP üretimini tetiklediği de bilinmektedir (3, 4).

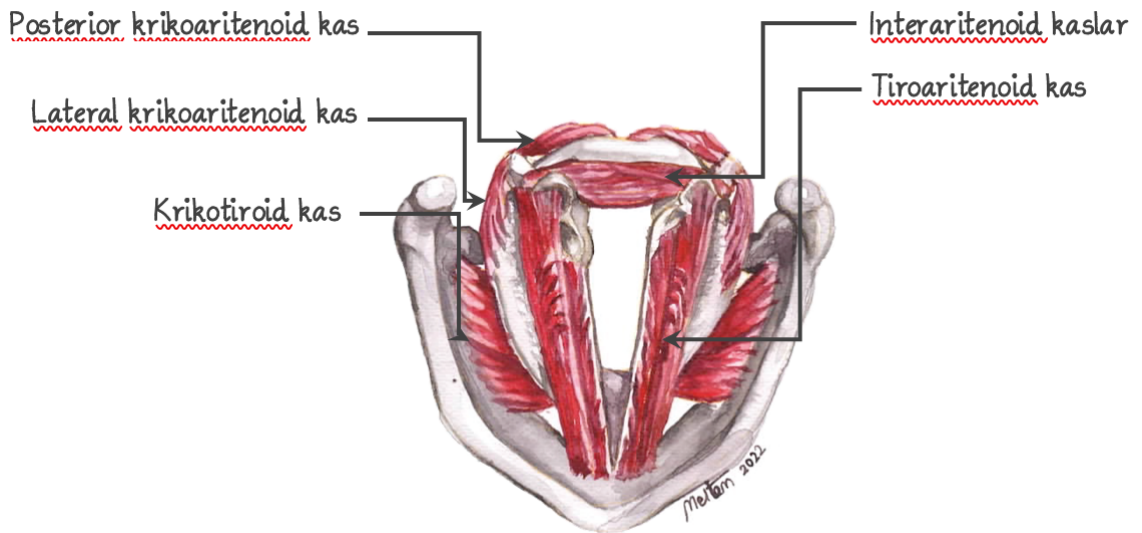
Bu bilgileri göz önünde bulundurarak *TSLP*, *IL25*, *IL33* ve yolağın devamında kalan tip 2 inflamasyon yanıtında görevli sitokinlerin aynı fonksiyonu Reinke ödemindeki yapısal değişikliklerin ortaya çıkmasında da gösterip göstermediğini araştırdık. Hipotezimiz aktif sigara içen Reinke ödemi hastalarında, sigara içicisi olmayan ve vokal kordun diğer benign lezyonları görülen kontrol grubuna göre artmış miktarda *TSLP*, *IL25*, *IL33* üretimi ve bunun etkisiyle Th2 yönünde kutuplaşmış inflamasyonun görüleceğidir. Hipotezimizden yola çıkılarak her iki grupta epitelyal sitokinler olan *TSLP*, *IL25*, *IL33* ve yolağın devamındaki görev alması muhtemel sitokinlerin ifadenmelerindeki değişimler semikantitatif RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. İfadenme miktarları ölçülen diğer sitokinler Th2 yönünde kutuplaşmanın belirleyicileri (*IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL13*), *TSLP* ' nin kuvvetli bir tetikleyicisi olan *TNF-alfa*, dendritik hücrelerden salınan kemokinler (*CCL17*, *CCL22*) ve antiinflamatuvar sitokinler olan *IL10*, *IFNγ* ve *TGF-beta* dan oluşmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

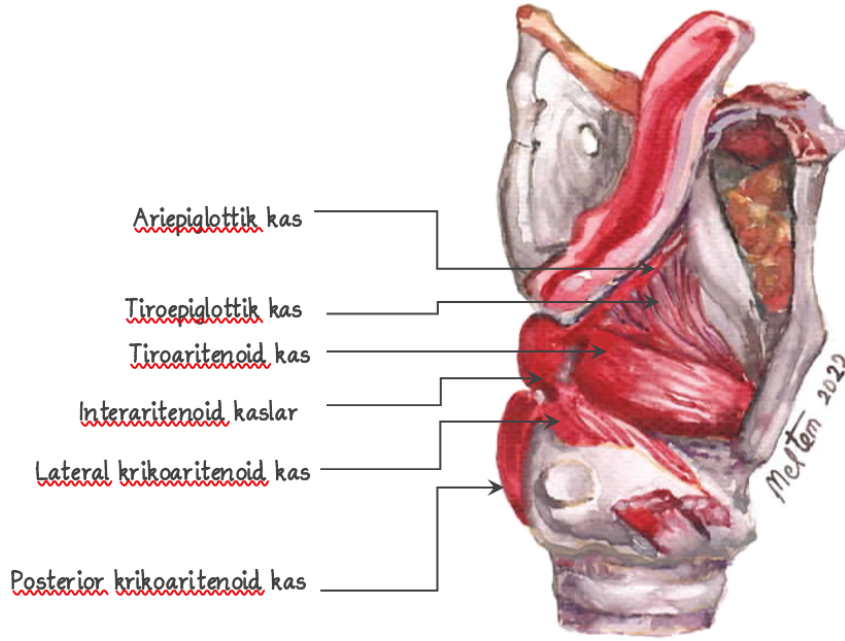
2.1.Larinks, Glottik Bölge Anatomisi

Larinks supraglottis, glottis ve subglottis olmak üzere 3 farklı alt bölgeye ayrılır. Supraglottis laringeal inletten ventriküle kadar uzanır. Glottis (rima glottidis) vokal kordları kapsarken subglottis ise vokal kordlardan krikoid kartilaj alt sınırına kadar uzanır.

Vokal kordların (VK) şekli ve hareketleri intrinsek larinks kaslarının aktivitesine bağlıdır. Lateral krikoaritenoid, tiroaritenoid ve interaritenoid kaslar VK addüksiyonunu sağlayan kaslardır. Posterior krikoaritenoid kas VK abdüksiyonunu sağlayan tek kastır. Kasların yerleşimleri şekilde gösteriştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Larinks intrinsek kasları, aksiyel kesit, süperiordan görünüm



Şekil 2.2. Larinks intrinsek kasları, sagital kesit, lateralden görünüm

Larinksin duyu ve motor innervasyonu vagus sinirinin (10. Kraniyal sinir) dalları olan süperior ve rekürren laringeal sinirler tarafından sağlanır. Süperior laringeal sinirin internal ve eksternal olmak üzere iki dalı vardır. İnternal dalı supraglottis ve glottisin duyu innervasyonunu sağlarken en eksternal dalı krikotiroid kasın motor innervasyonunda görevlidir (5,6).

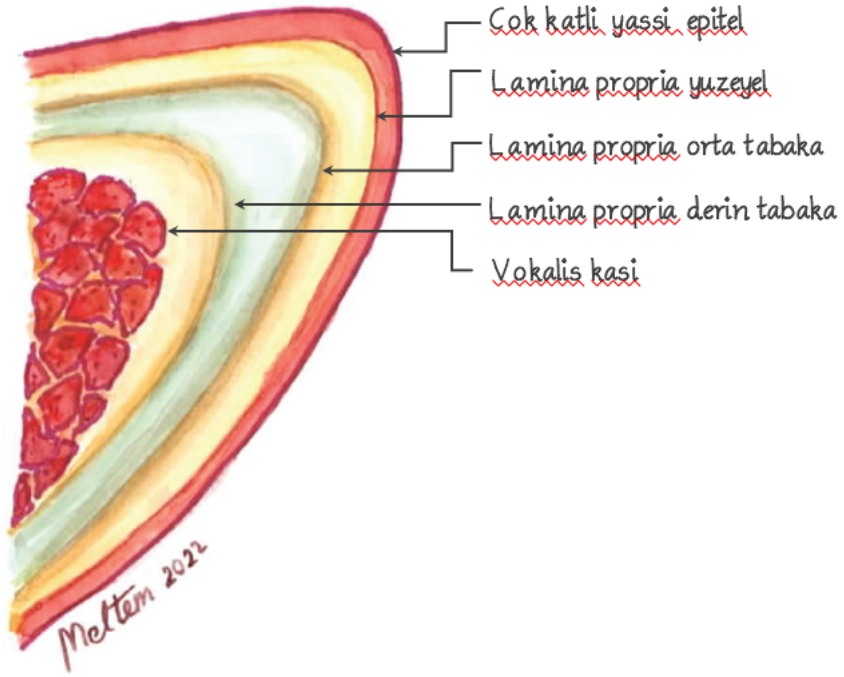
2.2.Vokal Kordlar Histolojisi

Vokal kord serbest yüzeyinin yapısı, fonatuar vibrasyonu gerçekleştirmeye olanak sağlayan özel bir yapıya sahiptir. Vokal kordlar histolojik olarak 5 farklı tabakadan oluşmuştur. Bunlar yüzeyelden derine sırasıyla, skuamöz epitel, lamina propria yüzeyel tabakası, lamina propria orta tabakası, lamina propria derin tabakası ve vokalis kasından oluşmaktadır (Şekil 2.3).

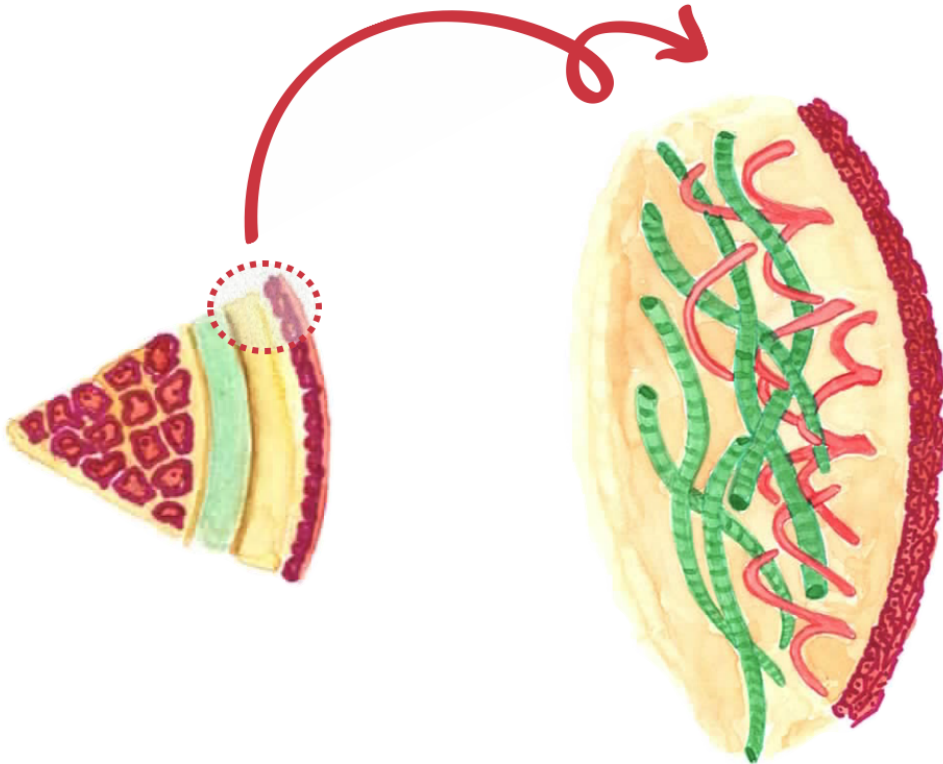
Larinksin diğer bölgeleri respiratuar epitel ile döşeliyken vokal kord epiteli skuamöz epitelden oluşmaktadır. Muköz gland dokusu içermez. Vokal kordları kaplayan mukoseröz sekresyon komşu dokulardan sağlanır. Vokal kord epiteli, hemen altında yer alan yüzeyel lamina propriaya bazal membran (BM) aracılığıyla tutunur.

Lamina propria (LP) yüzeyel tabakası ise gevşek bağ doku ve matriksten oluşur. Klinik olarak bu alan Reinke boşluğu olarak da adlandırılır. Reinke boşluğu düzgün bir fonatuar aktivite için hayati önem taşır (5, 7). Lamina propria orta tabakası elastik ve kolajen liflerden meydana gelmektedir, LP yüzeyel tabakasına göre daha yüksek konsantrasyona sahiptir. Lamina propria derin tabakası ise yoğun ve fibröz yapıdadır, kolajen liflerden oluşmuştur. LP orta ve derin tabakaları birlikte vokal ligaman (VL) olarak isimlendirilir. LP orta ve derin tabakaları iç içe geçmiştir, kolayca ayrılamazlar. VL konus elastikusun süperiordaki üst kısmıdır. LP fibroblastlar, myofibroblastlar, makrofajlar gibi çeşitli hücreleri barındırır. Makrofajlar bazal membranın (BM) hemen altında yoğunlaşırken fibroblastlar tüm seviyelerde benzer konsantrasyonlardadır. Myofibroblastlar ise yüzeyel LP da yoğunlaşmışlardır. LP' nın hücreler dışında kalan kısmı ise ekstraselüler matriks (ESM) olarak isimlendirilir. ESM elastin ve kolajen gibi fibriler yapıda proteinler ile hyaluronik asit, dekorin, fibromodülin, versikan, heparin sülfat proteoglikan, agregan biglikan gibi interstisyel proteinler ile lipidler ve karbonhidratlar içerir. Epitel ile bazal membran birleşim hattı fonksiyonel olarak büyük anlam taşır. Gray ve arkadaşları bu hattın ultrastrüktürel yapısını incelemişlerdir. Transmisyon elektron mikroskopisinde (TEM) yaptıkları incelemelerde bu iki dokuyu birleştiren BM hattında epitelyumu bağlayarak sabitleyen liflerin LP' da yer alan kolajen liflerini çevreleyecek şekilde halkalar oluşturarak LP ya uzandığını tespit etmişlerdir. Bu ilişkinin görselleştirilmiş hali şekil 2.4' te verilmiştir. Epitelyum, BM ve yüzeyel LP histolojik olarak çok farklı bileşenlerden oluşmasına karşın mekanik olarak tek bir doku gibi davranır (8). Fonasyon sırasındaki mukoza dalgasının oluşabilmesi için dokuların yapısının ve birbiriyle ilişkisinin korunması önemlidir.

Vokal kord boyunca yukarıda bahsedilen çok katmanlı histolojik yapı en anterior ve en posterior kısımlar haricinde korunur. Bu uç kısımlar ise kartilajlara bağlanma noktalarıdır, LP orta tabakası buralarda kalınlaşır. Anterior ve posterior makula flava olarak adlandırılan bu bölgeler sırasıyla tiroid kartilaj ve aritenoid kartilajlar ile VK' lar arasındaki geçiş bölgeleridir. Anterior komissür ile tiroid kartilaj iç perikondriumu arasında uzanan kollajen lifleri bütünü ise anterior komissür tendonu ya da Broyle Tendonu olarak adlandırılır. En derindeki vokalis kası (tiroaritenoid kas) ise, VK serbest yüzüne paralel dizilmiş liflerden meydana gelir (Şekil 2.3). (5).



Şekil 2.3. Vokal kord histolojik katmanları, illüstrasyon



Şekil 2.4. Reinke boşluğu ile epitelin bir bütün olarak fonksiyon göstermesini sağlayan liflerin dizilimini gösteren illüstrasyon

2.3.Reinke Ödemi

2.3.1. Tanım

Reinke ödemi (RÖ) VK 'ların benign bir hastalığıdır. Aynı zamanda polipoid kordit, polipoid larenjit, polipoid dejenerasyon, kronik hipertrofik larenjit terimleri de eş anlamda kullanılmaktadır. Reinke boşluğu olarak adlandırılan potansiyel boşluğun ekstrasvaze olan sıvı ile şişmesi ve hacmindeki aşırı artışı olarak tanımlanabilir (9). Sıklıkla çift taraflı olmak üzere VK 'ların yaygın boylu boyunca polipoid dejenerasyonu ile kendini gösterir (7).

Dickers ve arkadaşları 1995 'de VK 'ların benign hastalıklarını histopatolojik özellikleri ile tanımlamışlardır. RÖ makroskopik olarak; VK 'ların unilateral ya da bilateral olarak beyaz renkli, geniş tabanlı (sesil), sıvı dolu, fonasyon ile hareketli şişkinliği şeklinde betimlenmiştir. Konvansiyonel ışık mikroskopisindeki incelemede 16 RÖ tanılı hastanın %81 'inde bazal membranda kalınlaşma, %88 'inde ödematöz göllenme, %75 'inde yakın zamana ait kanama bulgusu, %50 'sinde inflamasyon bulgusu, %60 'ında ise damar çeperi kalınlığında artış gözlenmiştir. TEM 'de damarların bazal membran kalınlığında artış ve aralarda perisitler saptanmıştır. Özetle, epitelyal BM kalınlaşması; ödematöz göllenme; ekstrasvasküler eritrositler; submukozal damar çeperinde kalınlaşma bulgularının bir arada görülmesinin RÖ klinik tanısını desteklediğini belirtmişlerdir (10). Sato ve arkadaşları da 10 RÖ spesimenini TEM altında inceleyerek subepitelyal bölgede dilate ve fenestrasyonlu vesiküller içeren endotel hücreleri ile çevreleyen dokuda plazma eksüdası tarif etmişlerdir (11).

2.3.2. Etiyoloji

Reinke ödeminin ortaya çıkış mekanizması tam olarak açıklanmamış olsa da laringeal irritasyona sebep olan faktörlerin varlığı RÖ vakalarının çoğunda ortaya konmuştur. İrritasyonun kaynağı faktörler ise başta sigara içiciliği olmak üzere, bunun yanında sesin kötü kullanımı, laringofaringeal reflü (LFR) olarak sıralanmıştır (7).

Risk faktörleri arasında en ilişkisi en net kurulmuş olanı sigara kullanımıdır. Sigara kullanımının süresinin ve miktarının artmasıyla klinik ve histolojik olarak da RÖ derecesinin yükseldiği tespit edilmiştir (12). İzole sigara dumanı ve titreşim travması ile birlikte sigara

dumanına maruz bırakılan VK fibroblastlarının laboratuvar ortamında proinflamatuvar ve proanjiyogenetik sitokin ifadenmelerinde artış da gösterilmiştir (13).

LFR ile RÖ ilişkisi çoğunlukla vaka-kontrol serileri ile araştırılmıştır, çalışma tasarımı açısından oldukça heterojen bütünde hiçbir çalışma pH-impedansmetri çalışması yapmazken LFR tanısı için pH monitorizasyonu kullanan çalışma sayısının da sınırlı olduğu görülmüştür (14). Chung ve arkadaşları kontrol grubunda LFR prevalansını %65, RÖ olan hastalarda ise %90 olarak saptamışlardır, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LFR tanısı için Reflü semptom indeksi (RSİ) ve reflü bulgu skoru (RFS) yanında çift problu pH monitorizasyonu kullanmışlardır (15). Aradaki bağlantıyı ortaya koyacak kanıt düzeyi daha yüksek çalışma henüz yapılmamıştır.

Tip 1 hipersensitivite varlığının RÖ oluşumu riskini arttırmadığı yönünde veri mevcuttur (16).

2.3.3. Patofizyolojisi ve İmmunopatogenezi

Reinke ödeminin patofizyolojisi henüz net olarak ortaya konmamakla birlikte araştırmalar sürmektedir. Fibroblastlar, glikozaminoglikanlar; proteoglikanlar; glikoproteinler; kolajen ve elastin gibi ESM bileşenlerinin üretiminden sorumludur. Bundan ötürü örtü-gövde teorisine göre mukozal dalga oluşumu ve fonasyonun düzgün sağlanmasında fibroblastların normal fonksiyon göstermesi ve ESM bileşenleri yoluyla yüzeyel LP oluşturmaları hayati önem taşır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar genellikle RÖ 'nin bulgu verdiği doku olan LP stromal dokusundaki yapısal değişikliklerin saptanması ile baskın hücre olan ve parakrin fonksiyonu da bilinen VK fibroblastlarının davranışları üzerine yoğunlaşmıştır. İrritanlarla ilk karşılaşan doku olan epitel dokusunun bu immun yanıtın meydana gelmesindeki olası fonksiyonuna daha az yer verilmiştir.

Histopatolojik araştırmalarla RÖ hastalarının VL 'larındaki hücresel ve ultrastrüktürel yapı değişiklikleri belgelenmiştir. RÖ olan hastalarda VK epitelinin proliferasyon aktivitesi artmış, stromal hücrelerin ise intrasitoplazmik granül oranında artış gösterilmiştir (17). 1999 'da Sato ve arkadaşları TEM incelemeleri sonucunda RÖ' nin VEGF yoluyla görülen damar yapısı değişiklikleri ile damar fragilitesi ve permeabilitesindeki artış sonucu Reinke

boşluğundaki ödemin ortaya çıktığı sonucuna varmışlardır (11). Dikkers ve arkadaşları BM bölgesinde RÖ 'nin de içinde bulunduğu benign lezyonlardan alınan örneklerde kontrollerden farklı olarak epitelyum bazal hücrelerinden elektron- yoğun materyel içeren vesikül salınımı gözlemlemişlerdir (18).

Vokal kordların stromal dokusundaki baskın hücrenin CD34+ fibroblastlar olduğu, RÖ hastalarında özellikle ödem alanları komşuluğunda bu hücrelerin artmış dansite ve değişmiş morfolojide olduğu fakat immunohistokimyasal (İHK) olarak normal dokuya benzer özellikte olduğu not düşülmüştür. CD34+ fibroblastların inflamasyonu baskılayıcı görev üstlendiği öne sürülmüştür (19).

Normal dokudan RÖ patolojisine giden yolda epigenetik düzeydeki anahtar olaylar ve karakteristik gen ifadenmeleri de ortaya konmaya çalışılmıştır. Duflo ve arkadaşları fenotipik olarak benzer yapıdaki iki hastalık olan RÖ ve VK polibi arasında 65 gende istatistiksel anlamlı ifadenme farkı tespit ederek bu iki hastalığın ortaya çıkışında farklı patofizyolojik süreçlerin varlığına işaret etmişlerdir. Hücrelerin çevresel strese karşı yanıt olarak gen ifadenmelerinde değişiklikler gösterdiği, oksidatif stresin güçlü bir apoptoz tetikleyicisi olduğu belirtilmiştir. RÖ' de oksidatif strese karşı koruyucu özellikte (*MAP2K3*, *SOD1*, *GPX2* ve *GTSA2*) ve apoptozda görevli (*CASP9*) genlerin ifadenmesi artmış olarak tespit edilmiştir (20). Bu bulgular oksidatif stres oluşturan sigaranın RÖ etiyojideki rolü düşünüldüğünde, tamamlayıcı niteliktedir.

Grill ve arkadaşları da RÖ vokal kord fibroblast hücre kültüründe gen ifadenme düzeylerindeki değişiklikleri incelemişlerdir. RÖ vokal kord fibroblastlarında *IL6/JAK/STAT3* yolağına dahil inflamatuvar sitokin reseptörlerinden *IL1R* ve *IL6R* anlamlı olarak artmış saptanmıştır. *IL6* ve *IL1* varlığında doğrudan yanıt da saptanmıştır. (21).

Etiyolojik olarak kronik irritasyon kaynakları sigara, LFR, sesin yanlış kullanımına bağlı travmanın VK dokusunda nasıl bir etki gösterdiği ve hangi yolla inflamasyon yanıtı oluştuğu da araştırılmıştır. İn-vitro olarak benzer koşullar yaratılarak fibroblastların parakrin yanıtları incelenmiştir. Yoğunlaştırılmış sigara özütüne maruz kalan insan VK fibroblast kültüründe üretilen hücrelerde vasküler endotelial büyüme faktörü (*VEGF*) ve $\alpha 7$ -nikotinik asetil kolin reseptörü (*$\alpha 7nAChR$*) ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (22). RÖ 'nin sigara dumanı kaynaklı oksidatif strese yanıt olarak oluştuğundan hareketle antioksidan enzimler olan hem-

oksijenaz-1 (*HO-1*) 'in ifadelenmesi incelenmiştir. Kontrol grubu olarak alınan sigara içmeyen benign lezyonlu hastaların spesimenlerine göre RÖ hastalarında HO-1' in 4 kat daha fazla ifadelendiğini tespit etmişlerdir. Sigara dumanı maruziyetinde reaktif oksijen türleri (ROT) miktarının ve *HO-1* ifadelininin doza bağımlı artışı da insan vokal kord fibroblastlarında tespit edilmiştir (23). Proinflamatuvar sitokinlerden *IL6*, *MCP-1* ve *HGF* de sigara dumanı maruziyetinde kontrole göre artmış miktarda gözlenmiştir (24).

2.3.4. Maligniteye Dönüşme Potansiyeli

Sigaranın RÖ gelişimindeki etkisi, olası malignite riski sorularını beraberinde getirmiştir. Yapılan çalışmalarda RÖ olan hastalarda ileri dereceli displazi gelişim oranı %3 civarında saptanmıştır. 189 hastalı bir kohortta hastaların %90 'ında displazi saptanmamıştır. %8' inde hafif dereceli displazi, %1'inde orta dereceli displazi saptanırken ileri dereceli displazi %1' in altında kalmıştır (25). Martins ve arkadaşları da ileri dereceli displazi ve karsinoma in situ oranlarını %3,70 olarak saptamışlardır (26). Marcotuille ve arkadaşları da 125 RÖ hastasının 3' ünde ileri dereceli displazi/karsinoma in situ saptamışlardır. (12). RÖ evresi ile malinite potansiyeli arasında ilişki saptanmamıştır, yani RÖ derecesi arttıkça displazi oranlarında bir artış saptanmamıştır. Kohort çalışmasında 4. evre RÖ hastalarında displazi oranı daha fazla saptanmış fakat örneklem küçüklüğü sonuca varmayı engellemiş, bu hasta grubu üzerinde ek çalışmaların yapılması tavsiye edilmiştir. (27). Özetle RÖ benign bir lezyon olarak kabul edilmektedir ve RÖ 'nin malignite gelişme riskini arttırdığına dair yeterli kanıt yoktur.

2.3.5. Klinik Prezantasyon

RÖ klinik olarak en sık ses değişikliği ile kendini göstermektedir. Hastaların şikayetleri hastalığın derecesine ve cinsiyete bağlı olarak değişebilmektedir. RÖ olan hastalar VK 'lardaki kitle etkisiyle osilasyon frekansının düşmesiyle seslerinde giderek kalınlaşma fark ederler. Akustik ölçümlerle saptanan temel frekans (F_0) normal olarak kadınlarda 195Hz civarı iken, erkeklerde 112Hz civarındadır (28). Kadınlarda normal değeri daha yüksek olan F_0 'da lezyon kaynaklı yaşanan düşüşün erkeklere göre daha fazla fark edildiği ve kadınların daha sık tedavi arayışı içine girdiği de düşünülmektedir. Hastaları nadir olarak solunum

sıkıntısı şikayetleri de olabilmektedir. RÖ anterior glottal açıklığı tuttuğundan aritenoid abdüksiyonu normal olan hastalar çoğunlukla nefes almak ile ilgili bir sorun hissetmezler.

Mukozal dalga özellikleri yüzeyel LP viskoelastisitiesine bağlıdır ve etkilenimi hastalar arasında fark gösterebilir. Ağır fonotravmaya maruz kalmış hastalarda epitelyum ve yüzeyel LP elastisitesi daha az olacaktır (9).

Tan ve arkadaşları, endoskopik muayenede RÖ glottal açıklığı obstrükte etme oranına göre bir evreleme tanımlamışlardır. Bu evrelemeye göre glottal açıklığın kendi hemilarinksi %25 ve daha azını obstrükte edenler evre 1, %25-50 arasını obstrükte edenler evre 2, %50-75 arası obstrükte edenler evre 3, %75'den fazlasını obstrükte edenler ise evre 4 olarak sınıflandırılmıştır (29) (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Reinke ödemi evrelemesi, illüstrasyon

a. Evre 1: havayolunu %25 ve daha az tıkalı, b. Evre 2: havayolunu %25-50 arasında tıkalı, c. Evre 3: havayolunu %50-75 arasında tıkalı, d. Evre 4: havayolunu %75 'den fazla tıkalı

2.3.6. Tedavi Yöntemleri

Ağırlıklı olarak cerrahi teknikler olmak üzere farklı tedavi seçenekleri mevcuttur. Bunlardan en etkili sonucun cerrahi teknikler ile elde edildiği belirtilmiştir. Soğuk bıçak, CO₂ lazer, mikrobebrider ve bu tekniklerin kombinasyonu benzer sonuçlar vermiştir. Fotoanjiyolitik lazer sonuçları çelişkilidir. Steroid enjeksiyonunun da VLS bulguları ile akustik analizde iyileşme sağladığı savunulmuştur. Hyaluronidaz enjeksiyonu da bir teknik olarak önerilmektedir fakat etkisi kanıtlanamamıştır. Bu tekniklerle ilgili büyük örneklem üzerinde ve randomizasyonu uygun yapılmış çalışma bulunmamaktadır (30).

2.4. Epitel Kaynaklı Sitokinler

2.4.1. Timik Stromal Lenfopoetin (TSLP)

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda gastrointestinal sistem ile solunum sistemi mukozal epitel dokusunun da tip 2 immun yanıt yönünde inflamasyonu doğuracak sitokin salınımı yapabildiği tespit edilmiştir. Bahsedilen fonksiyonu gerçekleştiren 3 sitokin göze çarpmaktadır, bunlar TSLP, IL-25 ve IL-33' tür (2).

Dendritik hücrelerin (DC) allerjik yanıtın başlamasında antijen prezentasyonu rolü üstlendiği bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan araştırmalar alerjenle ilk karşılaşan doku olan epitel dokusunun DC aktivasyonunda rolü olabileceğine işaret etmiştir. Bu bahsedilen etkileşimin ise TSLP yoluyla sağlandığı, diğer bir deyişle TSLP 'nin epitelyum ile tip 2 yardımcı T hücreleri (Th2) kaynaklı immun yanıt arasında bir köprü görevi üstlendiği düşünülmektedir.

TSLP, IL-7 benzeri bir sitokindir. Timik stromal lenfopoetin reseptörü (TSLPR) ise IL-7 reseptörü α zinciri ve ortak γ zincirinden oluşan bir heterodimerdir. İnsanda TSLP 'nin CD11c⁺ DC' leri aktive ettiği, naif yardımcı T hücrelerini (Th) yüksek miktarda IL-13, IL-5, TNF- α yanında makul miktarda IL-4 üretmesi ve IL-10 ve IFN- γ yı ise baskılaması yönünde farklılaştırdığı gösterilmiştir. Özetle TSLP, epitel hücre (ya da keratinosit) kaynaklı; direkt olarak DC hücre aracılı allerjik inflamasyonu tetikleyen bir sitokindir (1).

Solunum epitelinden salınan erken uyarı sinyalleri arasında TSLP yanı sıra IL-25 ve IL-33 de bulunmaktadır. IL-17 ailesinin bir üyesi olan IL-25 üretiminin papain, tripsin, ev akarı ve hücre-hücre adhezyonunun bozulmasıyla tetiklendiği bilinmektedir. IL-25 tip 2 inflamasyonu aktive etmenin yanında epitel bariyerini azaltarak dokuda yeniden şekillenmeye yol açmaktadır. IL-33 ise IL-1 ailesindendir, fakat bu ailenin aksine IL-25 gibi tip 2 inflamatuvar yanıtı yol açar. IL-25 sitoplazmada veziküller içinde depolanırken IL-33 baskın olarak hücre çekirdeğinde olmak üzere ekstraselüler olarak da tespit edilmiştir (2).

2.4.2. TSLP Yolağı ve Tetikleyici Faktörler

TSLP hedef hücreleri olarak immün hücrelerden DC, B hücreleri NK (natural killer) hücreler, düzenleyici T hücreleri (T_{reg}), eozinofiller, bazofiller, mast hücreleri ile trombositler ve duyuşal nöronlar gibi immün dışı hücreler de gösterilmiştir (31). Farklı tip hücrelerde TSLP üretimini tetikleyen faktörler arasında sitokinler ($TNF-\alpha$, IL-1 β), solunumsal virüsler, bakteriler, mekanik hasar, alerjenler, sigara dumanı, triptaz gösterilmiştir (31). Astım hastalarında sigara maruziyeti sonrası akciğer dokusunda TSLP ifadenmesi ve Th2 tipi immün yanıtın ortaya çıkışı da hayvan modellerinde gösterilmiştir. Fareler intranazal ya da intratrakeal olarak 7 gün boyunca sigara dumanı ekstratına maruz bırakılmıştır, TSLP ifadenmesinin doz bağımlı olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca heme oksijenaz-1 mRNA miktarlarındaki artış ile birlikte bu etkinin oksidatif stress yoluyla olduğu, $TNF-\alpha$ bağımlı bir yanıt olduğu izlenmiştir. TSLP mRNA ve protein ifadenmesinin bir antioksidan molekül olan N-asetil sistein (NAC) ile geri çevrilebilir olduğu da gösterilmiştir (4,32). Buradan yola çıkarak RÖ etiolojisindeki mekanik hasar ve sigara dumanının da benzer hücresel yolları tetikleyerek bulguları oluşturuyor olabileceği düşünülmüştür.

2.4.3. İnflamatuvar Hastalıklardaki Yeri

TSLP' nin ilk olarak atopik dermatit (AD), astım, eozinofilik özofajit gibi alerjik hastalıkların patogeneğinde yeri olduğu gösterilmiştir. Yeni gelişmeler ise TSLP 'nin kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve çölyak hastalığı gibi kronik inflamasyon ile karakterize hastalıklar ve bazı kanserlerde de yeri olduğunu göstermiştir. IL-25' in de astımlı hastalarda ve nazal polibin eşlik ettiği kronik rinosinuzit (CRSwNP) hastalarında daha

yüksek oranlarda ifadelendiği, hastalığın şiddetiyle korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir. IL-33'ün de benzer şekilde CRSwNP hastalarında ifadenme miktarı bilgisayarlı tomografi (BT) ile endoskopik muayenedeki hastalık şiddeti ve tip 2 inflamasyon sitokinlerin ifadenme seviyesiyle korelasyon göstermektedir (2).

2.4.4. Larinks ve Üst Solunum Yolu Diğer Yapılarında TSLP İzolasyonu

Larinkste de TSLP izolasyonu yapılmıştır ancak çalışmalar yok denecek kadar azdır. Aritenoid fibroblastlarında farklı toll-benzeri reseptör (TLR) ligandları ve TSLP üretiminin etkileşimi araştırılmıştır. Sentetik çift zincirli RNA analogu varlığında TSLP üretiminde IL-4 sinerjistik etkisi ile 100 kata kadar artış gözlenmiştir (33). İnsan larinks epitelinde ise larinks skuamöz hücreli kanserinde gösterilmiştir (34). Bilgilerimiz dahilinde larinks benign lezyonlarındaki olası anahtar rolü ile ilgili bir araştırma ise çalışmamızdan önce yapılmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışma Tasarımı

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı, Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı ile Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı tarafından multidisipliner olarak yürütülmüştür. Prospektif, kontrol gruplu, bir klinik çalışmadır. Başkent Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Proje no: 20/477).

Çalışmaya dahil edilen hastalar kulak burun boğaz kliniğinde RÖ tanısı alan hastalar içinden seçilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda aşağıdaki şartlar aranmıştır;

1. Reinke ödemi nedeniyle cerrahi tedavi alacak olmak,
2. 18 yaşın üzerinde kadın veya erkek olmak

Aşağıdaki kriterlerde açıklanan özellikleri gösteren hastalar dışlanmıştır;

1. Tiroid hastalığı bulunanlar
2. Kronik karaciğer, böbrek veya kalp hastalığı bulunanlar
3. Hormonoterapi alan hastalar (sentetik östrojen, progesteron)
4. Kemoterapi alan hastalar
5. Malign karakterli hastalık tanısı olanlar
6. Gebeler

Tüm hastalardan çalışmaya katılmaları için yazılı olarak gönüllü olur formu alınmıştır. Hastaların kimlik bilgileri kullanılmamıştır ya da açıklanmayacaktır.

Hastaların yaşı, cinsiyeti, meslekleri, sigara kullanım öyküleri, LFR ile ilişkili olabilecek şikayetleri, kronik hastalık öyküsü, profesyonel ses kullanıcısı olup olmadığı, kullandığı

ilaçlar, kanser öyküsünü içeren bilgileri kaydedilmiştir. Hastaların videolaringostroboskop (VLS) ile yapılan muayene görüntüleri kaydedilmiştir.

Reinke ödemi üzerine yapılmış önceki çalışmalardakine benzer şekilde sigara içip Reinke ödemi olan hastalar çalışma grubu, sigara içmeyen ve vokal kordun diğer benign karakterli lezyonları (vokal kord polibi, kisti, nodülü) nedeniyle ameliyat edilecek hastalar kontrol grubuna dahil edilmiştir (23). Yapılan biyoistatistik ön değerlendirme sonucu doğrultusunda 0,03' lük hata payı ile çalışma grubu 15, kontrol grubu da 15 hastadan oluşturulması planlanmıştır.

3.2.Gönüllülerin Çalışmaya Alınışı ve Örnek Toplanması

3.2.1. Anamnez

Ameliyat öncesi tüm hastalardan reflü semptom indeksi (RSİ) anketini ve hazırlanan anamnez formunu doldurmaları istenmiştir (35, 36). Hazırlanan anamnez formunda gönüllülere doktora geliş şikayetleri, şikayetin süresi, sigara kullanıp kullanmadığı ve miktarı, meslekleri, profesyonel ses kullanımı olup olmadığı, bilinen tiroid hastalığı, diğer sistemik hastalıkların varlığı, son 2 haftadır kullandığı ilaçlar, kemoterapi alıp almadığı ve gebelik olup olmadığı sorulmuştur. Dışlama kriterlerinden birine sahip olan hastalar çalışmaya alınmamıştır.

3.2.2. Videolaringostroboskopik İnceleme

Kulak burun boğaz polikliniğine ses ya da larinks ile ilgili şikayet ile başvuran hastalara 70 mm açılı rijid videolaringoskop ve Matrix PL Spectar cihazı (XION GmbH, Berlin) kullanılarak VLS yapılmıştır, görüntüler daha sonra analiz edilmek üzere kayıt altına alınmıştır. Muayeneleri RÖ ile uyumlu olan hastaların RÖ dereceleri de kaydedilmiştir. Ek laringeal patoloji olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.3. Laringofaringeal Reflü Açısından Değerlendirme

Hastalardan RSİ anketini doldurmaları istenmiştir. VLS muayene kayıtları incelenerek reflü bulgu skorları belirlenmiştir (37). Çalışma ve kontrol grubunun skorları

değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. Örneklem analizinin küçük olması nedeniyle alt grup analizi yapılmamıştır.

3.3.Patolojik İnceleme

Mikrolaringoskopi sırasında çalışma grubu hastalarından eksize edilen Reinke ödemi materyali ve kontrol grubu hastalarının benign lezyonlardan alınan örneklerde tanısal patolojik inceleme yapılmasının ardından TSLP varlığı ve kaynağı İHK tekniği ile incelenmiştir.

3.3.1. Histopatolojik Değerlendirme

Spesimenler patoloji laboratuvarında 24 saat %10'luk tamponlanmış formaldehit ile tespit sonrası sıralı etil alkol ve ksilen içeren doku takip işlemlerini takiben uygun oryantasyon sağlanarak parafin bloklara gömüldü. Konvansiyonel bir mikrotomda parafin bloklardan 4-6 µm kesitler alındıktan sonra rutin Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası ile boyanan örnekler klinik tanıya kör bir patolog tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX53F, Tokyo/Japan) değerlendirildi.

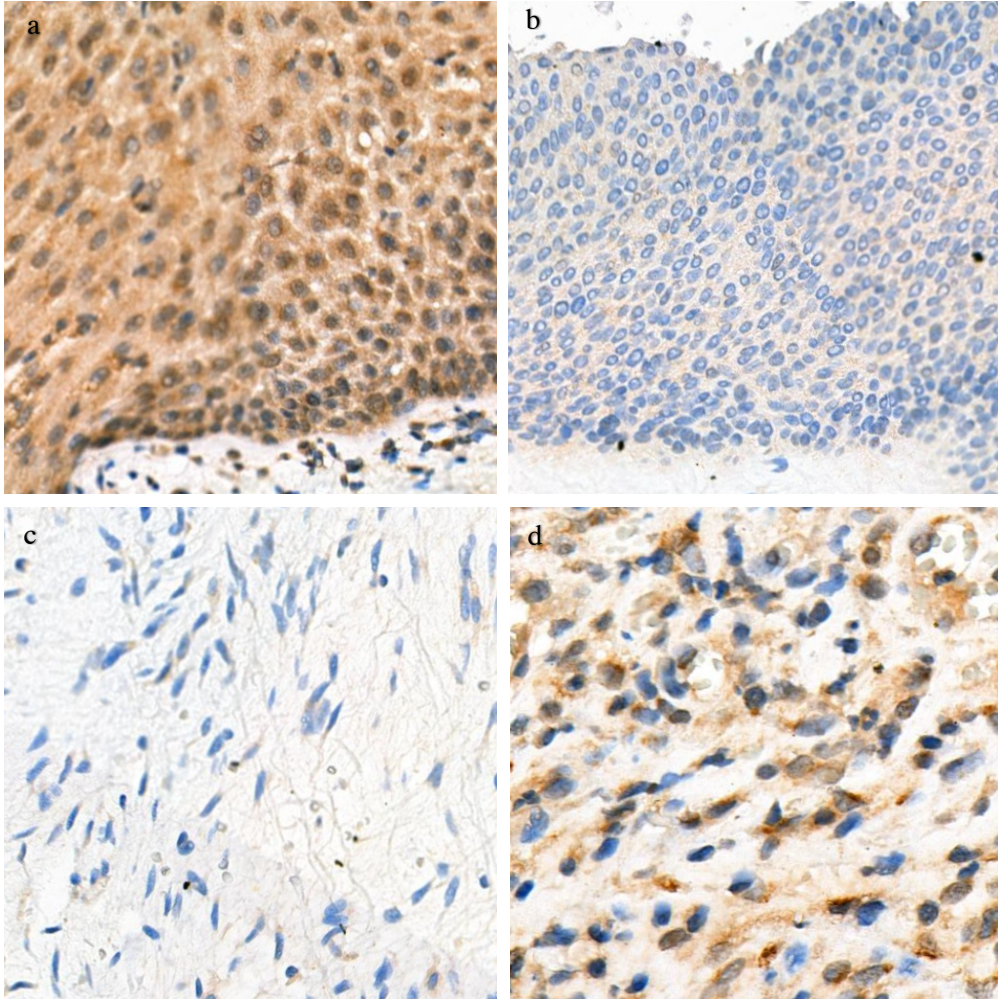
3.3.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Örneklerde TSLP varlığı ve hücresel kaynağını immunhistokimyasal olarak incelemek amacıyla her bir olgu için parafin bloklardan adezivli lamlara (Dako) 3µm kalınlığında kesitler alınmıştır. İHK boyama işlemi 'DAKO Omnis' cihazında EnVision Flex İHK boyama kitleri kullanılarak otomatik olarak yapılmıştır. İlgili bloklardan hazırlanan kesitler 60°C'lik etüvde 60 dakika bekletilmiştir. Deparafinizasyon işlemi camlara makinenin içinde 25°C'de 1 dakika "Clearify (Dako)" solüsyonu uygulanarak yapılmıştır. Ardından antijenlerin geri kazanılması için dokulara 'antigen retrieval' işlemi uygulanmıştır. TSLP antikoru için dokular 97 °C'de 30 dakika EDTA tamponunda (EnVFlex HRS, High pH) kaynatılmıştır. Yıkama işleminin ardından; TSLP antikoru (rabbit polyclonal, 1:200, cat no:GTX129591, Genetex) ile 30 dakika inkübasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra primer antikorla muamele edilmiş dokulara zemin boyanmanın engellenmesi amacıyla kite ait peroksidaz solüsyonu (EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent,Dako) uygulanarak 3

dakika inkübe edilmiştir. Yıkama işleminin ardından EnV Flex/HRP solüsyonu damlatılarak 20 dakika inkübe edilmiştir. Kesitlere kromojen ve enzim substratı içeren çalışma solüsyonu (EnV Flex Substrate Working Solution,Dako) damlatılıp oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. En son basamakta hematoksilen ile 5 dakika zıt boyama işlemi yapıp alkol, ksilen aşamalarından geçirilerek kapama işlemi gerçekleştirilmiştir.

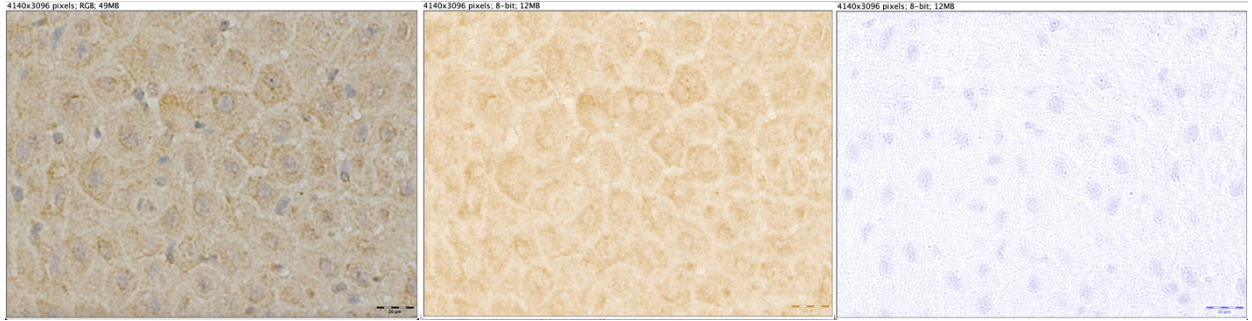
Stroma ve epitel için ayrı ayrı boyanma paterni (fokal ya da yaygın), epitel için boyanma derinliği (yüzeyel ya da tam kat) ve stroma ve epitel için boyanma şiddeti (H skoru 0-3, 0: boyanma yok, 1: hafif şiddette boyanma, 2: orta şiddette boyanma, 3: güçlü boyanma) semikuantitatif olarak, bağımsız patolog tarafından deney grubuna kör bir şekilde ışık mikroskopunda (Olympus BX53F, Tokyo/Japan) belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Preparatlar ayrıca 3DHistech Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH Ltd, Budapest, Hungary) slayt tarama cihazında TLSP boyalı lamalar 20x ve 40x objektifi ile dijital olarak taranmıştır. Preparatlar, görüntü analiz programı olan Virapath-4.0.1 (Virasoft Yazılım A.Ş., İstanbul, Türkiye) programı ile görsel materyal elde etmek amacıyla görüntülenmiştir.

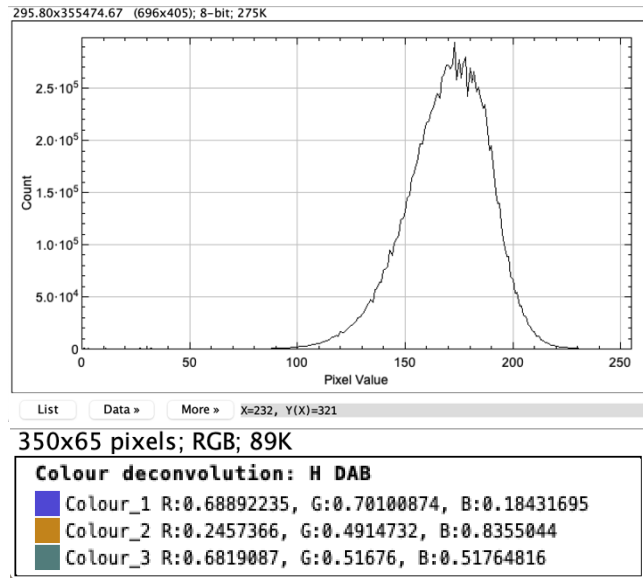


Şekil 3.1. TSLP immunhistokimya boyanması ışık mikroskobu 20x büyütme görüntüler. a.Epitelde orta şiddette boyanma, b. Epitelde boyanma yok, c. Stromada boyanma yok, d. Stromada orta şiddette boyanma.

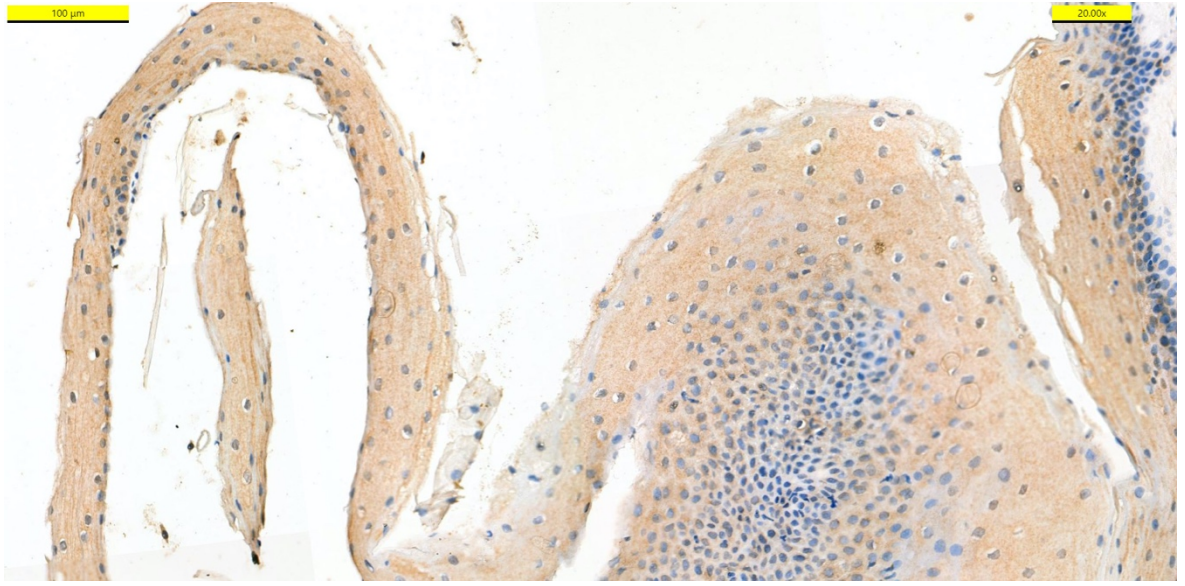
Preparatların dijital görüntüleri elde edildikten sonra ayrıca boyanma şiddetini değerlendirmek için optik dansitelerin dijital olarak Image J programında (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, ABD) IHC profiler eklentisi kullanılarak semikuantitatif analizi yapılmıştır (38). IHC profiler eklentisinin DAB/ hemotoksilen için renk ters evrişimi ile DAB spektrumunu ayrıştırması ve sonrasında piksel analizi ile optik dansite hesabı yapılışına dair ekran görüntüsü Şekil 3.2 ve 3.3 de verilmiştir. Taranan slayt görüntüntüleri artefaktların ve boş alanların hesabı bozmaması amacıyla IHC profiler ile analiz yapılmadan önce Adobe Illustrator (Adobe Inc. CA, ABD) programında epitel ve stroma dokuları artefaktlar ile arka plan dışlanacak, başka görüntü dahil edilmeyecek şekilde kırpılmıştır (Şekil 3.4 ve 3.5).



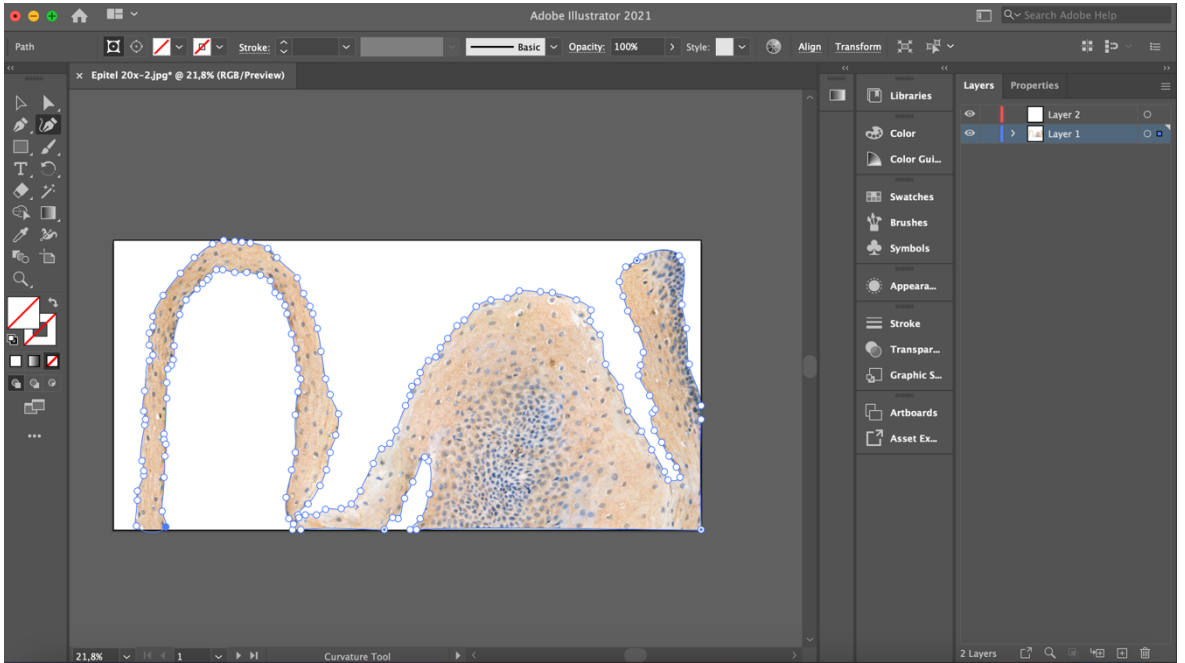
Şekil 3.2. IHC profiler eklentisi ile ters renk evrişimi



Şekil 3.3. IHC profiler eklentisi DAB spektrumunun piksel analizi ve optik dansite skor grafiği



Şekil 3.4. Slayt görüntüsünün taranmış, 20x büyütme görüntüsü



Şekil 3.5. Adobe Illustrator programında epitel ölçümleri görüntünün yalnızca epitel dokusu dahil edilecek şekilde kırılması

3.4.Moleküler İnceleme

Biyopsi örneklerinden patolojik inceleme için gerekli kısım ayrıldıktan sonra arta kalan doku taşıma ortamı içine alınıp Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır. Sitokin ifadenme düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile tespit edilmiştir. Kontrol grubundan bir hastanın dokusunda çalışılacak yeterli materyel olmadığı için moleküler incelemeler toplam 25 hastada yapıldı.

3.4.1. RNA (ribonükleik asit) İzolasyonu

RNA izolasyonu guanidinium thiocyanate-fenol kloroform prensibi ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (39). Doku örnekleri Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 'na ulaştırıldığında, bekletilmeden 1mL BlueZol içerisinde homojenize edildi (Firma-katalog no) ve -20°C'de saklandı. Bu aşamadan sonra RNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu işlemin basamakları aşağıda verilmiştir.

Örnekler 20°C'den çıkarıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örneklerin üzerine 0,2mL kloroform eklendi. 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Örnekler 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 4°C'de 12000xg'de 15 dakika santrifüje edildi. Bu aşamada aköz faz, interfaz ve organik fazların ayrıştığı gözlemlendi. RNA'yı içeren aköz faz başka bir 1.5 mL'lik ependorf tüpe transfer edildi. Üzerine 0.5mL izopropil alkol eklendi ve karıştırıldı. 4°C'de 120 dk inkübe edildi. 4°C' de 12000xg' de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Örnek %75'lik etanol ile yıkandı. Elle karıştırıldıktan sonra 4°C'de 15000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpler oda sıcaklığında ters çevrildi ve etanol uçurularak kurutuldu. RNA, DEPC ile muamele edilmiş distile su eklenerek tekrar çözünür hale getirildi. İzole edilen RNA'nın miktarı ve kalitesi NanoDrop 2000 Spektrofotometre (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak analiz edildi.

3.4.2. cDNA (komplemanter deoksiribonükleik asit) Sentezi

Random hexamerler kullanılarak cDNA sentezi Thermo Scientific Revert Aid birinci sarmal cDNA sentez kiti kullanılarak yapıldı. Her bir örnekten 500ng RNA alınarak 1µL random

hexomer primer ile karıştırıldı. Toplam hacim 12 µL'ye su ile tamamlanmıştır. Örnekler 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu sırada aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı:

4 µL reaksiyon buffer,
1µL RNAz inhibitörü,
2 µL 10mM dNTP mix,
1µL RevertAid M-MuLV RT (200U/ µL)

Her örneğin üzerine yukarıda içeriği verilen karışımdan 8µL eklendi ve karıştırıldı. Örnekler aşağıda verilen sıcaklıklarda verilen sürelerde inkübe edildi:

25°C'de 5 dakika

45°C'de 60 dakika

70°C'de 5 dakika

RT-PCR 'da kullanılabilecek kadar sentez edilen cDNA lar -20°C'de saklanmıştır.

3.4.3. RT-PCR Analizi

Bu aşamada *TSLP*, *IL25*, *IL33*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL13*, *TNF-alfa*, *CCL17*, *CCL22*, *IL-10*, *interferon gama* ve *TGF-beta* genlerinin ifadenmelerindeki değişimler semikantitatif RT-PCR yöntemi ile ve EvaGreen ((Luna evrensel qPCR karışımı, New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) boyası kullanılarak incelenmiştir. Genlerin ifadenme düzeylerinin hesaplanmasında RPLP0 geni, housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Primer dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. İfadelenme analizi sırasında kullanılan primer dizileri

Gen	Amplikon boyu (bp)	Forward Primer (5'>3')	Reverse Primer (5'>3')	Referans
TSLP	162	ATGTTTCGCCATGAAAATAAGG	GCGACGCCACAATCCTTGTA	41-43
IL25	269	GAGCGACCCAGATTAGGTGAG	TATCTCCAGGGGAGATGGC	40
IL33	94	GTGACGGTGTGATGGTAAGAT	AGCTCCACAGAGTGTTCCTTG	41-43
IL4	150	CCAACTGCTTCCCCCTCTG	TCTGTTACGGTCAACTCGGTG	40
IL5	132	TCTACTCATCGAACTCTGCTGA	CCCTTGACAGTTTGACTCTC	41-43
IL6	159	AACCTGAACCTTCCAAAGATGG	TCTGGCTTGTTCCTCACTACT	40
IL13	134	CCTCATGGCGCTTTTGTGAC	TCTGGTTCTGGGTGATGTTGA	41-43
TNF- α	91	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC	41-43
CCL22	100	ATTACGTCCGTTACCGTCTGC	TCCCTGAAGGTTAGCAACACC	41-43
CCL17	222	CACGCAGCTCGAGGGACCAATGTG	TCAAGACCTCTCAAGGCTTTGCAGG	44
IL10	176	TCAAGGCGCATGTGAACTCC	GATGTCAAACCTCACTCATGGCT	41-43
IFN- γ	93	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC	41-43
TGF- β	77	TGGACATCAACGGGTTCATA	AAGCAGGAAAGGCCGGTT	46
RPLP0	160	CTGGAAGTCCAATACTTCCT	CATCATGGTGTCTTGCCCAT	45

RT-PCR reaksiyon içeriği:

EvaGreen 10 μ L,
ileri primer 10 μ L,
ters primer 10 μ L,
cDNA 2 μ L
Nukleazdan arındırılmış saf su 20 μ L

Tüm reaksiyonlar için gerekli miktarda Luna evrensel qPCR ana karışım ilgili primer ile hazırlandıktan sonra her bir gen ifadelenmesi için bu aşamalar ayrı ayrı tekrarlandı. Hazırlanan karışım qPCR plaklarına her bir hasta için ikişer ölçüm yapılacak şekilde dağıtılmıştır, kapağı sağlam bir şekilde kapatılmıştır. Hazırlanan cDNA örnekleri plaklara hastalara ait haznelere dağıtılmıştır. Plaklar 1 dakika 2500 rpm de çevrildikten sonra RT-PCR cihazına (Bio-Rad CFX96 Real- Time System, C100 Thermal Cycler, Bio-Rad

Hercules CA, ABD) yerleştirilmiştir. Uygulanan döngülerin detayları Tablo 4.2’ de verilmiştir.

Tablo 3.2. RT-PCR analizinde uygulanan sıcaklık döngüsü

95°C’de 60 saniye	1 döngü
95°C’de 15 saniye	45 döngü (Ölçüm)
60°C’de 30 saniye	
Erime eğrisi analizi 60-95°C	1 döngü

İfadelenme düzeyine ait elde edilen ham veriler 2^{-ddCt} yöntemi ile analiz edilmiştir (47).

3.5.İstatistiksel Analiz

Verilerin analiziden öncelikle sürekli verileri dağılımının normal olup olmadığı histogramların görsel değerlendirilmesi, Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılan sürekli veriler ortalama ve standart sapma ile raporlanıp iki grup arasında karşılaştırılmaları bağımsız t-testi ile, normal dağılım göstermeyen veriler ise Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Kategorik verileri ise sayı ve yüzde ile raporlandı. Kategorik verileri gruplar arasında karşılaştırmasında ise Ki-kare testi veya Fisher ’in kesin testi kullanıldı. İstatistiksel analiz SPSS sürüm 13 (IBM, New York, ABD) programı ile yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada Aralık 2020 – Haziran 2022 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'na başvuran ve Reinke ödemi tanısı alan 12 hasta ile kontrol grubunda yer alan 14 hasta olmak üzere toplam 26 hastanın verileri analiz edildi. 0.03 lük hata payı olan toplam 30 hastaya 1,5 yılın sonunda ulaşılammıştır. Alınan örneklerdeki genetik materyali daha fazla bekletmemek amacıyla çalışma toplam 26 hasta ile tamamlanmış ve 0.05' lik güce ulaşılmıştır.

Çalışmaya katılan 11 (%42,3) hasta erkek ve 15 (%57,7) hastanın kadın, yaş ortalaması ise 50,5 (SS= 14,3) idi. Hastaların 24'ünde (%92,3) başvuru şikayeti ses kısıklığı, 2'sinde ise (%7,7) boğazda batma şikayeti mevcuttu. Şikayet süresinin ortalama 33,1 (SS 65,2) aydı. RÖ grubu aktif sigara içicilerinden oluşmaktaydı. Sigara kullanım süresi paket-yıl olarak incelendiğinde ortalama değer 30,8 paket-yıl (SS= 9,4) olarak bulundu. Sigarayı bırakmış kişileri ise ortalama 6,3 yıl (SS 12,3) önce sigarayı bıraktıklarını beyan etmişlerdir. Hastaların meslekleri incelendiğinde 10'u (%38,5) profesyonel ses kullanıcısı iken 3'ünün (%11,5) ses sanatçısı olduğu görülmüştür. Hastaların reflü bulgu skoru ortalaması 9,6 (SS 4,0) ve reflü semptom indeksi ortalaması 16,2 (SS 6,8) olarak bulundu.

Çalışma ve kontrol grupları arasındaki demografik veriler karşılaştırıldığında her iki grup arasında cinsiyetler, yaş ve başvuru şikayetleri, şikayet süreleri, profesyonel ses kullanıcılığı ve ses sanatçısı olma oranları arasında bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.1). RÖ grubundaki aktif sigara içiciler ile kontrol grubunda geçmişte sigara içme öyküsü olup sigarayı bırakmış olanlar karşılaştırıldığında RÖ grubundakilerin sigara kullanım süresi anlamlı yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). RÖ grubunda RFS ve RSİ ortalaması, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p=0,06$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma ve kontrol grubundaki hastaların demografik verilerinin karşılaştırması.

		Hasta Grupları		Toplam (yüzde) / Ortalama (SS)	Test istatistiği	P değeri
		Çalışma	Kontrol			
Cinsiyet	Erkek	4 (%15,4)	7 (%25,9)	11 (%42,3)	0,735	0,453*
	Kadın	8 (%30,8)	7 (%26,9)	15 (%57,7)		
Yaş (yıl)		51,8 (SS 11,3)	49,4 (SS 16,9)	50,5 (SS 14,3)	0,432	0,670**
Başvuru Şikayeti	Ses kısıklığı	11 (%42,3)	13 (%50,0)	24 (%92,3)	0,013	0,999 *
	Boğazda batma	1 (%3,8)	1 (%3,8)	2 (%7,7)		
Şikayet süresi (ay)		46,7 (91,6)	17,9 (SS 16,7)	33,1 (SS 65,2)	1,185	0,259**
Sigara kullanımı	Hayır	0 (%0,0)	9 (%34,6)	9 (%34,6)	28,242	<0,001 *
	Evet	12 (%46,2)	0 (%0,0)	12 (%46,2)		
	Bıraktım	0 (%0,0)	5 (%19,2)	5 (%19,2)		
Sigara kullanım süresi (paket-yıl)		30,8 (SS 9,4)	4,3 (8,7)	17,0 (16,2)	7,022	<0,001 **
Meslek	Profesyonel ses kullanıcıları	5 (%19,2)	5 (%19,2)	10 (%38,5)	0,097	0,999 *
	Diğer	7 (%26,9)	9 (%34,6)	16 (%62,5)		
Ses sanatçılığı	Evet	2 (%7,7)	1 (%3,8)	3 (%11,5)		
	Hayır	10 (%38,5)	13 (%50,0)	23 (%88,5)	0,574	0,580*
Reflü bulgu skoru (RFS)		12,4 (2,9)	7,2 (3,2)	9,6 (4,0)	4,297	<0,001 **
Reflü semptom indeksi (RSİ)		19,2 (6,5)	13,7 (6,2)	16,2 (6,8)	1,982	0,06**

* Fisher'ın Kesin testi

** Bağımsız t testi

İHK analizleri alınan örneklerin milimetrik boyutta olması, tanısal inceleme sonrası parafin blokta kalan rezidünün çok ince olması ve İHK boyamaları yapılırken kontrol grubunda 2 hastada geriye doku kalmaması nedeniyle İHK analizleri toplam 24 hastada tamamlanabilmektedir. 12 çalışma ve 12 kontrol hastasının ışık mikroskopisi altında İHK Semiquantifikasyon bulguları incelendiğinde çalışma ve kontrol grupları arasında epitel boyama, epitel boyama tipi, epitel boyama derinliği, stroma boyama yoğunluğu ve stroma boyama tiplerinde istatistiksel bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.2)

Tablo 4.2. Immünohistokimya Manuel Semikuantifikasyon bulgularının Çalışma ve Kontrol grubundaki hastalarda karşılaştırılması.

		Hasta Grupları		Toplam (%)	Test istatistiği	P değeri
		Reinke Ödemi	Kontrol			
Epitel Boyama	0	1 (%4,2)	1(%4,2)	2 (%8,3)	33,787	0,291 *
	1	6 (%25,0)	10 (%41,7)	16 (%66,7)		
	2	4 (%16,7)	1 (%4,2)	5 (%20,8)		
	3	1 (%4,2)	0 (%0,0)	1 (%4,2)		
Epitel Boyama Tipi	Boyanma yok	1 (%4,2)	1 (%4,2)	2 (%8,3)	0,512	0,999 *
	Fokal	4 (%16,7)	3 (%12,5)	7 (%29,2)		
	Yaygın	7 (%29,2)	8 (%33,3)	15 (%62,5)		
Epitel Boyama Derinliği	Yok	1 (%4,2)	1 (%4,2)	2 (%8,3)	3,502	0,590 *
	Tam Kat	8 (%33,3)	11 (%45,8)	19 (%79,29)		
	Yüzeyel	1 (%4,2)	0 (%0,0)	1 (%4,2)		
	Üst 2/3	1 (%4,2)	0 (%0,0)	1 (%4,2)		
	Alt 2/3	1 (%4,2)	0 (%0,0)	1 (%4,2)		
Stroma Boyama Yoğunluğu	0	1 (%4,2)	3 (%12,5)	4 (%16,7)	5,970	0,095 *
	1	2 (%8,3)	6 (%25,0)	8 (%33,3)		
	2	7 (%29,2)	3 (%12,5)	10 (%41,7)		
	3	2 (%8,3)	0 (%0,0)	2 (%8,3)		
Stroma Boyama Tipi	Boyanma yok	1 (%4,2)	3 (%12,5)	4 (%16,7)	2,862	0,350 *
	Fokal	4 (%16,7)	6 (%25,0)	10 (%41,7)		
	Yaygın	7 (%29,2)	3 (%12,5)	10 (%41,7)		

*Fisher' in kesin testi

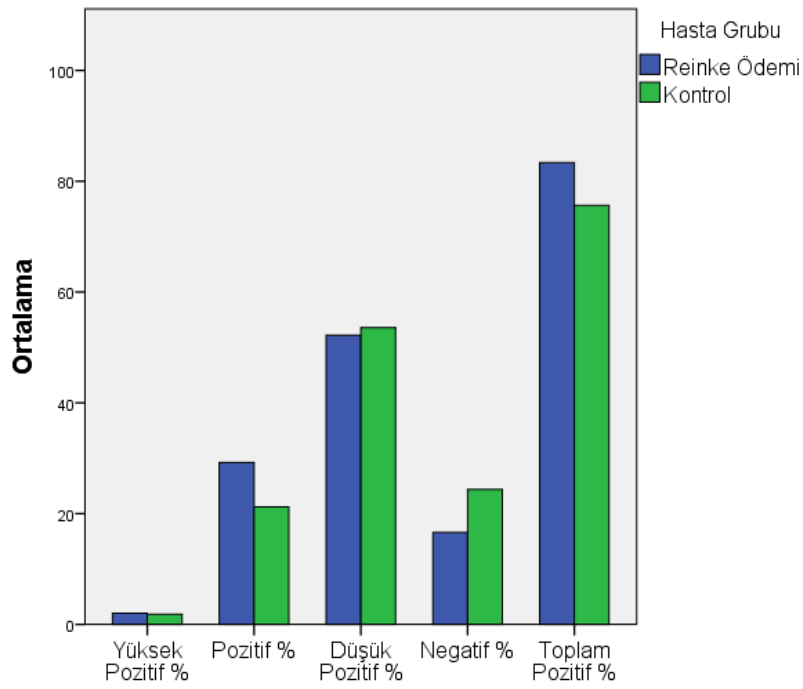
Çalışma ve kontrol grubunun dijital epitel skor yüzdeleri karşılaştırıldığında RÖ grubunda toplam pozitif boyanma %83,38 bulunurken kontrol grubunda bu değer %75,64 olmuştur fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,493$). Bunun yanında her iki grup arasındaki yüksek pozitif, pozitif, düşük pozitif, negatif yüzde değerlerinde de istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Aynı zamanda skor değerleri de çalışma ve kontrol grupları arasında fark bulunmamıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.1).

Tablo 4.3. Epitel için dijital optik dansite ölçümleri ve skorlarının çalışma ve kontrol grubunda karşılaştırılması.

	Hasta Grupları		Toplam (%) / Ortalama (SS)	Test istatistiği	p
	Reinke Özemi	Kontrol			
Yüksek Pozitif %	2,03 (1,91)	1,84 (2,68)	1,93 (2,28)	0,198	0,845 *
Pozitif %	29,25 (22,57)	21,22 (21,02)	25,23 (21,71)	0,902	0,377 *
Düşük Pozitif %	52,20 (21,13)	53,59 (20,57)	52,90 (20,40)	-0,163	0,872 *
Negatif %	16,62 (27,00)	24,36 (27,39)	20,49 (26,89)	-0,697	0,493 *
Toplam Pozitif %	83,38 (27,00)	75,64 (27,39)	79,51 (26,89)	0,697	0,493 *
Skor 0	1 (%4,2)	2 (%8,3)	3 (%12,5)	0,569	0,999 *
1	5 (%20,8)	5 (%20,8)	10 (%41,7)		
2	6 (%25,0)	5 (%20,8)	11 (%45,8)		

* Bağımsız t testi,

** Fisher'in Kesin testi



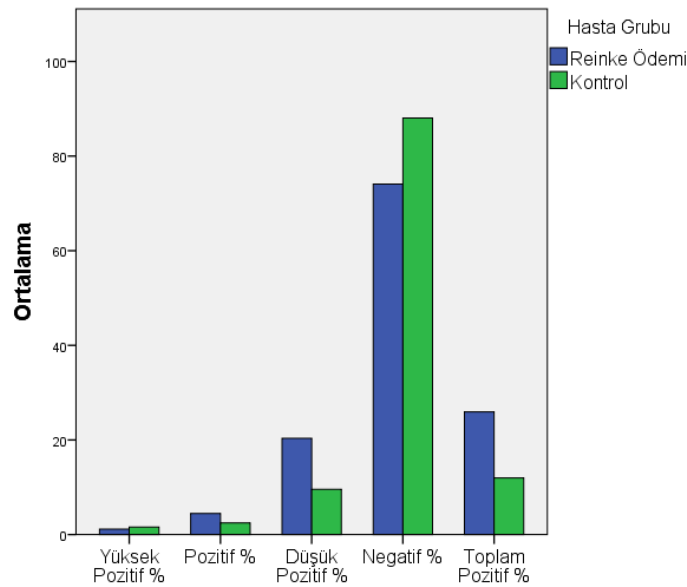
Şekil 4.1 Dijital epitel skor yüzdelерinin hasta gruplarına göre ortalama değeri

Çalışma ve kontrol grubunun dijital stroma skor yüzdeleri karşılaştırıldığında yüksek pozitif ve pozitif skorları çalışma ve kontrol gruplarında farklı bulunmamıştır. Düşük pozitif oranları ($p=0,004$) ve toplam pozitif oranları çalışma grubunda ($p=0,004$), negatiflik ise kontrol grubunda yüksek bulunmuştur ($p=0,004$). Skor değerleri de çalışma ve kontrol grupları arasında fark bulunmamıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Dijital stroma optik dansite ölçümleri ve skorlarının çalışma ve kontrol grubunda karşılaştırılması.

	Hasta Grupları		Toplam (%) / Ortalama (SS)	Test istatistiği	p
	Reinke Ödemi	Kontrol			
Yüksek Pozitif %	1,14 (1,11)	1,60 (1,45)	1,37 (1,28)	-0,863	0,397 *
Pozitif %	4,45 (3,62)	2,46 (2,17)	3,46 (3,09)	1,626	0,118 *
Düşük Pozitif %	20,34 (9,21)	9,57 (7,21)	14,95 (9,78)	3,191	0,004 *
Negatif %	74,07 (12,12)	88,04 (9,29)	81,05 (12,74)	-3,168	0,004 *
Toplam Pozitif %	25,93 (12,12)	11,96 (9,29)	18,95 (12,74)	3,168	0,004 *
Skor	0	10 (%41,7)	12 (%50,0)	2,182	0,478 **
	1	2 (%8,3)	0 (% 0,0)		

* Bağımsız t testi, ** Fisher'ın Kesin testi



Şekil 4.2. Dijital stroma skor yüzdelерinin hasta gruplarına göre ortalama değерleri

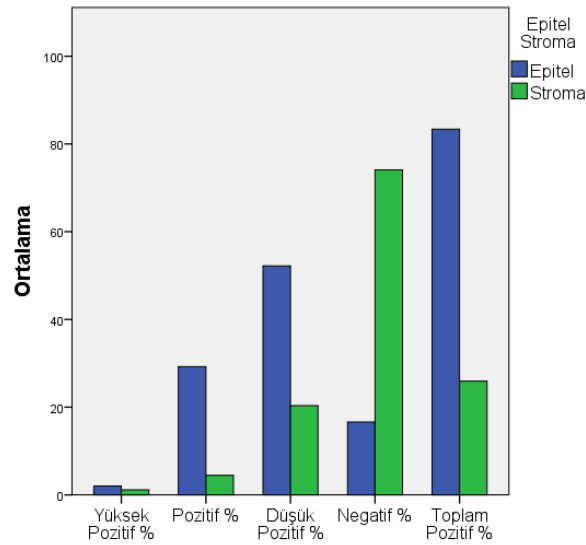
RÖ grubunda epitel ve stroma optik dansite değerleri karşılaştırıldığında, yüksek pozitif değerleri her iki grupta aynı bulunmasına rağmen pozitif, düşük pozitif ve toplam pozitif oranları epitel grubunda, negatif değerleri ise stroma grubunda daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Skorlar karşılaştırıldığında da benzer şekilde epitel grubunun skorları, stroma grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Tablo 4.5. Çalışma grubunda epitel ve stroma optik dansite ölçüm değerlerinin karşılaştırılması.

	Epitel	Stroma	Toplam (%) / Ortalama (SS)	Test istatistiği	p
Yüksek Pozitif %	2,03 (1,91)	1,14 (1,11)	1,58 (2,59)	1,386	0,180 *
Pozitif %	29,25 (22,57)	4,45 (3,62)	26,85 (20,26)	3,759	<0,001 *
Düşük Pozitif %	52,20 (21,13)	20,34 (9,21)	36,27 (22,78)	4,790	<0,001 *
Negatif %	16,62 (27,00)	74,07 (12,12)	45,35 (35,78)	-6,725	<0,001 *
Toplam Pozitif %	83,38 (27,00)	25,93 (12,12)	54,65 (35,78)	6,725	<0,001 *
Skor 0	1 (%4,2)	10 (%41,7)	11 (%45,8)	14,875	<0,001 **
1	5 (%20,8)	2 (%8,3)	7 (%29,2)		
2	6 (%25,0)	0 (%0,0)	6 (%25,0)		

*: Bağımsız t testi

** Fisher'in Kesin testi



Şekil 4.3. Çalışma grubunda epitel ve stroma yüzdelерinin ortalama değeri

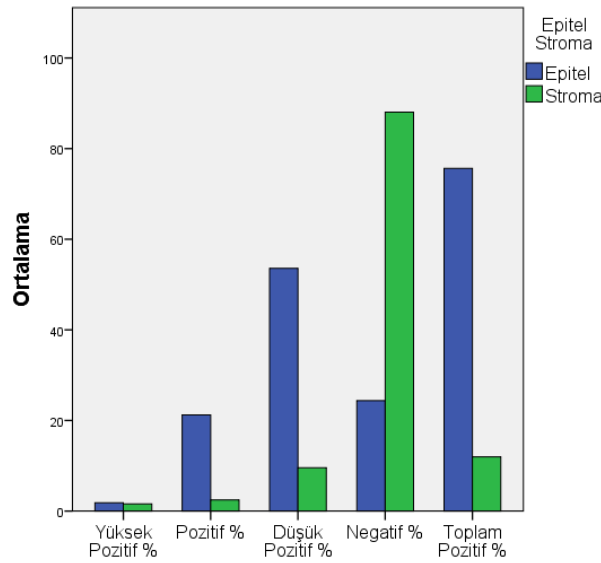
Kontrol grubunda epitel ve stromanın dijital optik dansite ölçümleri karşılaştırıldığında, yüksek pozitif değerleri her iki grupta benzer bulunmasına rağmen pozitif, düşük pozitif ve toplam pozitif değerleri epitel grubunda, negatif değerleri ise stroma grubunda daha yüksek bulunmuştur ($p=0,01$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Skorlar karşılaştırıldığında da epitel grubunun skorları, stroma grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Tablo 4.6. Kontrol grubunda epitel ve stroma değerlerinin karşılaştırılması.

	Epitel	Stroma	Toplam (%) / Ortalama (SS)	Test istatistiği	P değeri
Yüksek Pozitif %	1,84 (2,68)	1,60 (1,45)	1,72 (2,11)	0,275	0,786 *
Pozitif %	21,22 (21,02)	2,46 (2,17)	11,84 (17,47)	3,074	0,01 *
Düşük Pozitif %	53,59 (20,57)	9,56 (7,21)	31,58 (27,07)	6,997	<0,001 *
Negatif %	24,36 (27,39)	88,04 (9,29)	56,20 (38,18)	-7,627	<0,001 *
Toplam Pozitif %	75,64 (27,39)	11,96 (9,29)	43,80 (38,18)	7,627	<0,001 *
Skor 0	2 (%8,3)	12 (%50,0)	12(%58,3)	17,016	<0,001 **
1	5 (%20,8)	0 (%0,0)	5 (%20,8)		
2	5 (%20,8)	0 (%0,0)	5 (%20,8)		

*: Bağımsız t testi

** Fisher'in Kesin testi



Şekil 4.4. Kontrol grubunda epitel ve stroma yüzdelerinin ortalama değerleri

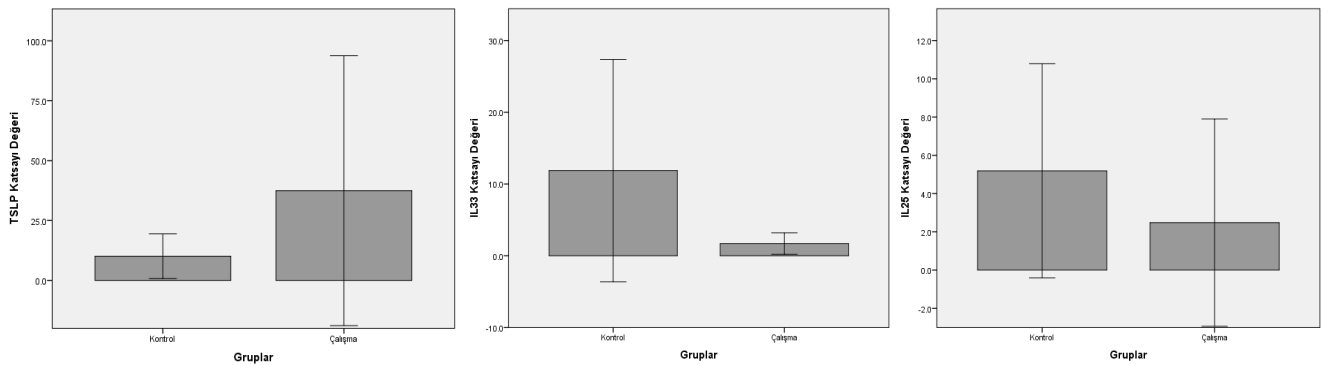
Çok düşük hacimli ve az hücre içeren örneklerde çalışıldığından RT-PCR sırasında döngü sayısı çok artmasına rağmen housekeeping gende yeterli ifadelenmeye ulaşamadığından sonuç alınamadığı durumlarda örnek sayısında düşme yaşandı. Her sitokin için kaç hastada sonuç alındığı ve analizin kaç hasta üzerinde yapıldığı Tablo 4.7 de belirtilmiştir. *TSLP* ifadelenme oranları kontrol grubunda ortalama 10.1, (SS 15.4) ve Reinke grubunda ortalama 37.5, (SS 73.3) idi. Reinke grubunda *TSLP* ifadelenme oranları 27,4 kat yüksek saptandı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.300$). *IL25* ifadelenme oranları kontrol grubunda RÖ hastalarının 2.08 katıydı, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,449$). *IL33* da benzer şekilde kontrol grubunda RÖ hastalarının 7 katıydı, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,179$) (Tablo 4.7, Şekil 4.5).

Tablo 4.7. Sitokinlerin RT-PCR ile ölçülen ifadelenme oranlarının çalışma ve kontrol grubundaki hastalarda karşılaştırılması

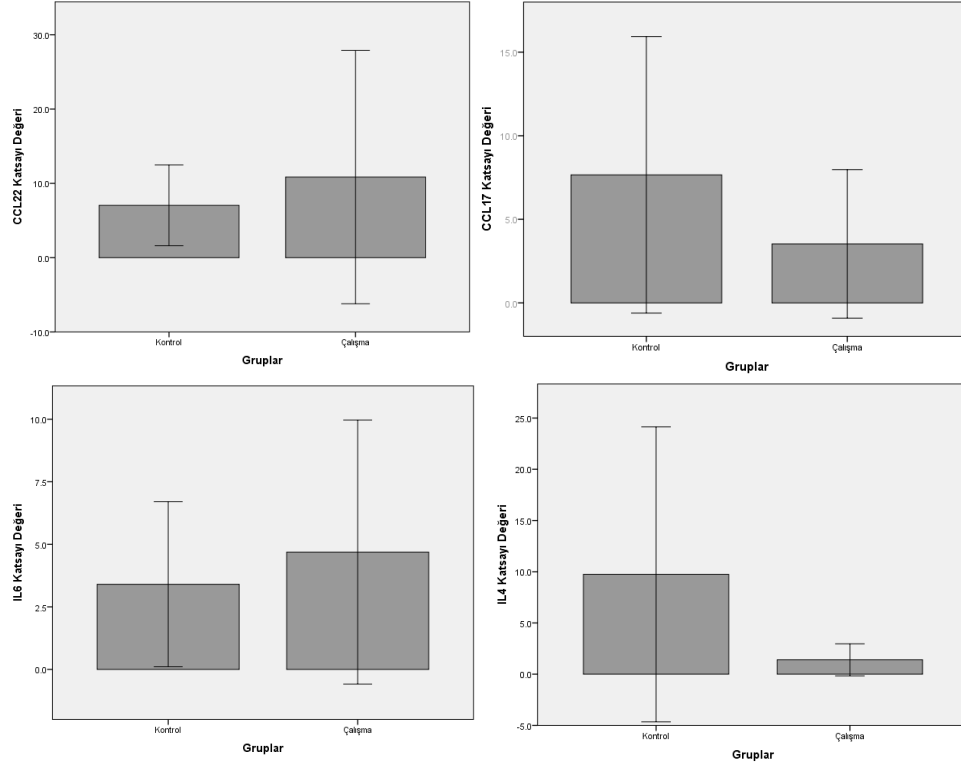
	Hasta grupları		Tüm hastalar	Test istatistiği	P değeri
	Reinke Hastaları Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Kontrol Grubu Ortalama $\pm$ Standart Sapma			
TSLP	37,5 $\pm$ 73,3 (n= 9)	10,1 $\pm$ 15,4 (n= 13)	21,3 (48,7)	-1,103	0,300
IL25	2,5 $\pm$ 7,0 (n=9)	5,2 $\pm$ 8,3 (n= 11)	3,9 (7,0)	0,773	0,449
IL33	1,7 $\pm$ 2,4 (n=12)	11,9 $\pm$ 25,7(n= 13)	7,0 (18,9)	1,424	0,179
CCL17	3,5 $\pm$ 7,0(n=12)	7,7 $\pm$ 13,7 (n= 13)	5,7 (11,0)	0,937	0,358
CCL22	10,8 $\pm$ 26,8 (n=12)	7,0 $\pm$ 9,0 (n= 13)	8,9 (19,3)	-0,485	0,632
IFN- γ	8,4 $\pm$ 17,8 (n=10)	3,9 $\pm$ 4,6 (n= 12)	6,0 (12,3)	-0,847	0,407
TGF- β	5,1 $\pm$ 9,3 (n=10)	3,7 $\pm$ 6,2 (n= 12)	4,3 (7,6)	-0,400	0,694
IL4	1,4 $\pm$ 2,5 (n=12)	9,7 $\pm$ 23,8 (n= 13)	5,7 (17,5)	1,205	0,240
IL5	2,4 $\pm$ 4,2 (n=12)	12,2 $\pm$ 28,1 (n= 13)	7,5 (20,7)	1,192	0,246
IL6	4,7 $\pm$ 7,9 (n=11)	3,4 $\pm$ 4,9 (n= 11)	4,0 (6,4)	-0,460	0,650
IL10	5,8 $\pm$ 9,7 (n=12)	18,5 $\pm$ 45,0 (n= 13)	12,4 (33,1)	0,995	0,338
IL13	8,4 $\pm$ 22,6 (n=12)	13,5 $\pm$ 37,3(n= 10)	10,7 (29,5)	0,398	0,695
TNF- α	18,4 $\pm$ 43,8 (n=11)	2,5 $\pm$ 3,3(n= 13)	9,8 (30,0)	-1,202	0,257

CCL17 ifadelenme miktarları kontrol grubunda RÖ grubuna göre 2.2 kat daha fazla görüldü, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,358$). *CCL22*

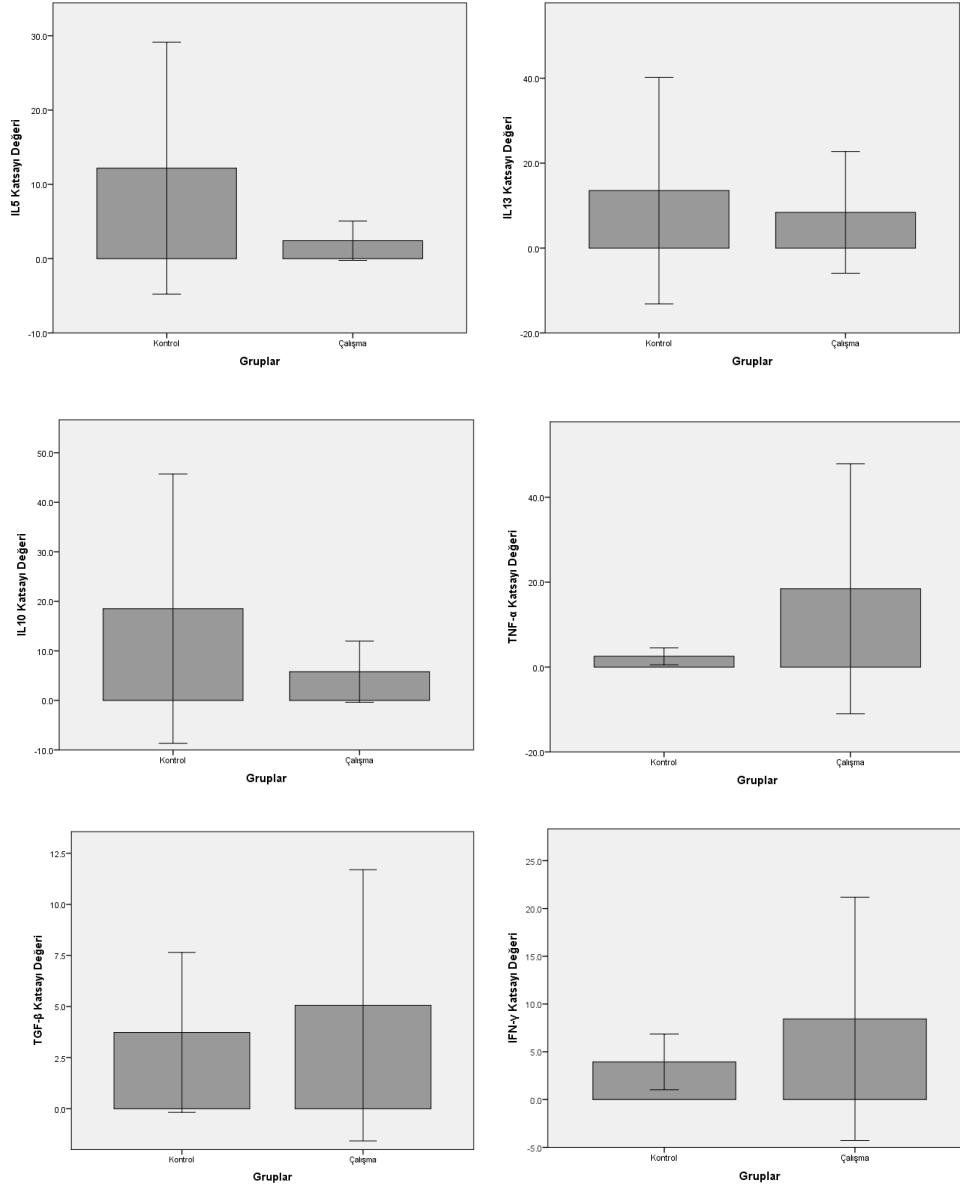
ifadelenme oranları her iki grupta benzer, RÖ grubunda kontrol grubuna göre 1.54 kat fazla görüldü, istatistiksel anlamlı bulunmadı ($p=0.632$). *IFN- γ* ifadelenme oranları RÖ grubunda kontrol grubunun 2.15 katı idi, farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.407$). *TGF- β* oranlarını benzer idi, RÖ grubundaki ifadelenme kontrol grubunun 1.37 katı idi. ($p=0.694$). *IL4* ifadelenme oranları kontrol grubunda RÖ hastalarının 6.92 katıydı, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p=0.240$). *IL5* ifadelenme oranlarını kontrol grubunda RÖ hastalarının 5.08 katıydı, istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p=0.246$). *IL6* ifadelenme oranları her iki grupta benzerdi, RÖ hastalarında kontrolün 1.38 katıydı, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.650$). *IL10* ifadelenme oranları kontrol grubunda RÖ hastalarının 3.19 katıydı fakat fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p=0.338$). *IL13* ifadelenme oranları kontrol grubunda RÖ hastalarının 1.61 katıydı fakat fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.695$). *TNF- α* oranlarını RÖ hastalarında kontrolün 7.36 katıydı, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.257$) (Tablo 4.7, Şekil 4.6, 4.7).



Şekil 4.5. *TSLP*, *IL33* ve *IL25* her iki gruptaki ifadelenmelerinin histogram grafiği olarak gösterimi



Şekil 4.6. *CCL22*, *CCL17*, *IL6* ve *IL4*' ün her iki gruptaki ifadenmelerinin histogram grafiği olarak gösterimi



Şekil 4.7. *IL5*, *IL13*, *IL10*, *TNF-α*, *TGF-β*, *IFN-γ* ün her iki gruptaki ifadenmelerinin histogram grafiği olarak gösterimi

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada amacımız RÖ immunopatogenezinde sigaranın tetikleyici bir faktör olduğu bilinen epitel kaynaklı sitokinlerin (*TSLP* başta olmak üzere *IL25* ve *IL33*) tip 2 inflamasyon yoluyla yapısal değişiklikleri başlatıcı bir faktör olup olmadığını belirlemektir. Elde ettiğimiz sonuçlar tip 2 inflamasyondan farklı bir sürece işaret etmekle birlikte *TSLP* ilişkili farklı immünmodulatorlerin devreye girebiliyor olduğunu düşündürmüştür.

TSLP'nin larinks dokusuna anatomik olarak yakın, histolojik olarak benzer özellikle olan dokularda inflamatuvar hastalıklardaki yeri çeşitli çalışmalarla tanımlanmıştır. Bunun yanında tetikleyici faktörler varlığında *TSLP* etkisiyle epitel kaynaklı tip 2 inflamasyon yanıtı oluşumunda tanımlayıcı olabilecek basamaklar ve ilişkili proteinlerin RÖ'de rolünün gösterilmiş olması da bu yolağın yapbozun kayıp parçalarından biri olabileceğini düşündürmektedir.

Solunum yolu epitelinin inflamatuvar bazı hastalıklarının ortaya çıkışındaki *TSLP* etkili tip 2 inflamatuvar yanıt üzerine yapılmış çalışmaları incelediğimizde astım, alerjik rinit ve kronik sinüzit patogenezindeki rolüne dair önemli bulgulara ulaşıldığını görürüz. Astım patofizyolojisinde *TSLP*'nin alerjen ile tetiklenmiş inflamasyonun hem ortaya çıkışında hem de sürdürülmesindeki öncül rolü, yapılmış çokça çalışma ile belgelenmiştir. Hayvan modellerinde astımlı hastaların *TSLP* ifadenmesi artmışken *TSLPR* eksik farelerde hastalığın kliniği belirgin hafiflemiştir (48). Astımda havayolunda artmış *TSLP* ifadenmesi ve hastalık şiddetiyle korelasyonu da rapor edilmiştir (49,50). Polipli ve polipsiz kronik rinosinüzit (KRS) hastalarının ameliyatta alınan spesimenleri incelendiğinde alt tipler arasında fark olmaksızın normal dokuya göre *TSLP* ve *TSLPR* ifadenmesinde anlamlı artış saptanmıştır (51). Alerjik rinitte de benzer şekilde hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış *TSLP* oranları saptanmıştır, *TSLP* miktarı ile korrele şekilde *IL4* miktarlarında artış da gözlenmiştir (52).

Reinke Ödemi materyalinde etkilenen dokuyu örten epitel ve patolojik alandaki ESM bileşen hücrelerinin proliferatif özellikleri incelendiğinde her iki dokuyu oluşturan hücrelerde bir proliferasyon artış göstergesi olan Ki67'de artış izlenmiştir. Epitel dokusunun da RÖ patogenezinde aktif rol oynadığı, fazladan ESM üretimini tetikleyici olabileceği ortaya atılmıştır (53). Fonotravma, sigara dumanı gibi iritan faktörlerin tümüne ilk maruz kalan

dokunun epitel dokusu olduğu düşünöldüğünde inflamasyonu ve travma yanıtını başlatan sinyalin epitel kaynaklı olması ihtimali makul gözökmektedir. Moleküler olarak olası böyle bir yolağı ortaya koyan bir veri henüz yoktur. Çalışmamızda vücuttaki diğör dokularda benzer iritanlara yanıt olarak inflamasyonun ortaya çıkmasında anahtar rol oynadığı gösterilen epitel kaynaklı *TSLP*, *IL25* ve *IL33*' ün ve yolağın aşağı akışındaki ilgili sitokinlerin RÖ immunopatogenezinde de öncöl tetikleyiciler olup olmadığını araştırdık.

TSLP' nin insan larinks dokusunda ifadelendiğı daha önce arkadaşları tarafından aritenoid fibroblast kültüründe (54), ve larinks kanserinde gösterilmiştir (34); fakat bilgimiz dahilinde vokal kord epitel ve lamina propriasında benign lezyonlarda ifadelendiğı çalışmamızdan önce gösterilmemiştir. Çalışmamızda İHK ile vokal kord epitel ve reinke boşluğunda *TSLP* boyanması izlenmiştir. Her iki grubun boyanma kuvveti karşılaştırıldığında ise RÖ ile kontrol grubumuz arasında epitelyal *TSLP* İHK boyanmasında h skoru ($P=0,291$) ile ya da dijital optik dansite analizlerinde ($p=0,493$) istatistiksel anlamlı fark tespit edilememiştir. Stroma boyanmasına bakıldığında ise dijital optik dansite ölçümlerinde toplam pozitiflik yüzdesi çalışma grubunda anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ($p=0,004$). Her iki grubun kendi içinde epitel ve stroma boyanmaları karşılaştırıldığında ise hem RÖ hem de kontrol grubunda epitelyal boyanma anlamlı şekilde daha yüksek çıkmıştır. Bu sonucun, reinke boşluğundaki hücre yoğunluğunun epitele göre oldukça az olmasından etkilendiğı düşünölmüştür. RT-PCR ölçümlerinde de RÖ grubunda kontrole göre *TSLP* ifadelenmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamakla birlikte ($p=0.300$) 27,4 kata varan artış gözlenmiştir. Sigaranın *TSLP*' yi tetikleyici etkisi, RÖ patofizyolojisi üzerine daha önce yapılan çalışmalar ve *TSLP*' nin ilişki içinde olduğı moleküler yolaklar ile ilgili ortaya konulan veriler birlikte değörlendirildiğinde görölen artış önceki verileri tamamlayıcı niteliktedir. Bahsi geöen veriler aşağıda özetlenmiştir.

TSLP gen ekspresyonunun *TNF- α* yoluyla *NF κ B* -bağımlı şekilde regöle edildiğı bilinmektedir (55). *TSLP*' nin *STAT3* sinyal yolağını kullandığı önceki çalışmalarda gösterilmiş (56), fare astım modelinde *TSLP* aşağı regölasyonu ile *STAT3* sinyal yolu inhibisyonunun hava yolu inflamasyonunu azalttığı da rapor edilmiştir (57). Hipoksinin *TSLP* ve *IL33* üzerindeki etkileri araştırıldığında, nazal mukozada hipoksik şartlarda ifadelenme miktarlarının her iki sitokin için de arttığı görölmüştür (58). Grill ve arkadaşları RÖ dokusundan alınan vokal kord fibroblastlarındaki sitokin yanıtlarının incelemişlerdir. Çalışmalarında bahsi geöen *TSLP*' nin aktif rolü gösterilmiş olan moleküler yolakları da

içeren, *STAT3* sinyal yolağı; *NF- κ B* ilişkili *TNF- α* yolağı; epitelyal mezankimal transizyon; hipoksi ve *TGF- β* yolaklarında kontrole göre artmış ifadenme rapor etmişlerdir (21). *TNF- α* miktarları da çalışmamızda önceki verilerin gösterdiğine paralel olarak beklediğimiz gibi RÖ' de kontrol grubuna göre toplam 7.36 kat olmak üzere yüksek çıkmış fakat fark istatistiksel anlamlı bulunmamıştır ($p=0.257$). Bu veriler bütünü RÖ de sigara etkisiyle ortaya çıkan yanıtta *TSLP*' nin rolü olduğu hipotezimizi desteklemektedir.

TSLP' nin RÖ patogenezinde bugüne kadar elde edilmiş verilerle buluşturan bir başka faktör ise oksidatif strestir. Branski ve arkadaşları RÖ'de sigara maruziyeti sonrası doz bağımlı meydana gelen oksidatif stresi heme oksijenaz ifadenmelerindeki artış ile net bir şekilde ortaya koymuşlardır. Oksidatif stres yanıtının larinks ve akciğer dokularında farklılık gösterip göstermediğine dair yapılan analizde ise ifadenmedeki artış trendi vokal kord fibroblastları ve akciğer fibroblastları için paralellik göstermiştir (23). Akciğerde sigara maruziyeti sonrası görülen oksidatif stress ve *TSLP* ifadenmelerindeki artış arasındaki sebep sonuç ilişkisinin belgelenmiş olması da (4), RÖ immunopatogenezinde *TSLP*' nin benzer şekilde aktif rol oynuyor olduğu yönündeki hipotezimizi güçlendirmektedir.

IL25 ve *IL33* 'e bakıldığında ise RÖ grubunda kontrole göre azalma gözlenmiştir, istatistiksel anlamlı fark gösterilememiştir. Bu iki sitokinin ifadenmesinde azalma olması *IL33*' ün *TSLP* üzerindeki pozitif geri bildirim etkisi ve *TSLP* gibi çevresel stimuluslara yanıt olarak epitelden salgılandıkları düşünüldüğünde (59) beklenenin aksinedir. *IL33*' ün KRS de ifadenmesi ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur, nazal mukozada yüksek miktarda gösterilmiş olmasına rağmen KRS'de artmış olduğuna dair veri yoktur. *IL25* seviyeleri KRS dokularında artmıştır, nazal polipli alt tip de dahil olmak üzere hastalık şiddeti ve kan eosinofilisi ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (60). Olası bir tedavi hedefi olarak *IL25* blokajının nazal polip fare modelinde polip yükünü azalttığı gösterilmiştir (61). *IL25* ve *IL33*' ün akciğer ve burun mukozasında etkilerini ILC2 hücreleri üzerinden gösterdiği birçok çalışmayla desteklenmiştir, larinkste ise bu sitokinlerin rolüne yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Bu yolağın aşağı akışında ILC2 hücreleri tarafından *IL5*, *IL9* ve *IL13* ifadenmesinde artış da gösterilmiştir (62,63). *TSLP*' nin olası *IL25* ve *IL33*' den bağımsız etkileri çalışmamızda RÖ grubunda *TSLP* miktarlarında artış görülürken *IL25* ve *IL33*' miktarlarındaki tam tersi sonucu açıklayabilir. Çalışmamızda *IL25* ve *IL33* e benzer olarak *IL5* ve *IL13* ifadenmesi de RÖ grubunda kontrole göre düşük saptanmıştır, bu bulgu da olası *TSLP* ilişkili fakat *IL25* ve *IL33*' den bağımsız bir moleküler yolağın varlığı hipotezini

desteklemektedir. Benzer bir immunopatogenez Kim ve arkadaşlarının çalışmasında atopik dermatit (AD) için raporlanmıştır. ILC2 hücrelerinin yokluğunda AD gözlenmezken, *IL25* ve *IL33* olmasa da hastalık oluşumu izlenmiştir. Bu verilere bakılacak *IL25* ve *IL33*’ ten bağımsız da inflamasyonun meydana gelebileceği gösterilmiştir. *TSLP* için ise tersi sonuçlara ulaşılmış, *TSLP*’ nin hastalığın meydana gelmesinde olmazsa olmaz olduğu not düşülmüştür. (64).

Çalışma hipotezimizde epitelyal sitokinler öncüllüğünde RÖ immunopatogenezinde Th2 yönünde kutuplaşma izleneceğini öngörmüştük fakat böyle bir sonuca ulaşamadık. *TSLP*’ nin myeloid dendritik hücre yüzeyinde *OX40L* ifadenmesini arttırdığı ve bu yolla Th2 hücreleri kaynaklı *IL4* üretimini tetiklerken *IL10* üretimini inhibe ettiği bilinmektedir (65). *OX40L* bloklanmasıyla inflamasyonun geri döndüğü de bildirilmiştir (66). *CCL17* ve *CCL22* dendritik hücre kaynaklı kemoatraktan moleküllerdir ve Th2 hücreleri inflamasyon alanına çekerler (67). *TSLP* aktivasyonu ile dendritik hücrelerden salınımlarının arttığı gösterilmiştir (1). Çalışmamızda *CCL17* ifadenmeleri çalışma grubunda daha düşük, *CCL22*’ ninki ise grup arasında benzer saptanmıştır, bu veriler RÖ’ de *TSLP* yollu dendritik hücre aktivasyonu ve Th2 tipi inflamasyonun görüldüğü hipotezimize ters düşmektedir. RÖ’ de artmış bulmayı beklediğimiz bir diğer sitokin, *IL4*’ ün de *TSLP* etkisiyle ifadenmesinde artış görüldüğüne dair çokça veri mevcuttur. Larinks özelinde aritenoid fibroblastları tarafından TLR ligandı (çift sarmallı DNA) ile indüklenen *TSLP* üretiminin *IL4* ve sentetik çift sarmallı DNA analogu varlığında sinerjistik etki ile katlanarak arttığı not düşülmüştür (68). Sigara dumanının larinks üzerindeki immünolojik etkilerinin araştırıldığı başka bir hayvan çalışmasında *IL4* sigara dumanı maruziyetinde kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuş, *TGF-β* ve *IL10* ise istatistiksel anlamlı fark saptanamasa da kontrole göre sırasıyla yüksek ve düşük saptanmıştır (69). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda *IL10* seviyeleri beklenene uygun şekilde RÖ grubunda kontrole göre azalmışken *IL4* de beklenenin tersi bir sonuç bulunmuş, *IL4* seviyeleri RÖ grubunda kontrolden düşük kalmıştır. Farkın istatistiksel anlamlılığı iki sitokin için de gösterilememiştir. Th1 tipi inflamasyonun bir belirteci olan *IFN-γ*’ nın da RÖ grubunda kontrole göre düşük olması beklenirken 2 kata yakın yüksek çıkmış, bu farkın istatistiksel anlamlılığı gösterilememiştir. *CCL17*, *CCL22* ve *IL4* yanında Th2 yönünde kutuplaşmış inflamasyonun diğer belirleyici sitokinlerine bakıldığında *IL5* ve *IL13*’ te de *IL4*’ te olduğu gibi, ifadenme seviyeleri istatistiksel anlamlı fark gösterilemese de kontrol grubunda daha yüksek saptanmış, RÖ ile ilişkisi kurulamamıştır. Th2 tipi inflamasyonun bir başka belirleyici sitokini *IL6*’ nın olası

rolü lehine bulgulara önceki çalışmalarda rastlanmıştır. *TSLP* sinyal yolları haritasında *STAT3* üzerinden *IL6*, *IL8*, *MYC* ve *CCL11* yoluyla hücre proliferasyonu, anti apoptizis, dendridik hücre göçü ve havayolu inflamatuvar yanıtında görev aldığı özetlenmiştir (70). RÖ dokusunda da *IL-6/JAK/STAT3* yolağında aktivasyon görülmesinin yanında yanıtında ilişkili sitokin reseptörleri olan *IL6* ve *IL1* reseptörlerinde artmış ifadenme görülmüştür (21). Çalışmamızda da buna paralel bir şekilde *IL6* ifadenmelerinde RÖ grubunda kontrole göre hafif artış saptanmışsa da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır.

TGF-β miktarlarında ise her iki grup arasında belirgin fark izlenmemiştir, Grill ve arkadaşlarının çalışmasında RÖ' de aktive olduğu gösterilen epitel-mezenkimal transformasyon ile gerçekleşen remodeling sırasında *TSLP* üretimini indüklediğine dair veriler mevcuttur (71) fakat çalışmamızda RÖ ile kontrol grubu arasında çok hafif bir fark izlenmiş ve istatistiksel anlamı gösterilememiştir.

Elde ettiğimiz veriler bütünüyle değerlendirildiğinde iritanlara yanıt olarak epitelden salınan sitokinler aracılığıyla Th2 tip inflamasyona gidişattan farkı bir immunopatogeneze işaret etmektedir. Bu anlamda çalışmaların alerjik rinit, astım ve nazal polipoziste ortaya koyduğu ile tam örtüşmemektedir. Alerjik yanıt olarak kabul görmeyen ve Th2 tipi inflamasyon ile karakterize olmayan fakat patogenezinde *TSLP*' nin aktif rol aldığı gösterilen, major etiyolojik faktörü sigara içiciliği olan bir başka hastalık KOAH'tır. KOAH hastaları ile yapılan bir başka çalışma da *IL5* seviyelerinin kontrol grubuna göre farklı olmadığı bildirilmiştir. Hastalık alevlenmelerinde de hafif ve orta şiddetli KOAH' ı olan hastalarda *IL4* ve *IL5* seviyeleri kontrole göre farklı bulunmamıştır (72). KOAH ve astımdaki sırasıyla Th1 ve Th2 yönünde kutuplaşmış inflamasyonun *TSLP*' nin farklı yönde kemoatraktan aktivitesi sonucu olup olmadığı araştırıldığında ise her iki hastalıktaki sitokinlerin oldukça paralellik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır, *TSLP* ile Th1 tip inflamasyon arasında bir bağ kurulamamıştır (73).

TSLP ilk olarak tip 2 immunitenin öncül moleküllerinden olarak düşünülse de yapılan çalışmaların sayısı arttıkça otoimmün hastalıklar, kronik inflamatuvar hastalıklar gibi farklı patolojik süreçlerde de yer aldığı görülmüştür. İnsanda *TSLP*' nin iki izoformu (kısa ve uzun) olduğu tanımlanmış fakat izoformları ayrı ayrı inceleyen çalışma sayısı henüz yeterli sayıya ulaşmamıştır. *TSLP* 'nin kısa ve uzun izoformlarının farklı immunmodülatör görevler

üstleniyor olabileceği öne sürülmüştür (31). RÖ'de de *TSLP*'nin rol aldığı tip 2 inflamasyondan farklı bir süreci farklı izoformların varlığı açıklıyor olabilir.

Çalışmamızın sınırlayıcı faktörleri ise hasta sayısının azlığı, vokal kord dokusunun çok özel bir anatomik yapı olmasından kaynaklı örnek hacimlerinin çok küçük olması ve analiz kalitesini etkilemesi, kontrol grubu olarak benzer inflamatuvar yolakların rol oynuyor olması muhtemel olabilecek larinksin diğer benign lezyonlarının alınmış olması şeklinde sıralanabilir. Prospektif çalışmamız sırasında 2 yıllık aşan süre sonunda 26 hastaya ulaşılabildi. Güç analizine göre 0,05 hata payı için yeterli sayı aşıldığından ve alınan örneklerin daha fazla bekleterek genetik materyal kalitesinde bozulma göze alınamadığından analiz aşamasına geçildi. Fakat bu sayı da sonuçlarımızda farklar görülse de istatistiksel olarak anlamlılık seviyesine ulaşmamız için yetmedi. Çalıştığımız alanın yarattığı teknik zorluklara değinmek gerekirse, cerrahi sırasında hastanın ses kalitesini bozmamak ve hastaya ek morbidite eklememek amacıyla minimal invaziv bir cerrahi gerçekleştirilerek yalnızca patolojik doku eksize edildi, reinke materyali ve epitel mümkün olduğunda korunmaya çalışıldı, alınan biyopsiler milimetrik olduğundan hem genetik hem patolojik çalışma için az miktarda spesimen elde edilebildi. Bu da kaçınılmaz olarak analiz sırasında çok küçük olan materyalin yetmemesine, az hücre içermesine yol açtı, patolojide örnek yetersizliği, RT-PCR sırasında da hücre sayısının azlığı nedeniyle genetik materyalin azlığına ve döngü sayılarının sınırı aşmasına neden olduğu için bazı örnekler analizden dışlanmak zorunda kalındı. Reinke boşluğunun yapısı kaynaklı az hücre içermesi de genetik materyal miktarının az olmasına sebep olan bir diğer faktördü. Kontrol grubumuz ise hastalardan sağlıklı doku biyopsisi almanın net bir morbidite sebebi olduğu vokal kord dokusunda çalışıldığından diğer benign lezyonlar olarak seçildi. Hipotezimiz sigaranın RÖ ile net kurulmuş etiyolojik ilişkisi yanında *TSLP* için tetikleyici bir faktör olduğunun bilinmesi üzerine kurulmuştu. Bununla birlikte *TSLP* için tek tetikleyici faktör sigara olmadığından ve benign larinks lezyonlarındaki diğer iritan faktörlerin varlığı ekarte edilmediğinden *TSLP* ve ilişkili yolakların RÖ dışındaki diğer benign vokal kord lezyonlarındaki rolü de bize aradaki bir farkın görülmesini engellemiş olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Reinke ödemi' nde epitel kaynaklı sitokinlerin immunopatogenezdeki rolünü araştırdığımız prospektif, kontrollü klinik çalışmamızda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. *TSLP*' nin immünhisiyokimyasal olarak vokal kord epitelinde ve lamina proporda gösterilmesi anlamında bir ilktir.
2. RÖ dokusunda immünopatogenezi açıklayabilecek sitokinler üzerine yapılmış moleküler analiz içeren çalışma sayısı çok sınırlıdır, bu alanda literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.
3. *TSLP*, Reinke ödeminde inflamasyonu başlatan anahtar moleküllerden biri olabilir, bu anlamda daha geniş örneklemeler ile çalışılmasının anlamlı olacaktır.
4. Epitel kaynaklı sitokinler olan *IL25* ve *IL33*' ün Reinke ödeminde inflamatuvar yanıtı başlatıcı rolü belirgin gözükmemektedir.
5. İstatistiksel anlamlı fark bulunamamakla birlikte *IL6* ifadelenmeleri Reinke hastalarında yüksek gözükse de *IL4*, *IL5*, *IL13* seviyeleri kontrole göre düşük kalmıştır. Bu bulgular RÖ'nin Th2 ile karakterize inflamasyon göstermediğini desteklemektedir.

TSLP ile ilişki içerisinde olabilecek diğer sitokinlerin ve moleküler yolların araştırılması ile Reinke ödemi immunopatogenezinin aydınlatılması mümkün olabilir. Daha büyük örneklemelerle yapılacak çalışmalar elde edilecek bulguların kanıt düzeyini arttıracaktır. Anahtar moleküller tedavi hedefi oluşturacağından Reinke ödeminin medikal olarak tedavi edilmesi de bu sürece odaklanan çalışmalar yoluyla gelecekte mümkün olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 3(7):673-680, 2002. doi:10.1038/ni805
2. Patel NN, Kohanski MA, Maina IW, et al. Sentinels at the wall: epithelial-derived cytokines serve as triggers of upper airway type 2 inflammation. *Int Forum Allergy Rhinol.* 9(1):93-99, 2019. doi:10.1002/alr.22206
3. Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int.* 61(1):3-17, 2012. doi:10.2332/allergolint.11-RAI-0395
4. Nakamura Y, Miyata M, Ohba T, et al. Cigarette smoke extract induces thymic stromal lymphopoietin expression, leading to T(H)2-type immune responses and airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 122(6):1208-1214, 2008. doi:10.1016/j.jaci.
5. Noordzij JP, Ossoff RH. Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 39(1):1-10, 2006. doi:10.1016/j.otc.2005.10.004
6. Nerurkar NK. Et al. Textbook of laryngology. First Edition Jp Medical Ltd, London, 2017.
7. Tavaluc R, Tan-Geller M. Reinke's Edema. *Otolaryngol Clin North Am.* 52(4):627-635, 2019. doi:10.1016/j.otc.2019.03.006
8. Gray SD, Pignatari SS, Harding P. Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone. *J Voice.* 8(1):48-52, 1994. doi:10.1016/s0892-1997(05)80318-2
9. Zeitels SM, Casiano RR, Gardner GM, et al. Management of common voice problems: Committee report. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 126(4):333-348, 2002. doi:10.1067/mhn.2002.123546
10. Dikkers FG, Nikkels PG. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 104(9 Pt 1):698-703, 1995. doi:10.1177/000348949510400905
11. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Electron microscopic and immunohistochemical investigation of Reinke's edema. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 108(11 Pt 1):1068-1072, 1999.
12. Marcotullio D, Magliulo G, Pezone T. Reinke's edema and risk factors: clinical and histopathologic aspects. *Am J Otolaryngol.* 23(2):81-84, 2002. doi:10.1053/ajot.2002.30961
13. Grossmann T, Steffan B, Kirsch A, et al. Exploring the Pathophysiology of Reinke's Edema: The Cellular Impact of Cigarette Smoke and Vibration. *Laryngoscope.* 131(2):547-554, 2021. doi:10.1002/lary.2885
14. Lechien JR, Saussez S, Nacci A, et al. Association between laryngopharyngeal reflux and benign vocal folds lesions: A systematic review. *Laryngoscope.* 129(9):329-341, 2019. doi:10.1002/lary.27932
15. Chung JH, Tae K, Lee YS, et al. The significance of laryngopharyngeal reflux in benign vocal mucosal lesions. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 141(3):369-373, 2009. doi:10.1016/j.otohns.2009.05.033
16. Kravos A, Zupevc A, Cizmarevic B et al. The role of allergy in the etiology of Reinke's edema on vocal folds. *Wien Klin Wochenschr.* 122 Suppl 2:44-48, 2010. doi:10.1007/s00508-010-1349-6

17. Volić SV, Klapan I, Seiwerth S et al. Extracellular matrix of Reinke's space in some pathological conditions. *Acta Otolaryngol.* 124(4):505-508, 2004. doi:10.1080/00016480410017279
18. Dikkers FG, Nikkels PG. Benign lesions of the vocal folds: histopathology and phonotrauma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 104(9 Pt 1):698-703, 1995. doi:10.1177/000348949510400905
19. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, del Pino García M, Álvarez-Argüelles H, Díaz-Flores L Jr, López-Campos D. CD34-positive fibroblasts in Reinke's edema. *Laryngoscope.* 124(3):73-80, 2014. doi:10.1002/lary.24407
20. Duflo SM, Thibeault SL, Li W et al. Differential gene expression profiling of vocal fold polyps and Reinke's edema by complementary DNA microarray. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 115(9):703-714, 2006. doi:10.1177/000348940611500910
21. Grill M, Lazzeri I, Kirsch A et al. Vocal Fold Fibroblasts in Reinke's Edema Show Alterations Involved in Extracellular Matrix Production, Cytokine Response and Cell Cycle Control. *Biomedicines.* 9(7):735, 2021. Published 2021 Jun 26. doi:10.3390/biomedicines9070735
22. Berchtold CM, Coughlin A, Kasper Z et al. Paracrine potential of fibroblasts exposed to cigarette smoke extract with vascular growth factor induction. *Laryngoscope.* 123(9):2228-2236, 2013. doi:10.1002/lary.24052
23. Branski RC, Saltman B, Sulica L, et al. Cigarette smoke and reactive oxygen species metabolism: implications for the pathophysiology of Reinke's edema. *Laryngoscope.* 119(10):2014-2018, 2009. doi:10.1002/lary.20592
24. Gugatschka M, Darnhofer B, Grossmann T et al. Proteomic Analysis of Vocal Fold Fibroblasts Exposed to Cigarette Smoke Extract: Exploring the Pathophysiology of Reinke's Edema. *Mol Cell Proteomics.* 18(8):1511-1525, 2019. doi:10.1074/mcp.RA119.001272
25. Lim S, Sau P, Cooper L et al. The incidence of premalignant and malignant disease in Reinke's edema. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 150(3):434-436, 2014. doi:10.1177/0194599813520123
26. Martins RH, Fabro AT, Domingues MA et al. Is Reinke's edema a precancerous lesion? Histological and electron microscopic aspects. *J Voice.* 23(6):721-725, 2009. doi:10.1016/j.jvoice.2008.03.001
27. Tavaluc R, Herman H, Lin J et al. Does Reinke's Edema Grade Determine Premalignant Potential?. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 127(11):812-816, 2018. doi:10.1177/0003489418796529
28. Cristina Oliveira R, Gama ACC, Magalhães MDC. Fundamental Voice Frequency: Acoustic, Electroglottographic, and Accelerometer Measurement in Individuals With and Without Vocal Alteration. *J Voice.* 35(2):174-180, 2021. doi:10.1016/j.jvoice.2019.08.004
29. Tan M, Bryson PC, Pitts C et al. Clinical grading of Reinke's edema. *Laryngoscope.* 2017;127(10):2310-2313. doi:10.1002/lary.26647
30. Khodeir MS, Hassan SM, El Shoubary AM et al. Surgical and Nonsurgical Lines of Treatment of Reinke's Edema: A Systematic Literature Review. *J Voice.* 35(3):502.e1-502.e11, 2021. doi:10.1016/j.jvoice.2019.10.016
31. Varricchi G, Pecoraro A, Marone G et al. Thymic Stromal Lymphopoietin Isoforms, Inflammatory Disorders, and Cancer. *Front Immunol.* 9:1595, 2018. Published 2018 Jul 13. doi:10.3389/fimmu.2018.01595

32. Lee HS, Park DE, Lee JW et al. Critical role of interleukin-23 in development of asthma promoted by cigarette smoke [published correction appears in J Mol Med (Berl). 2019 May 22;:]. J Mol Med (Berl). 97(7):937-949, 2019. doi:10.1007/s00109-019-01768-y
33. Yamada T, Saito H, Kimura Y et al. CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. Cytokine. 57(2):245-250, 2012. doi:10.1016/j.cyto.2011.10.012
34. Guillot-Delost M, Guilleré L, Berger F, et al. Ligand-receptor dissociated expression explains high TSLP without prognostic impact in human primary head and neck squamous cell carcinoma. Oncoimmunology. 5(7):e1179414, 2016. Published 2016 Jun 7. doi:10.1080/2162402X.2016.1179414
35. Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. Validity and reliability of the reflux symptom index (RSI). J Voice. 16(2):274-277, 2002. doi: 10.1016/s0892-1997(02)00097-8. PMID: 12150380.
36. Akbulut S, Aydinli FE, Kuşçu O et al. Reliability and Validity of the Turkish Reflux Symptom Index. J Voice. 34(6):965, 2020. doi: 10.1016/j.jvoice.2019.05.015. Epub 2019 Jun 25. PMID: 31248727.
37. Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux finding score (RFS). Laryngoscope. 111(8):1313-1317, 2001. doi: 10.1097/00005537-200108000-00001.
38. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R et al. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS One.9(5):e96801, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0096801
39. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem.162(1):156-159, 1987.
40. Rajput S, Volk-Draper LD, Ran S. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. Mol Cancer Ther.12(8):1676-1687, 2013. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1019.
41. Spandidos A, Wang X, Wan H et al. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. Nucl. Acids Res. 38:D792-9, 2010.
42. Spandidos A, Wang X, Wan H et al.: A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. BMC Genomics . 9:633, 2008.
43. Xiaowei Wang and Brian Seed: A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. Nucleic Acids Research 2003 31(24): e154; pp.1-8.
44. Zheng X1, Nakamura K, Furukawa et al. Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis. J Dermatol. 30(1):26-32, 2003.
45. Wang T, Liang ZA, Sandford AJ et al. Selection of Suitable Housekeeping Genes for Real-Time Quantitative PCR in CD4+ Lymphocytes from Asthmatics with or without Depression. PLOS One 7(10) e48367, 2012.
46. Salib RJ. Transforming growth factor-beta gene expression studies in nasal mucosal biopsies in naturally occurring allergic rhinitis. Ann R Coll Surg Engl. 89(6):563-573, 2007. doi: 10.1308/003588407X202164.

47. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25(4): 402-408, 2001.
48. Al-Shami A, R. Spolski J. Kelly A. et al. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J. Exp. Med.* 202: 829–839, 2005.
49. Ying S, B. O'Connor J. Ratoff Q. et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol.* 181: 2790–2798, 2008.
50. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol.* 174(12):8183-8190, 2005. doi:10.4049/jimmunol.174.12.8183
51. Boita M, Garzaro M, Raimondo L, et al. The expression of TSLP receptor in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 24(3):761-768, 2011. doi:10.1177/039463201102400322
52. Mou Z, Xia J, Tan Y, et al. Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol.* 129(3):297-301, 2009. doi:10.1080/00016480802225884
53. Volić SV, Klapan I, Seiwerth S, et al. Extracellular matrix of Reinke's space in some pathological conditions. *Acta Otolaryngol.* 124(4):505-508, 2004. doi:10.1080/00016480410017279
54. Yamada T, Saito H, Kimura Y, et al. CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine.* 57(2):245-250, 2012. doi:10.1016/j.cyto.2011.10.012
55. Lee HC, Ziegler SF. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(3):914-919, 2007. doi:10.1073/pnas.0607305104
56. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol.* 167(1):336-343, 2001. doi:10.4049/jimmunol.167.1.336
57. Ye L, Mou Y, Wang J et al. Effects of microRNA-19b on airway remodeling, airway inflammation and degree of oxidative stress by targeting TSLP through the Stat3 signaling pathway in a mouse model of asthma. *Oncotarget.* 8(29):47533-47546, 2017. doi:10.18632/oncotarget.17258
58. Huang R, Mao W, Wang G et al. Synergistic relationship between TSLP and IL-33/ST2 signaling pathways in allergic rhinitis and the effects of hypoxia. *Int Forum Allergy Rhinol.* 10(4):511-520, 2020. doi:10.1002/alr.22504
59. Corren J, Ziegler SF. TSLP: from allergy to cancer. *Nat Immunol.* 20(12):1603-1609, 2019. doi:10.1038/s41590-019-0524-9
60. Kim DW, Cho SH. Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis and Its Application to Precision Medicine. *Allergy Asthma Immunol Res.* 9(4):299-306, 2017. doi:10.4168/aaair.2017.9.4.299
61. Shin HW, Kim DK, Park MH et al. IL-25 as a novel therapeutic target in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 135(6):1476-1485, 2015. doi:10.1016/j.jaci.2015.01.003

62. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol.* 12(11):1055-1062, 2011. Published 2011 Sep 11. doi:10.1038/ni.2104
63. Mjösberg J, Bernink J, Golebski K et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.* 37(4):649-659, 2012. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.015
64. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med.* 5(170):170ra16, 2013. doi:10.1126/scitranslmed.3005374
65. Ito T, Wang YH, Duramad O et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med.* 202(9):1213-1223, 2005. doi:10.1084/jem.20051135
66. Seshasayee D, Lee WP, Zhou M et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest.* 117(12):3868-3878, 2007. doi:10.1172/JCI33559
67. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy.* 66(5):579-587, 2011. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02528.x
68. Yamada T, Saito H, Kimura Y et al. CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine.* 57(2):245-250, 2012. doi:10.1016/j.cyto.2011.10.012
69. Ha TN, Madison MC, Kheradmand F et al. Laryngeal inflammatory response to smoke and vape in a murine model. *Am J Otolaryngol.* 40(1):89-92, 2019. doi:10.1016/j.amjoto.2018.10.001
70. Zhong J, Sharma J, Raju R et al. TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling. *Database (Oxford).* 2014;2014:bau007. Feb 25. doi:10.1093/database/bau007
71. Matsuno K, Harada N, Harada S et al. Combination of TWEAK and TGF- β 1 induces the production of TSLP, RANTES, and TARC in BEAS-2B human bronchial epithelial cells during epithelial-mesenchymal transition. *Exp Lung Res.* 44(7):332-343, 2018. doi:10.1080/01902148.2018.1522558
72. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 9:397-412, 2014. Published 2014 Apr 28. doi:10.2147/COPD.S42544
73. Ying S, O'Connor B, Ratoff J et al. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 181(4):2790-2798, 2008. doi:10.4049/jimmunol.181.4.2790
- 74.
75. Kothe C, Schade G, Fleischer S, Hess M. Forced inspiration: a laryngoscopy-based maneuver to assess the size of Reinke's edema. *Laryngoscope.* 2003;113(4):741-742. doi:10.1097/00005537-200304000-00028
76. G. Zhang, J. Zhao, T. H. Lee, and C. Corrigan. 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates

with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J.Immunol.* 174:8183–8190.

77. Shin HW, Kim DK, Park MH, et al. IL-25 as a novel therapeutic target in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(6):1476-85.e7. doi:10.1016/j.jaci.2015.01.003
78. Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, et al. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(12):1875-1881. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03114.x