



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
FATİH SULTAN MEHMET
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

**SİGARA DUMANINA MARUZİYETİN VOKAL KORDLARDAKİ
LUBRİCİN/PROTEOGLİKAN -4 SEVİYESİNE OLAN ETKİLERİNİN
HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŐTIRILMASI**

Dr. Cem Kavvasoğlu

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL / 2021



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
FATİH SULTAN MEHMET
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ**

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

**SİGARA DUMANINA MARUZİYETİN VOKAL KORDLARDAKİ
LUBRİCİN/PROTEOGLİKAN -4 SEVİYESİNE OLAN ETKİLERİNİN
HAYVAN MODELİ ÜZERİNDE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAşTIRILMASI**

Dr. Cem Kavvasoğlu

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mehmet zgr Habeşoğlu

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL / 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez yazım süresince emeklerini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Özgür Habeşoğlu'ya, tez çalışmalarındaki desteklerinden ötürü kliniğimizin eğitim sorumlusu Doç. Dr. Tülay Erden Habeşoğlu'ya ve patoloğumuz Uzm. Dr. Adnan Somay'a, asistanlığım boyunca çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, mesai arkadaşlarıma, uzmanlık eğitimimde ölçülemez katkıları olan kliniğimizin birbirinden değerli uzmanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her anımda desteklerini kesintisiz olarak hissettiğim sevgili babam Ramazan, annem Suzan, kardeşlerim Yusuf ve İtir'a, motivasyon kaynaklarım Beste ve Ramazan Cem'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TÜRKÇE ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. SİGARA	3
2.1.1. Sigaranın İçeriğini Oluşturan Öğeler	3
2.1.2. Toplumda Sigara	4
2.1.3. Çevresel Sigara Dumanı.....	4
2.2. LARENKS.....	5
2.2.1. Larenks Embriyolojisi.....	6
2.2.2. Larenks Histolojisi	6
2.2.3. Larenkste İzlenen Reaktif ve Prekanseroz Epitelial Tanımlamalar	8
2.2.4. Larenks Anatomisi	8
2.2.5. Sıçan Larenks Anatomisi	14
2.2.6. Sıçan Larenks Histolojisi	14
2.3. LUBRİCİN (PROTEOGLİKAN-4)	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16

3.1.	MORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME	19
3.1.1.	Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme Kriterleri.....	20
3.2.	İSTATİSTİK	22
4.	BULGULAR.....	23
5.	TARTIŞMA	35
6.	SONUÇ	41
7.	KAYNAKLAR	42
8.	ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

PRG 4: Proteoglikan 4

ÇSD: Çevresel sigara Dumanı

MSF: Megakaryocyte stimulating factor (megakaryosit uyarıcı faktör)

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Sigara Dumanında Bulunan Bazı Gaz ve Partiküler Faz Komponentleri.....	3
Tablo 4.1: Araştırma Gruplarının Enflamatuvar ve İmmünohistokimyasal Değişikliklerin Dağılımları	33
Tablo 4.2: Deney Grubunun Boyanma Yoğunluğu ve Histopatolojik Enflamatuvar Değişikliklerin Dağılımları	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Larenks Anatomisi- John Wiley & Sons(2000).....	6
Şekil 2.2: Larenksin mikroskopik anatomisinin görüntüsü- Mills(1997).....	7
Şekil 2.3: Larenks bölgeleri ve boşlukları- Hızalan (2003)	12
Şekil 3.1: Sigara Dumanı İnhalasyon Kabini	17
Şekil 3.2: Deneş Hayvanlarının Yer Aldığı Sigara Dumanı İnhalasyon Kabini	18
Şekil 3.3: Deneklerin Sakrifiye Edilmesi Aşaması ve Larenks Materyali.....	18
Şekil 4.1: Kontrol grubu; küçük büyütmede subepitelyal alanda hafif derecede kronik iltihabi infiltrasyon (ok) H&Ex40.....	24
Şekil 4.2: Sigara grubu, mukozada ağır mononükleer iltihabi infiltrasyon. H&Ex100.....	24
Şekil 4.3: Sigara grubu, mukozada ağır nötrofil infiltrasyonu.(ok) H&Ex100.....	25
Şekil 4.4: Kontrol grubu; Yüzey epitelinde skuamöz metaplazi alanı (ok) H&Ex200.....	26
Şekil 4.5: Sigara grubu; küçük büyütmede yüzey epitelinde yaygın skuamöz metaplazi (ok) H&Ex40.....	26
Şekil 4.6: Kontrol grubu; Mukozal yüzey epitelinde hiperplazi ve skuamöz metaplazi alanı (OK) H&Ex100	27
Şekil 4.7: Sigara grubu, yüzey epitelinde hiperplazi. (ok) H&Ex100	28
Şekil 4.8: Kontrol grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile kondroid adacıkda (c) periferel kondrositlerde ve işsi hücrelerde gözlenen kuvvetli boyama . Immunostaining x 200.....	29
Şekil 4.9: Kontrol grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile subepitelyal fibroblastlarda (SE) çizgili kas dokusunda M) gözlenen orta düzeyde boyama . Immunostaining x 200	29
Şekil 4.10: Kontrol grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile kondroid adacık (c) periferinde, subepitelyal bağ dokusunda (SE) ve damar endotellerinde (ok) gözlenen kuvvetli boyama. Immunostaining x 100.....	30
Şekil 4.11: Sigara grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile kondroid dokuda (c) kondrositlerde orta yoğunlukta boyanma (ince ok) perikondrial işsi hücrelerde (kalın ok) hafif boyanma. Immunostainingx100	31
Şekil 4.12: Sigara grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile mukozal fibroblastlar ve ligamentte (ok) hafif boyanma. Immunostainingx100.....	31

TÜRKÇE ÖZET

AMAÇ: Lubricin/Proteoglikan- 4, bağ dokuların kayganlığını arttırarak hareket sırasında yırtılma ve sürtünme kuvvetlerine daha iyi dayanmalarını sağlar. Aynı şekilde vokal kordlarda da kayganlaştırıcı olarak etki ettiği, fonlama ile ilişkili hasarı sınırlandırdığı ve vokal kord içindeki viskoziteyi azaltarak vokal verimi arttırdığı düşünülmektedir. Sigara dumanına maruz kalmanın vokal kordlar üzerinde yıkıcı etkilerinin var olduğu açıkça kanıtlanmıştır. Literatürde benzeri olmayan bu çalışmada, sigara dumanına maruziyetin vokal kordlardaki lubricin/proteoglikan-4 seviyesine etkisi, kontrol grubu ile immunohistokimyasal olarak birbiriyle karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışma 01.04.2021 ile 01.05.2021 tarihleri arasında Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi laboratuvarında gerçekleştirildi. 16 adet tamamı dişi Wistar albino sıçan üzerinde yapıldı. Sıçanlar, kontrol ve sigara dumanına maruz bırakılan grup (deney grubu) olarak iki gruba ayrıldı. Her grupta 8 sıçan bulunuyordu. Kontrol grubuna herhangi bir medikasyon ve maruziyet uygulanmadı. Deney grubu 30 gün boyunca öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere iki farklı saat diliminde, birer saat boyunca kesintisiz sigara dumanına maruz bırakıldı. Daha sonra diseke edilen larenks dokularındaki histopatolojik değişiklikler hematoksilen eosin ile boyanarak değerlendirildi. Örneklerdeki lubricin yoğunluğu ve yaygınlığı ise anti-Lubricin/proteoglycan 4, clone 9G3 monoklonal antikor kullanılarak immunohistokimyasal boyama ile değerlendirildi.

BULGULAR: Elde edilen bulgular çerçevesinde deney grubundaki mukozal mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ($p<0,05$), kord epitelinde skumöz metaplazi ($p<0,05$) ve lubricin boyanma yoğunluğu ($p<0,05$) kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Deney

grubu içerisinde skuamöz metaplazi gözlenen denekler karşılaştırıldığında rastlantısal olarak lubricin boyama yaygınlığının azalmış olduğu izlendi.

SONUÇ: Çevresel sigara dumanının deney hayvanlarının vokal kordunda histopatolojik patolojik değişikliklere yol açtığını gözlemlendi. İmmunohistokimyasal incelemede ise sigarayla maruziyetin vokal kordlarda ve diğer larengeal dokularda lubricin/proteoglikan-4 yaygınlığını azalttığı izlendi.

Anahtar kelimeler: lubricin, proteoglikan-4, sigara dumanı, vokal kord, sıçan

ABSTRACT

AIM: Lubricin/Proteoglycan-4 increases the lubricity of connective tissues, enabling them to better withstand shear and friction forces during movement. Likewise, it is thought to act as a lubricant on the vocal folds, limit the damage associated with phonation, and increase vocal efficiency by reducing the viscosity in the vocal fold. It has been clearly demonstrated that exposure to cigarette smoke has devastating effects on the vocal cords. In this study, which is unique in the literature, the effect of exposure to cigarette smoke on the level of lubricin/proteoglycan-4 in the vocal cords was compared with the control group immunohistochemically.

MATERIALS AND METHODS: The study was carried out between 01.04.2021 and 01.05.2021 in Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University Experimental Animals Research Center laboratory. It was performed on 16 all-female Wistar albino rats. The rats were divided into two groups as the control group and the group exposed to cigarette smoke (experimental group). There were 8 rats in each group. No medication or exposure was applied to the control group. The experimental group was exposed to uninterrupted cigarette smoke for one hour in two different time zones, in the morning and in the afternoon, for 30 days. Then, the histopathological changes in the dissected larynx tissues were evaluated by staining with hematoxylin-eosin. Lubricin density and prevalence in the samples were evaluated by immunohistochemical staining using anti-Lubricin/proteoglycan 4, clone 9G3 monoclonal antibody.

RESULTS: Within the framework of the findings obtained, mucosal mononuclear inflammatory cell infiltration ($p<0.05$), scumous metaplasia in the cord epithelium ($p<0.05$) and lubricin staining intensity ($p<0.05$) in the experimental group were compared with the control group. It was determined that there was a statistically significant difference between the two groups. When the subjects with squamous

metaplasia in the experimental group were compared, it was observed that the prevalence of lubricin staining was decreased randomly.

CONCLUSION: It was observed that environmental cigarette smoke caused histopathological pathological changes in the vocal cords of experimental animals. In the immunohistochemical examination, it was observed that exposure to smoking decreased the prevalence of lubricin/proteoglycan-4 in vocal cords and other laryngeal tissues.

Keywords: lubricin, proteoglycan-4, cigarette smoke, vocal cord, rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sigara kullanımına bağılı olarak beş milyona yakın insan her sene hayatını kaybetmektedir. Önümüzdeki on yıl içerisinde bu sayının 8 milyonu bulması tahmin edilmektedir (1). Sigara dumanı, tütünün yanması ortaya çıkan içerisinde karsinojenik, toksik ve mutajenik alan kimyasal yapılar içerir (2). Ayrıca irritant yapılar ve kardiyovasküler toksik ögeler de mevcuttur (3).

Sigara dumanını iki farklı şekilde tanımlayabiliriz. Sigara içenin maruz kaldığı ana akım dumanı ve sigaranın yanmasıyla oluşan yan akım dumanı. Yan akım dumanında yanma ısısı düşüklüğü kaynaklı ana akım dumanına göre kimyasal madde miktarı fazladır (4). Örneğin hayvanlar için karsinojen olduğu gösterilmiş olan N-nitrosodimethylamine yan akım dumanında ana akım dumanına göre 20-100 kat daha fazla bulunmaktadır (5).

Her kapalı ortamda sigaraya maruziyet oluşabilir. Ortamda sigaraya maruz kalma durumu sigara içen kişi sayısı, tüketilen sigara sayısı, odanın büyüklüğü ve havalandırması ile sigaraya maruz kalınan süreyle ilişkilidir (6). Çevresel sigara dumanına maruziyet ile insanların solunum sistemi olmak üzere birçok sistemi etkilenir (6,7).

Larenks kanserlerinin % 95'i sigara kullanımı ile birlikte ve alkol kullanımıyla bu oran artmaktadır. Çevresel sigara dumanı, sigara içenler kadar olmasa da daha az oranda larenks kanserinin beklenen sebebi olabilir (8). Larinks, sigara dumanına maruz kaldıktan sonra histopatolojik değişikliklere en duyarlı organlardan biri olarak kabul edilir. Psödostratifiye epitelde doza bağılı yaygın skuamöz metaplazi ve epiglotun tabanında skuamöz hiperplazi oluşması çalışmalarda gösterilmiştir (9).

Sinoviyositler ve yüzeysel bölge kondrositleri tarafından üretilen lubricin, proteoglikan 4 (PRG4) geninin bir ürünüdür (10). Bir proteoglikan olarak bilinen lubricin, eklem kıkırdağı için kritik bir eklem kayganlaştırıcı olarak işlev gören ve normalde sinovyal sıvıdan izole edilen bir glikoproteindir (11). Literatürde yapılan

çalışmalarda lubricin maddesinin immünohistokimyasal olarak tendon, menisküs, bağ, kas, deri ve intervertebral diskte varlığını göstermiştir (12). Bu molekül kıkırdak aşınmasını ve sinovyal hücre yapışmasını ve proliferasyonunu önlemede önemli bir koruyucu role sahip olduğu kabul edilmektedir (10).

Araştırmamızın temelini aldığı çalışmada, vokal kordlarda lubricin/proteoglikan -4 maddesi yeni tanımlanmıştır. Bu maddenin kayganlaştırıcı olarak etki ettiği, fonlama ile ilişkili hasarı sınırlandırdığı ve vokal kord içindeki iç sürtünmeyi (viskoziteyi) azaltarak vokal verimi arttıracadığı düşünölmektedir (13).

Sigara dumanına maruz kalmanın vokal kordlar epitelinde önemli morfolojik ve patolojik değişiklere neden olduğu önceki çalışmalarda ortaya çıkmıştır (14,15).

Bu histopatolojik değişikliklere neden olabilmesinin yanında vokal kordlarda yer alan kayganlaştırıcı etkisi olduğu düşünölen lubricin/proteoglikan -4 seviyesini de azaltabilir.

Vokal kord üzerinde sigara dumanı maruziyetinin lubricin/proteoglikan -4 düzeylerini etkilemesi şeklinde sonuç alınması durumunda, ileri aşamalardaki çalışmalarda bu biyokimyasal yapının düzeyini arttırmanın ya da azaltmanın vokal kordun benign, premalign lezyonlarını ve maligniteyi azaltıcı yönde uygulamaların olabileceği öngörmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SİGARA

İnsanlığın önemli sağlık problemi ve ölüm sebeplerinden birisi sigaradır. Yaklaşık 1 milyar erkek ve 250 milyon kadının sigara kullandığı düşünülmektedir. 2025 yılında 10 milyonu geçeceği tahmin edilmektedir. Sigara, dünyada her yıl 4 milyon kişinin, günde 11 bin veya diğer bir ifade ile her saniyede bir kişinin ölümünden sorumludur (16).

2.1.1. Sigaranın İçeriğini Oluşturan Öğeler

Sigara “*Nicotina Tabacum*” denilen bitkinin yapraklarınının kurutulup belirli bir yol izlenmesiyle oluşturulur. Sigara ve dumanında 4000’den fazla kimyasal madde bulunmaktadır. Bunlardan 43’ünün karsinojen olduğu bilinmektedir. Sigara dumanı gaz ve partiküler faz olarak iki fazda incelenir. Bu fazların içerdiği kimyasal maddelerden bazıları Tablo 2.1’ de gösterilmiştir (17).

Tablo 2.1: Sigara Dumanında Bulunan Bazı Gaz ve Partiküler Faz Komponentleri

Gaz Fazı	Partiküler Faz
Karbon Monoxide	Nicotine
Karbon Dioxide	Phenol
Formaldehyde	Catechol
Acrolein	Aniline
Acetone	Nickel
Pyridine	2-toluidine
3-vinylpyridine	2-naphthylamine
Hydrogen cyanide Benz(a)anthracene	2-naphthylamine
Nitrogen oxides	Benzo(a)pyrene
Ammonia	Quoline
N-nitrosodimethylamine	N-nitrosornicotine
N-nitrosopyrolidine	N-nitrosodiethanolamine

Serbest radikaller gaz faz içerisinde de çok gözlenmektedir. Gaz fazdaki radikaller kısa ömürlüdür (18). Nikotin, tütünün yapraklarında bulunan sıvı, renksiz, uçucu, suda çözünebilir, kuvvetli alkali ($pK_a=11$) özelliği olan ve santral sinir sistemine hızla geçebilen lipofilik bir alkaloiddir (19). Vücuda alınan nikotinin çok azı değişmeden idrarla atılırken kalan büyük miktarı karaciğerde metabolize edilir. Nikotin, nikotinik reseptörlere etki eder. Bu reseptörlerin nörotransmitteri asetilkolindir. Nikotinik reseptörlerin çok sayıda ve fazla olması nedeniyle etkileri yoğundur (20).

2.1.2. Toplumda Sigara

Tütün ve sigara tüketimi Dünya Sağlık Örgütü tarafından salgın hastalık olarak tanımlanmaktadır (1). Her sene yaklaşık 600 milyon sigara üretilmekte ve dünya üzerinde 1.2 milyar insanın sigara tükettiği bildirilmektedir. Dünya üzerinde sigara tüketenlerin sayısının, 2030 senesinde 2 milyara erişeceği düşünülmektedir (21).

Gelişmekte olan devletlerde sigaraya başlama yaşı 12-16'dır (22). Gelişmiş devletlerde 13-15 yaşları arasındaki kişilerde sigara tüketme oranının % 10-33 arasında olduğu belirtilmiştir (23). Erişkin sigara tüketicilerinin % 80'inden fazlası 18 yaşından evvel başlamaktadır (24).

Ülkemizdeki yapılan araştırmalarda ortalama sigara kullanımı başlangıcı 11-18 yaş arasında belirlenmiştir (25). 2006 senesinde yapılan 'Türkiye Aile Yapısı Araştırması' sonuçlarında ise yetişkinler genelinde %33,4; erkeklerde %50,6 ve kadınlarda %16,6 oranında sigara kullanımının olduğu belirlenmiştir (26).

2.1.3. Çevresel Sigara Dumanı

Çevresel sigara dumanı (ÇSD), başkalarının içtiği tütün ve tütün mamullerinden ötürü kişinin isteği dışında dumana maruz kalması durumudur (20,27). Sigara iki farklı duman oluşturur, birincisi sigara içenin çıkardığı sigara dumanı ki buna ana akım

dumanı (main stream smoke-ana akım dumanı), ikincisi ise sigaranın yanmasıyla oluşur buna ise yan akım dumanı (side-stream smoke-yan akım dumanı) denir (3). Sigara içeriğindeki 4000'den fazla zararlı madde, yaklaşık 400 bileşeni oluşturmakta ve bunlar ana akım dumanı ve yan akım dumanında bulunmaktadır (20).

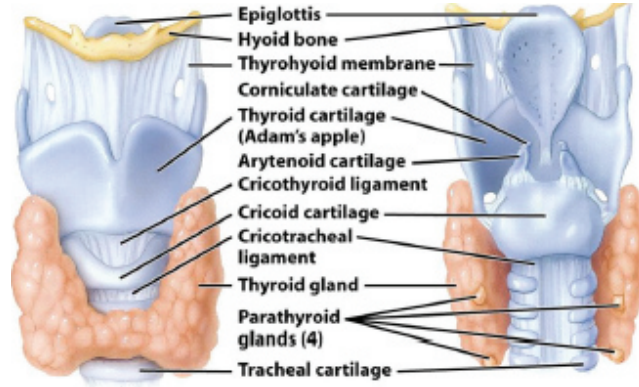
Çoğu içerik hem ana akım dumanında hem de yan akım dumanında olmasına rağmen, bazı bileşenlerin salınım oranı yan akım dumanında ana akım dumanına göre daha yoğundur. Yan akım dumanı ortaya çıkarken yanma ısısı daha düşük olduğu için ana akım dumanına göre çok daha fazla kimyasal maddeye sahiptir. Ana akım dumanında nikotin partikül fazındayken, çevresel sigara dumanında sıvı faza geçmiştir (28).

ÇSD'de bazı akut sağlık sorunları tetikleyen, toksin ve irritantlar bulunmaktadır (20). Çevresel sigara dumanına maruziyet ile; akciğer, sinonazal, mesane ve mem gibi organlarda kanser oranı artmaktadır. Bununla birlikte solunum yolu hastalıkları ve kardiyovasküler hastalık oranı yükselmiştir (28).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığının yürüttüğü "Ulusal Tütün Kontrol Programı ve Eylem Planı" 'ndaki düzenlemeye göre ÇSD ile ilgili sorumluluklar belirlenmiştir (27).

2.2. LARENKS

Larenks üst solunum yolunun bir bölümüdür. Boynun ön orta kısmında hiyoid kemiğin altında bulunur (Şekil 2.1). Kıkırdak iskeletini epiglot, tiroit, krikoid, aritenoid, kornikulat ve kuneiform kıkırdaklar yapar. Çevresindeki yapılara ligaman, membran ve kaslarla tutunmuştur. Erişkinde 3. ve 6. servikal vertebralar arasında bulunur. Yeni doğan çocuklarda ise 1. ve 4. servikal vertebralar arasındadır (29).



Şekil 2.1: Larenks Anatomisi- John Wiley & Sons(2000)

2.2.1. Larenks Embriyolojisi

Larenks epiteli larengotrakeal tübün kranyal ucunun endoderminden oluşur. Larenksin kıkırdakları dördüncü ve altıncı brankial arklardan gelişir. Larengeal kıkırdaklar nöral krista hücrelerinden köken alan mezenkimden gelişirler. Larengeal kaslar farengeal arkların dördüncü ve altıncı çiftlerindeki myoblastlardan gelişir. Embriyolojik olarak supraglottik bölge, üçüncü ve dördüncü brankiyal arklardan gelişir. Glottik ve subglottik bölgeler ise altıncı brankiyal arktan gelişir (30).

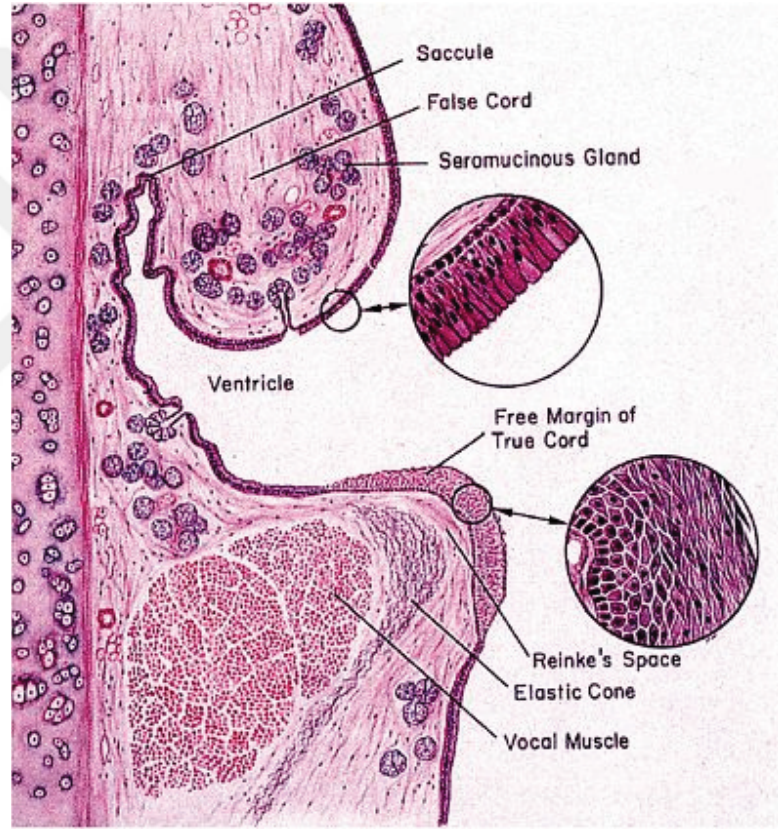
2.2.2. Larenks Histolojisi

Epiglottisin lingual yüzeyi ve larengeal yüzeyin üst kısmı nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Yassı epitel, epiglottisin inferior larengeal kısmında solunum tipi epitel ile birleşir. Solunum tipi epitel yalancı vokal kordları, ventrikülü ve subglottisi de örtmektedir. Gerçek vokal kordlar nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile döşelidir (31,32). Sigara tüketen kişilerde larenksteki silyalı solunum tipi epitel genelde yassı epitel ile yer değiştirebilmektedir (31,33,34).

Larenksin solunum epiteli yalancı çok katlı silyalı kolumnar tiptedir. Silyalı epitel yalancı vokal kordlar, ventrikül ve subglottiste bulunmaktadır. Larenkste

parakeratozis beklenmez ancak sigara gibi maddelere maruziyet parakeratozis odaklarına oluşturabilir (34).

Çok katlı yassı epitel yüzeyi altında ince bir lamina propria bulunur. Burada glandlar, lenfoid doku ve vasküler yapıdan yetersiz yoğun bir bağ dokusu izlenir. Lamina propria altında vokal ligamenti oluşturan elastik lifler ve bu liflere paralel olarak vokal kordların gerilimini düzenleyen vokal kaslar izlenir (Şekil 2.2) (32).



Şekil 2.2: Larenksin mikroskopik anatomisinin görüntüsü- Mills(1997).

Reinke bölgesi yassı epitel tabanı ile vokal ligament arasında kalır. Bu bölge kapiller ve lenfatiklerden yoksundur. Larenkste yaygın olarak serömüsinöz glandular vardır ve bunlar duktuslar aracılığıyla epitel ile bağlantılıdır (31,34).

2.2.3. Larenkste İzlenen Reaktif ve Prekanseroz Epiteliyal Tanımlamalar

Metaplazi: Olgun bir hücrenin yerini diğeri bir olgun hücre tipinin geri dönüşümlü olarak almasıdır.

Hiperplazi: Hücre sayısındaki artış ve mukozal epitelin kalınlaşmasıdır.

Skvamöz hiperplazi: Maligniteye ilgili sitolojik değişiklik göstermeyen, skuamöz epitelin aşırı olarak reaktif ve reparatif büyümesidir.

Keratozis: Mukoza epitelinde keratohyalin granüllerinin gözlenmesidir.

Parakeratozis: Mukoza epitelindeki keratin tabakasının içinde nucleus olması durumudur.

Diskeratozis: Epitel hücrelerin anormal keratinizasyonudur. Displastik lezyonlarda ve karsinomlarda görülür.

Koilositozis: Skvamöz hücrelerdeki sitoplazmik vakuolizasyonu belirtir.

Displazi: Hücre morfolojisinde malignite tarafına değişimi gösteren durumdur ve anormal hücre gelişimini yansıtır (32).

2.2.4. Larenks Anatomisi

Larenks Kıkırdakları

Larengeal yapı tiroid, krikoid ve epiglot kıkırdaklardan meydana gelir. Bir çift aritenoid kıkırdığın dışında, küneiform (Wrisberg), kornikulat (Santorini) ve sesamoid kıkırdak çiftleri yapıda bulunur (30).

Tiroid Kıkırdak

Hyalin yapıdadır, larenksin en büyük kıkırdağıdır. İki adet laminadan oluşur. Laminaların dış tarafında, tirohiyoid, sternotiroid ve inferior konstriktör kasların yapıştığı Linea obliqua adı verilen hat bulunur (35).

Tiroid kıkırdağın iç ve dış yüzü, perikondrium ile döşelidir. Tiroid kıkırdağın üst kenarına tirohiyoid membran, alt kenarına krikotiroid membran ve ligament yapışır. Bu ligament kan damarları, lenfatik damarlar içerir ve larengeal kanserlerin yayılmasında önemli bir bariyerdir (36).

Krikoid Kıkırdak

Halka şeklinde, hyalin yapıda bir kıkırdaştır. Hava yolunu tamamen çevreler ve larenks için önemli koruyucu ögesidir. Üst yüzeyinde aritenoid kıkırdakla eklem yapar. Krikoaritenoid eklem sinoviyal eklemdir. Dışa ve içe rotasyon hareketleri yapar (35).

Epiglot

Yaprak şeklinde, fibroelastik kıkırdaştır. Yan kenarları ariepiglottik kıvrım ile aritenoid kıkırdaga ve ön yüzü hiyoepiglottik ligament ile hiyoid kemiğe tutunur. Epiglotun üst kenarını döşeyen mukoza ile dil kökü mukozası arasında lateral ve median glossoepiglottik plikalar izlenir. Fonksiyonu yutulan şeylerin larenkse kaçmasını engellemektir (37).

Kornikulat kıkırdaklar (Santorini kıkırdağı)

İki adettir. Aritenoid kıkırdağın apeksi ile eklem yaparlar (36).

Kuneiform kıkırdaklar (Wrisberg kıkırdağı)

Ariepiglottik kıvrım içinde bulunur ve pasif destek sağlarlar (36).

Larenksin Kasları

- **Ekstresek Kaslar**

Larenksin hareketini ve fiksasyonunu sağlarlar. Ekstresek kaslar fonksiyonel olarak iki grupta değerlendirirler.

Elevatörler: M. Geniohyoideus, M. Digastricus, M. Mylohyoideus, M. Stylohyoideus. 5, 7 ve 9. sinirler tarafından innerve edilirler.

Depresörler: M. Sternohyoideus, M. Thyrohyoideus, M. Omohyoideus, M. Sternothyroideus. Ansa hipoglossi tarafından innerve edilirler (36).

- **İntrensek Kaslar**

İnteraritenoid kas dışında ikişer tanedirler (35).

Krikotiroid kas: Larengeal kıkırdakların dış yüzeyinde yer alır. Oblik parçası aritenoidi geriye çeker ve vokal kordu uzatır. Diğer parçası krikoid kıkırdağı süperior ve laterale yönlendirir (35).

Posterior krikoaritenoid kas: Krikoid kıkırdağın arkasından aritenoid kıkırdağın musküler kısmına uzanır. Bu kas aritenoid kıkırdakları laterale döndürülerek, vokal kordların abdüksiyonunu sağlar (36).

Lateral krikoaritenoid kas: Posterior krikoaritenoidin ana antagonistidir. Kasılması ile musküler kısım ön ve laterale çekilir. Böylece kordu addükte eder (35).

İnteraritenoid kas: Bir adet bulunur. Vokal kordlara addüksiyon yaptırır. Bu kas rekürren larengeal sinirle bilateral olarak innerve edilir. Aynı zamanda, superior larengeal sinirden de motor dallar alır (35).

Tiroaritenoid kas: M. vocalis (thyroarytenoideus internus) ve M. thyroaritenoideus externus olarak ayrılır. Tiroaritenoid kas, aritenoidi öne çekip içeriye çevirir. Krikotiroid ve posterior krikoaritenoid kasın antagonistidir. Bu kas vokal kordlara addüksiyon yaptırır. Fonasyon için en önemli kastır (35).

Larenksin Bağları

Thyroepiglottic bağ: Epiglot ile tiroid kıkırdak arasındaki bağlantıyı sağlar.

Hyoepiglottic bağ: Hiyoid kemik ile epiglotun lingual yüzünü birleştirir.

Stylohyoid bağ: Temporal kemikten hiyoide uzanır.

Pharyngoepiglottic bağ: Farenksin yan duvarlarıyla epiglot arasında uzanır.

Ventriküler bağ: Ventriküler bandın serbest kenarını meydana getirir.

Krikotrakeal bağ: Krikoid alt kenarından trakeanın birinci halkasının üst kenarına uzanır (36).

Larenksin Membranları

Tirohiyoid membran: İneriorda tiroid kıkırdagın üst kenarına ve üst kornunun ön yüzüne, süperiorda ise hiyoid kemiğin korpusuna ve büyük boynuzuna yapışır (36).

Kuadrangüler membran: Epiglotun lateralinden aritenoide uzanır. Supraglottik larenksi paraglottik alandan ayırır. Üstte ariepiglottik plika, altta ventriküler ligament yaparak sonlanır (37).

Konus elastikus (Triangüler Membran): Krikoid kıkırdak üst kenarından, önde tiroid kıkırdak alt kenarına, arkada ise aritenoid kıkırdagın vokal çıkıntısına uzanır. Kenarları serbesttir, medial ve lateral yüzleri kalınlaşıp vokal ligamenti oluşturur (37).

Larenksin Potansiyel Boşlukları

Reinke Boşluğu

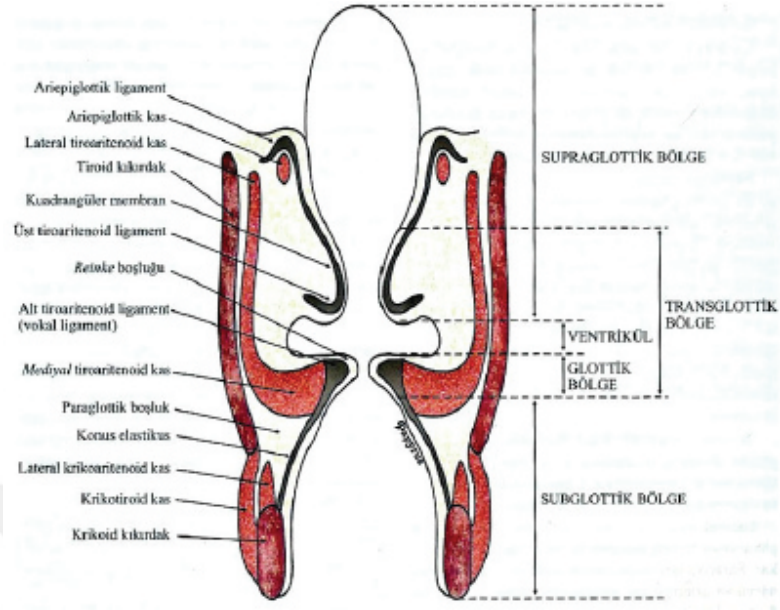
Vokal kord mukozasının altında yer alan, fibröz yapılardan zayıf subepitelyal bağ doku tabakasıdır.

Preepiglottik Boşluk

Üstte vallekula mukozası ve hiyoepiglottik ligament, arkada epiglot ve tiroepiglottik ligament, önde tirohiyoid membran ve tiroid laminanın iç yüzü oluşturur. Yanlarda paraglottik boşlukla devam eder.

Paraglottik Boşluk

Ventrikül lateralindeki kalan bölgedir. Dışta kanatlar, inferomedialde konus elastikus, medialde larengeal ventrikül, süperomedialde ise kuadrangüler membran ile sınırlıdır (Şekil 2.3) (38).



Şekil 2.3: Larenks bölgeleri ve boşlukları- Hızalan (2003)

Larenksin İnternal Anatomisi

Larenks iki müköz membranla (yalancı ve gerçek vokal kordlarla) üç bölüme ayrılır.

Vestibül: Anteriorda epiglot posterior yüzü, posteriorda aritenoid kıkırdaklar arasındaki internal ve lateralde arieplottik foldların iç yüzü ve yalancı kordların üst sınırı tarafından sınırlanır.

Ventrikül (Sinüs Morgagni): Yalancı ve gerçek vokal kordlar arasındaki girintidir.

Subglottik Boşluk (İnfraglottik Kavite): Glottisten krikoid kıkırdağın inferioruna doğru uzanır.

Yalancı Kordlar (Ventriküler Bantlar): Larengeal kavitede her iki horizontal foldun üst sınırındır (37).

Gerçek Kordlar (Vokal Kordlar): Vokal kord aritenoidin vokal prosesi ile ön komissür arasında uzanan yapıdır. Vokal kordlar yapısal olarak 3 bölümden oluşur. Bunlar sırasıyla epitel, lamina propria ve vokal kastır. Bu bölümler gövde örtü konseptine göre ayrılabilir. Yüzey dökemesi örtücü epitel ve lamina proprianın jelatinöz tabakalarından oluşur. Bunun altı ise vokal kastan oluşur. Aralarında lamina proprianın intermediate (elastik) ve derin (kollajenöz) tabakalarından oluşan bir geçiş bölgesi bulunur. Yüzey örtüsü vokal kordların titreşim aktivitesinden büyük oranda sorumludur (35).

Larenksin Kanlanması

Arteriyel Vaskülarizasyon: Larenksin arteriyel kanlanması süperior ve inferior larengeal arterlerden oluşur. Superior tiroid arterin dalı olan süperior larengeal arter, larenkse girmeden önce infrahiyoid ve krikotiroid olmak üzere iki dala ayrılır. İnferior larengeal arter, inferior tiroid arterin bir dalıdır. Bu arter subklavian arterin tiroservikal trunkusunun dalıdır (36).

Venöz Vaskülarizasyon: Larenksin venöz damarları süperior ve inferior larengeal venlerdir. Arterlere paralel seyrederek. Süperior ve inferior tiroid venlere açılırlar. Bunlar da intenal juguler vene boşalırlar (36).

Lenfatik Dolaşım: Larenkste lenfatik kanallar yüzeysel (intramukozal) ve derin (submukozal) olarak seyrederek. Supraglottik bölgedeki lenfatiklerde, iki taraf birbiri ile ilişkilidir, üst ve orta juguler lenf nodlarına drene olur. Glottik bölgede kordların membranöz parçası lenfatik ağ açısından zayıftır. Subglottik bölgede iki çeşit drenaj yolu bulunur. Biri pretrakeal ve oradan da orta derin juguler nodlara uzanır. Diğeri, paratrakeal, trakeoözofageal nodlara gider (36).

Larenksin İnnervasyonu

Larenks motor ve sensitif uyarımını N. vagustan alır. N. vagus, süperior laringeal ve inferior laringeal sinirler olmak üzere larenkse dallar yollar. N. Laryngeus superiorun internal ve eksternal dalı mevcuttur. İnternal dal hirohiyoid membrane deler larenksin supraglottik bölgesinin duyusunu alır. Eksternal dalı M. Cricothyroideus'un motor

dalıdır. N. Laryngeus inferior (Nervus recurrens) n. vagustan ayrıldıktan sonra solda arkus aortayı, sağda ise subklavian arteri çaprazlayarak yukarıya yönelir. Anterior dal motor lifler içerirken posterior dal duyuşal lifler içerir. Larenksin kord vokal altındaki kısmının duyuşunu ve m. cricothyroideus dışında kalan internal larenks kaslarının motor uyarımından sorumludur (37).

2.2.5. Sıçan Larenks Anatomisi

Larenks kıkırdakları, inspirasyon esnasında kollapsı önler ve larenksin şeklini korur.

Altı adet kıkırdaktan meydana gelir.

1. Epiglot
2. Tiroid kıkırdak
3. Krikoid kıkırdak
4. Aritenoid kıkırdaklar
5. Kuneiform kıkırdaklar
6. 'U' şeklinde kartilaj: Aritenoid kıkırdakların düzeyinde, larengeal lümenin ön duvarı girişinde yer alır (39).

2.2.6. Sıçan Larenks Histolojisi

Larenksin ışık mikroskopi ile incelenmesinde 5 tip epitel görölür. Bunlar çok katlı skuamöz, skuamoid, yalancı çok katlı solunum ve yalancı çok katlı kübik epitelin iki formudur. Epiglotta büyük oranda, aritenoid seviyesinin üzerinde, lateral ventriküllerin içinde ve dorsal bölgede çok katlı skuamöz epitel bulunur. Vokal kordlarda ince bir skuamöz epitel yer alır. Epiglot inferiorunun ventrolateral bölgesinde solunum epitelinden oluşun bölgeler bulunmaktadır. Solunum epiteli, aritenoid seviyesi

iç yüzeyi boyunca ve vokal kordların kaudalinde mevcuttur. Yalancı çok katlı kübik epitel ise yassı ve solunum epitelinin arasında bir geçiş bölgesinde mevcuttur (40).

2.3. LUBRİCİN (PROTEOGLİKAN-4)

Pre-genomik çağda keşfedilen lubricin, David Swann tarafından ilk olarak "kayganlaştırıcı glikoprotein 1" olarak adlandırılmıştır (11). Lubricin, hyaluronidaza maruz bırakılan sinoviyal sıvıdan saflaştırılan ~ 227 kDa'lık geniş ölçüde O-bağlı glikoprotein olarak tanımlanmıştır (41).

Lubricin, ilk olarak sinoviyal sıvıdan izole edilmiş ve eklem kıkırdağının kayganlığını sağladığı belirlenmiştir (12). Lubricin, megakaryosit uyarıcı faktör (MSF) ile karşılaştırarak, insan sinoviyal fibroblastlar tarafından MSF gen ekspresyonunun bir ürünü olduğu bulunmuştur (42).

Lubricin, proteoglikan 4 (PRG4) olarak adlandırılır. PRG4 geninin ifadesi ayrıca akciğer, karaciğer, kalp ve kemikte de gözlenmiştir (43). Lubricin / PRG4 ayrıca idrar, plazma ve serumda da tanımlanmıştır (44,45).

Lubricinin en iyi bilinen fiziksel özelliği, sinoviyal sıvı, eklem kıkırdağının yüzeyel bölgesi, menisküs ve intrasinoviyal tendondaki varlığı ile tutarlı olan sınır kayganlığı sağlama kabiliyetidir (41,46,47). Lubricin ayrıca hücre sel büyüme de düzenler (10). İn vitro olarak megakaryosit kolonilerinin büyümesini uyarır ve hematopoetik endotelial primitif hücreleri üzerinde etkili olan yeni bir büyüme faktörü olduğu bildirilmiştir (45,48).

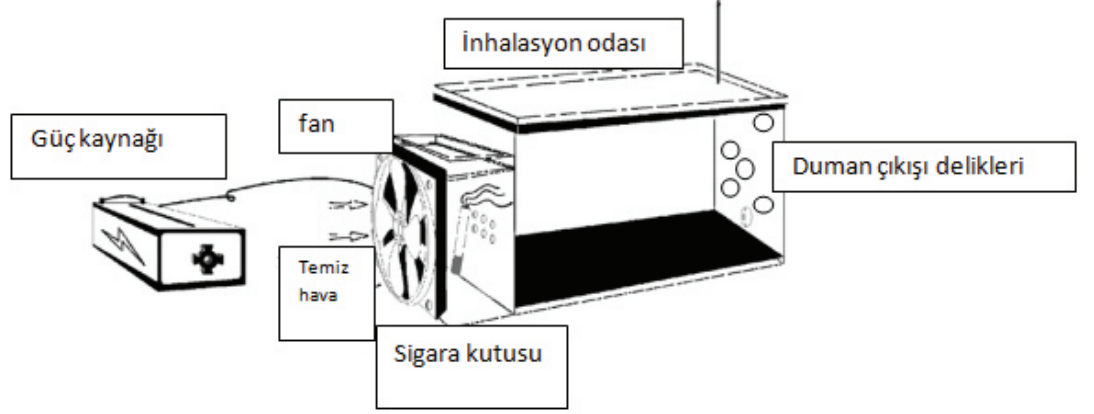
PRG4, gerçek vokal kordunun lamina propriasında izlenmiştir ve insanlarda da bulunduğu belirtilmiştir. Gerçek vokal kordun lamina propriası boyunca, kan damarlarının çevresinde, vokal proçesin elastik ucunda, bazı laringeal bağlarda ve bazı vokal kıvrımların yüzeyinde (özellikle köpeklerde) fibröz proteinlerle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Lubricinin kayganlaştırıcı olarak etki ettiği, fonlama ile ilişkili hasarı sınırlandırdığı ve vokal kord içindeki iç sürtünmeyi (viskoziteyi) azaltarak vokal verimi arttırdığı düşünülmektedir (13).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 01.04.2021 ile 01.05.2021 tarihleri arasında Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma esnasında 5199 numaralı “Hayvanları Koruma Kanunu” ve Tarım ve Köy işleri Bakanlığı’nın deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan deney hayvanlarının korunması, deney hayvanlarının üretim yerleri ile deney yapacak olan laboratuvarların kuruluş, çalışma, denetleme, usul ve esaslarına dair yönetmeliğine ve Avrupa Konseyi’nin önerdiği standartlara (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) uyuldu.

Çalışma öncesinde proje Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulunun onayına sunuldu ve 04.11.2020 tarih ve ACU-HADYEK 2020/50 sayılı etik kurul onayı alındı. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından tıpta uzmanlık projesi kapsamında 12.02.2021 tarihli 2021/026 proje numaralı karar ile çalışma desteklendi.

Sigara maruziyeti için oluşturulacak kabin düzeneği için H. Zheng ve arkadaşlarının çalışmasında oluşturulan sistem baz alındı (Şekil 3.1) (49). Sigara dumanına maruziyet için bir tarafına fan ve sigara kutusu monte edilmiş 30x40x50 cm boyutlarında bir fleksiglas kabini yapıldı. Sigara kutusunun monte edildiği tarafta 5 adet havalandırma deliği mevcuttu. Sigara kutusuna monte edilmiş 5 voltluk fan güç kaynağına bağlandı ve çıkan duman kabin içine buradan yönlendirildi. Duman çıkışını sağlamak amacıyla karşı duvarın 10 adet 2 cm çapında dairesel havalanma delikleri oluşturuldu (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: Sigara Dumanı İnhalasyon Kabini

Çalışma 16 adet 200–400 gram ağırlığında tamamı dişi Wistar albino sıçan üzerinde yapıldı. Sıçanlar, sıcaklığı 22 ± 2 °C’ de, nemi % 65–70 oranında korunan ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık dönemlerine sahip bir ortamda tutuldu. Herhangi bir diyet kısıtlaması uygulanmadı, su ve besin açısından ad libitum olarak beslendi.

Sıçanlar, kontrol ve sigara dumanına maruz bırakılan grup (deney grubu) olarak iki gruba ayrıldı. Her grupta 8 sıçan bulunuyordu. Kontrol grubuna herhangi bir medikasyon ve maruziyet uygulanmadı.

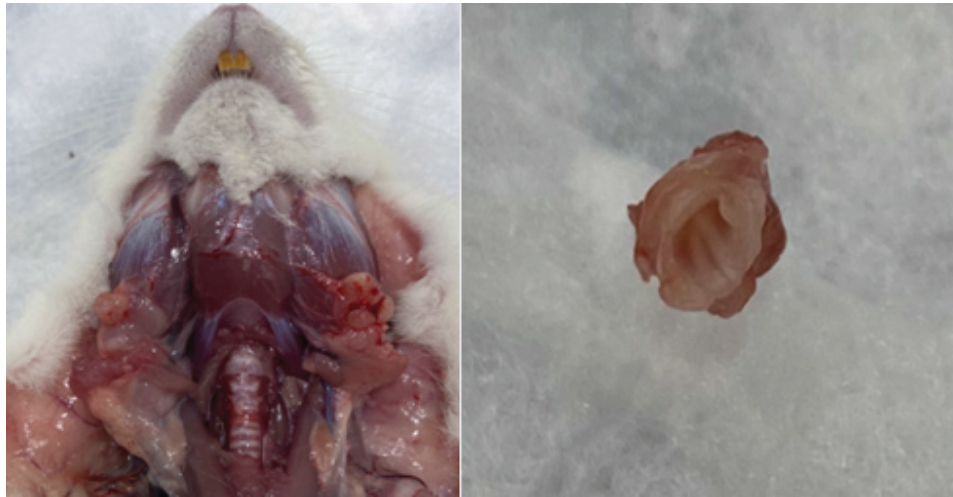
Deney grubu 30 gün boyunca öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere iki farklı saat diliminde, birer saat boyunca kesintisiz sigara dumanına maruz bırakıldı. Bir saat boyunca ortalama 10 dakikada bir yeniden sigara yakıldı. Günde yaklaşık 12-14 adet sigara tüketildi.

Sigara dumanına maruziyet süresi boyunca kabin içerisinde 8 adet sıçan aynı anda bulunduruldu. Çalışmada L&M Red® sigarası kullanıldı. Bu sigara içerisinde katran 10 mg, nikotin 0.7 mg ve karbonmonoksit 10 mg’dır.



Şekil 3.2: Deney Hayvanlarının Yer Aldığı Sigara Dumanı İnhalasyon Kabini

Deney ve kontrol grubu sıçanları 30 günün sonunda yüksek doz inhalasyon anestezisini takiben sakrifiye edildi. Tüm sıçanların larenksleri diseke edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Deneklerin Sakrifiye Edilmesi Aşaması ve Larenks Materyali

3.1. MORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Diseksiyon sonrası histopatolojik incelemeler, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Fatih Sultan Mehmet Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Patoloji Bölümünde yapıldı. Operasyon sonrası her bir sıçana ait larenks eksizyon materyali %10'luk tamponlu formol solüsyonunu içeren ayrı biopsi kaplarına alınarak kodlandı. Tamponlu formolde 24 saat tespit edilen spesmenler vertikal düzlemde iki parça halinde örneklenecek kasetlendi. Doku Takip Cihazı'na (Leica ASP 300S) yerleştirilen kasetler, doku takip işlemi sonrası Doku Gömme Cihazı (Shandon Histocentre 3) kullanılarak parafin blok haline getirildi. Rotary mikrotom (Thermo) ile blokların herbirinden 4 mikron kesitler halinde pozitif şarjlı iki lam hazırlandı. Deparafinizasyon sonrasında lamaların biri hematoksilin-eozin (Shandon Harris Hematoxylin-Eosin Y -UK) ile otomatik boyama kapama cihazında (Sakura Tissue Tek Film) boyanarak preparat haline getirildi. Diğeri ise immünohistokimya boyama amaçlı otomatik immünohistokimya cihazına (Leica Bond Max) yerleştirildi. İmmünohistokimyasal boyama amaçlı Anti-Lubricin/proteoglycan 4, clone 9G3 monoklonal antikor (Merck) 1/500 dilüsyon kullanıldı. Bu çalışmada, protein düzeyinde kullanılan primer antikorların spesifik reaksiyonunu test etmek için, sıçan kıkırdak dokusundan oluşan pozitif kontroller ve primer antikor olmadan negatif kontroller yapıldı.

Histopatolojik inceleme, patoloji uzmanı tarafından Olympus CX41 RF (Japan) trinoküler ışık mikroskopunda x40, x100, x200 ve x400 objektifde yapıldı ve adapte digital kamera (Olympus EP50) ile mikrofotografları çekildi.

İmmünohistokimyasal değerlendirme aybı şekilde ışık mikroskopunda yapıldı. Lubricin/Proteoglycan 4 boyama durumu pozitif veya negatif olarak tanımlandı.

Tüm örneklerde ortak boyanma alanları olarak gözlenen larenks duvarındaki kondroid adacıklar, perikondrial içsi hücreler, vokal ligament, subepitelyal fibroblastik hücreler, damar endoteli ve çizgili kas hücrelerindeki nükleer/sitoplazmik kahverengi kromogen yoğunluğu ve yaygınlığı belirlenen kriterlere göre skorlandı.

3.1.1. Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme Kriterleri

A-Mukozal mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu. (Mİ)

- 0 Yok
- 1 Hafif derecede
- 2 Orta derecede
- 3 Ağır (ileri) derecede

B-Mukozal nötrofil infiltrasyonu. (Nİ)

- 0 Yok
- 1 Hafif derecede
- 2 Orta derecede
- 3 Ağır (ileri) derecede

C-Kord epitelinde skumöz metaplazi. (SM)

- 0 Yok
- 1 Fokal
- 2 Vokal kord epitelinin %25 inden azında
- 3 Vokal kord epitelinin %25-50 sinde
- 4 Vokal kord epitelinin %50 sinden fazlasında

D- Kord epitelinde hiperplazi (H)

- 0 Yok

- 1 Fokal
- 2 Vokal kord epitelinin %25 inden azında
- 3 Vokal kord epitelinin %25-50 sinde
- 4 Vokal kord epitelinin %50 sinden fazlasında

E- Anti-Lubricin/Proteoglycan 4, clone 9G3 immünohistokimyasal boyanma

a- Boyanma yaygınlığı (Percentage of immunopositive cells; Extent score ;ES)

- 0 Boyanma < 5 %
- 1 Boyanma = 5-10 %
- 2 Boyanma = 11-25 %
- 3 Boyanma = 26-50 %
- 4 Boyanma > 50 %

b- Boyanma Yoğunluğu (İntensity of staining; IS)

- 0 Boyanma yok (no detectable staining)
- 1 Zayıf boyanma (weak staining)
- 2 Orta düzeyde boyanma (moderate staining)
- 3 Güçlü boyanma (strong staining)
- 4 Çok güçlü boyanma (very strong staining)

3.2. İSTATİSTİK

Hayvan sayısının belirlenmesi; G*Power programı kullanılarak yapılan power analizi sonucunda 30. Gün histopatolojik değişiklik parametresi için etki büyüklüğü (effect size) 1.711157 ve SD:28.18 alındığında Power:0.9 ve α :0.05 için tespit edilen örneklem sayısı minimum n=8 olarak saptandı.

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS 25 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Araştırma grupları arasında histopatolojik, enflamatuar ve immünohistokimyasal değişiklikler arasındaki istatistiksel anlamlı ilişkilerin tespiti çerçevesinde spearman korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

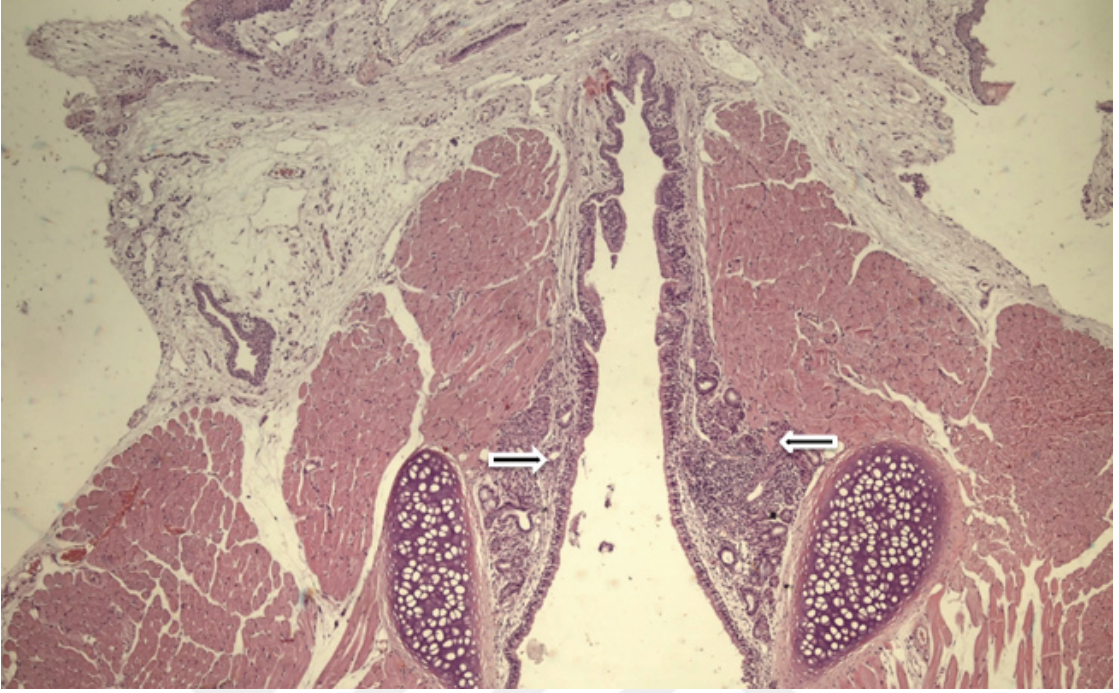
4. BULGULAR

Çalışma 16 sıçan ile yapılmış olup, 8'er sıçanın yer aldığı iki grup altında incelenmiştir. Çalışmada sigaraya dumanına maruz bırakılan grup "Deney grubu", sigara dumanına maruz bırakılmayan grup "Kontrol grubu" olarak adlandırılmıştır.

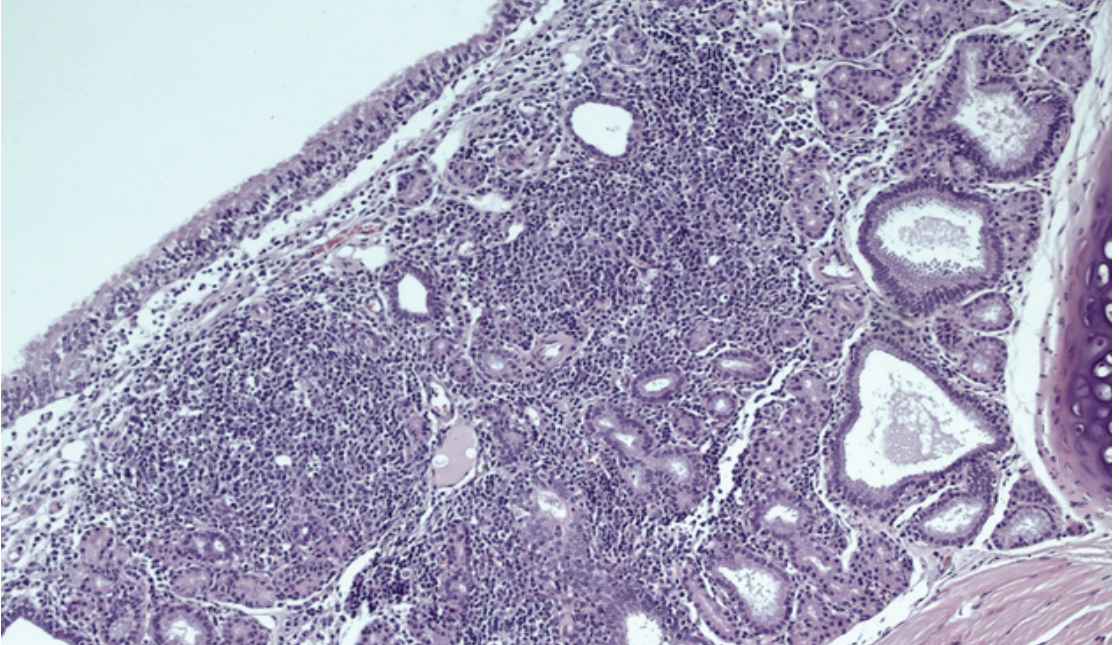
Çalışmamızda çevresel sigara dumanına maruz bırakılan deney grubu sıçanlarda, dumana maruz kaldıkları süre içerisinde kabin içerisinde uyku halinde olduklarını gözlemlendi. Kontrol grubu sıçanlarda ise böyle bir durum gözlemlenmedi. Deney sırasında sıçan sayısında herhangi bir kayıp görülmedi. Her iki grup deney ve kontrol sıçanlarında yem ve su tüketimi açısından bir fark görülmedi.

Deney ve kontrol grupları sıçanlarının glottis bölgesi genel olarak değerlendirildiğinde histopatolojik olarak ventral kısım lamina propriası gevşek bağ dokuya sahip yalancı çok katlı silyalı epitel özelliğinde izlendi. Vokal kordların serbest kenarı lamina propriası daha yoğun karakterde bağ dokusu karakterinde yalancı çok katlı silyasız kolumnar epitel yapısı gösteriyordu. Vokal kordun aritenoid kıkırdaga yakın orta kısmı ve glottisin dorsum bölgesi çok katlı yassı epitel yapısında izlendi (Şekil 4.1).

Kontrol grubu sıçanlarının larenks epitelinde mukozal mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ağırlıklı olarak hafif oranda gözlemlendi (Şekil 4.1). Deney grubu sıçanlarında mukozal mononükleer iltihabi infiltrasyonu orta- ağır yoğunlukta gözlemlendi (Şekil 4.2). Bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$) belirlendi (Tablo 4.1).

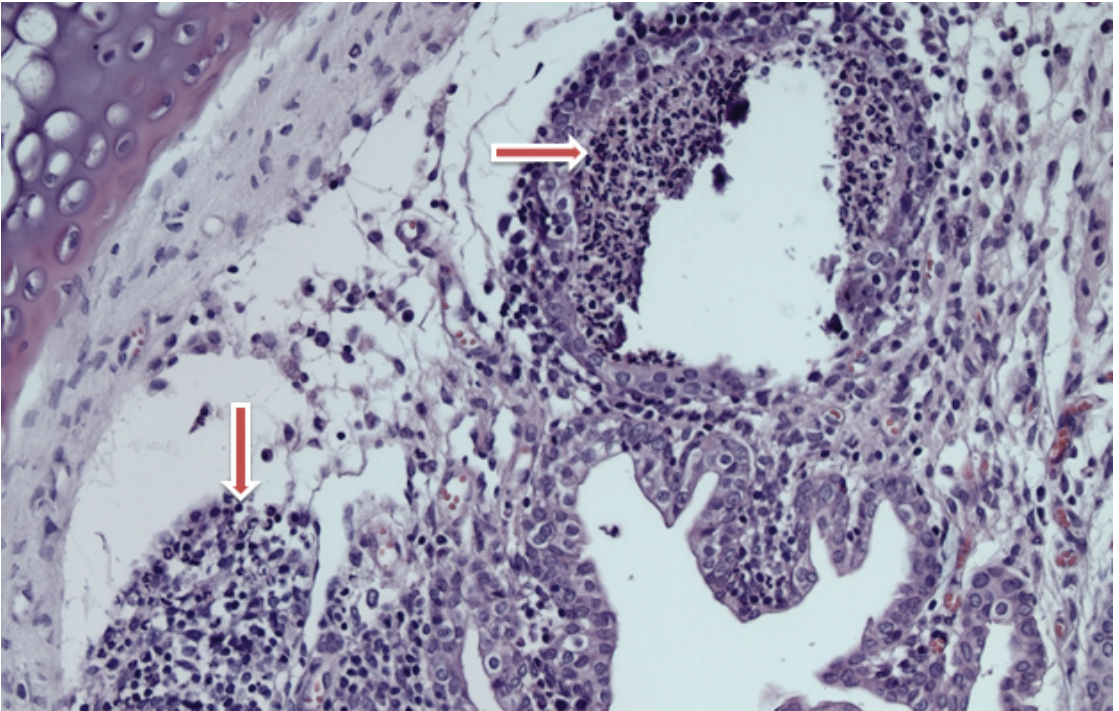


Şekil 4.1: Kontrol grubu; küçük büyütmede subepitelyal alanda hafif derecede kronik iltihabi infiltrasyon (ok) H&Ex40



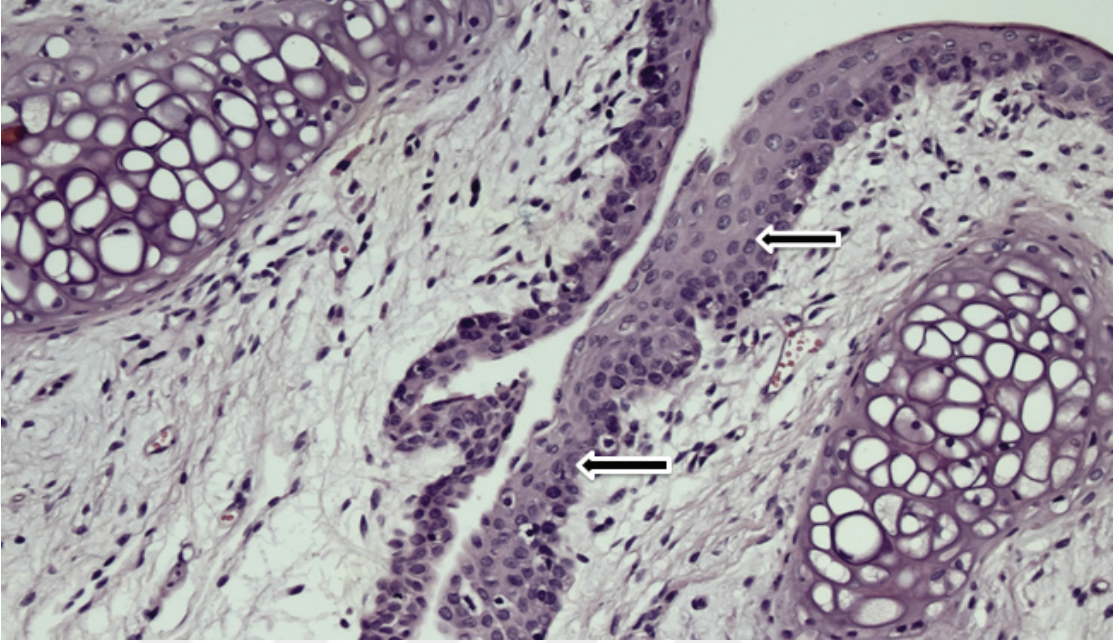
Şekil 4.2: Sigara grubu, mukozada ağır mononükleer iltihabi infiltrasyon. H&Ex100

Konrol grubu ve deney grubu larenks epitelı mukozal n6trofil infiltrasyonları karşılaştığında deney grubunun bir deneğinin ağır oranda infiltrasyon g6stermesi (şekil 4.3) dışında her iki grubun hafif oranda bulgulara sahip olduğu değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık g6r6lmedi (Tablo 4.1).

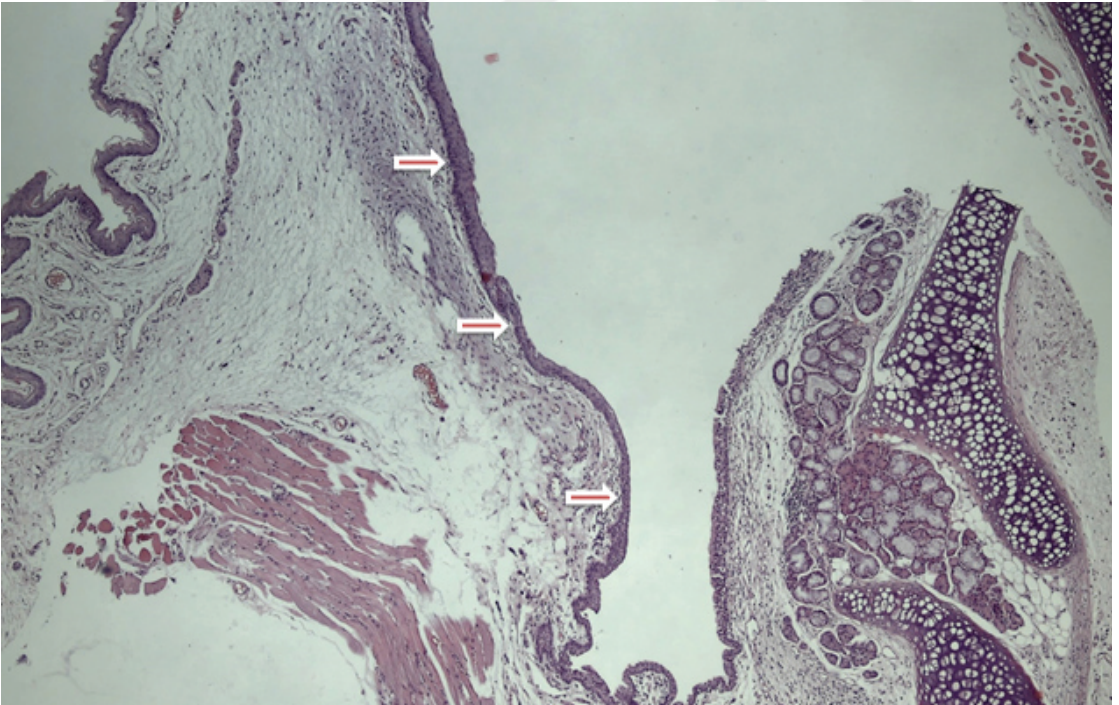


şekil 4.3: Sigara grubu, mukozada ağır n6trofil infiltrasyonu.(ok) H&Ex100

Kord epitelindeki skuam6z metaplazi değerlendirildiğinde kontrol grubunda metaplazinin fokal olduğu ve hiğ olmadığı g6r6ld6 (şekil 4.4). Deney grubunda metaplazinin orta- yaygın yoğunlukta izlendiği belirlendi (şekil 4.5). İki grup karşılatırıldığında deney grubunda metaplazinin istatistiksel olarak fazla olduğu ($p < 0,05$) değerlendirildi (Tablo 4.1).

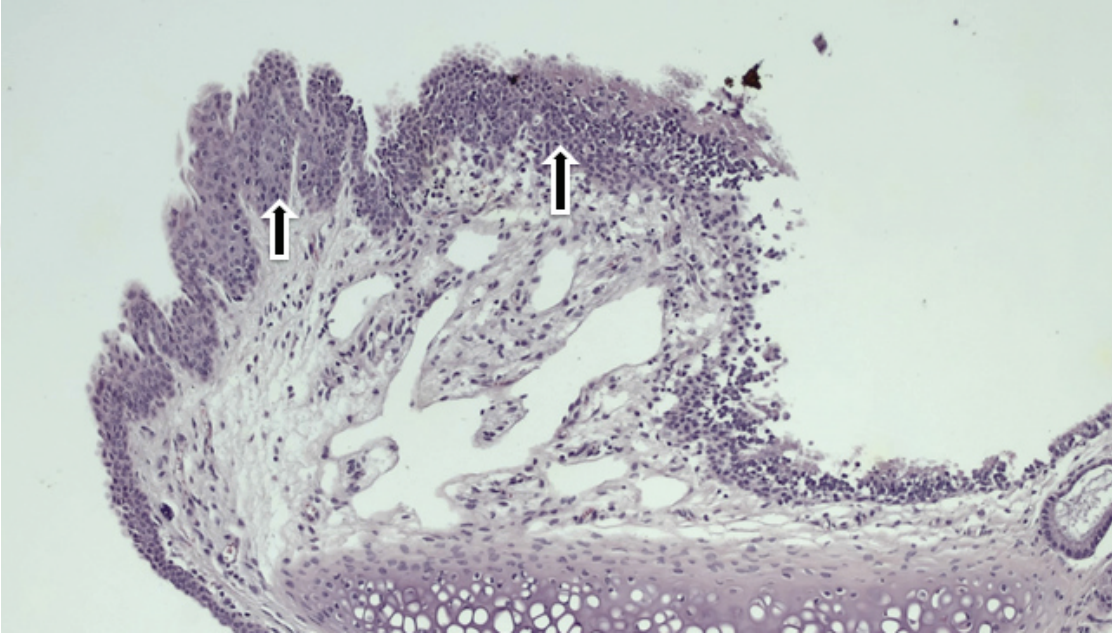


Şekil 4.4: Kontrol grubu; Yüzey epitelinde skuamöz metaplazi alanı (ok) H&Ex200

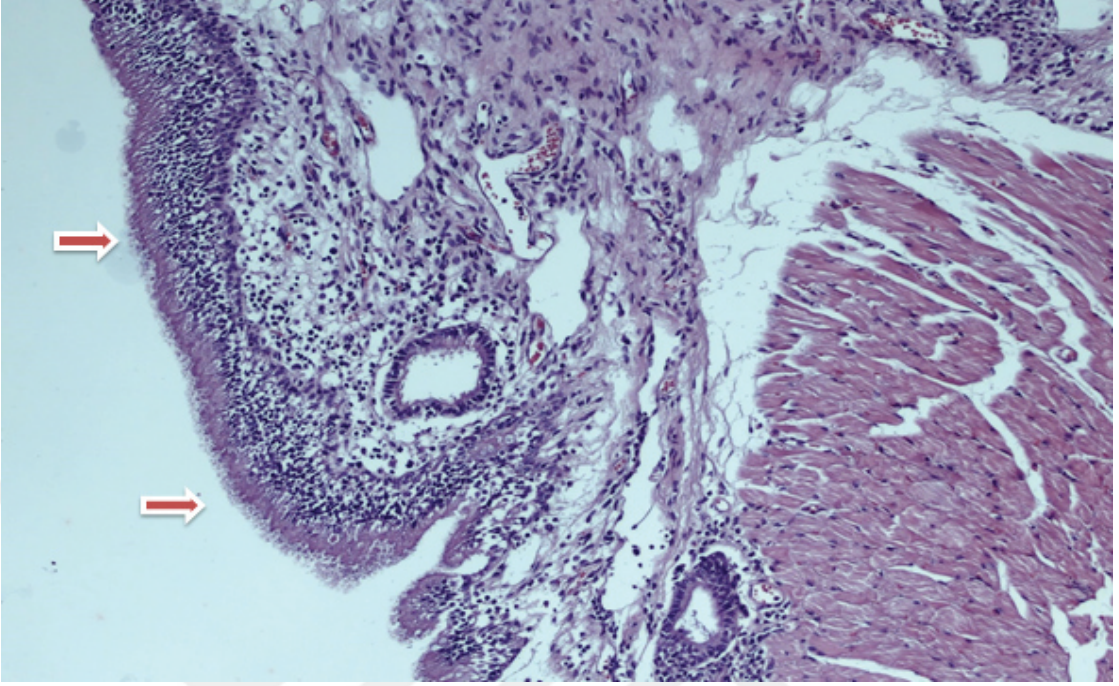


Şekil 4.5: Sigara grubu; küçük büyütmede yüzey epitelinde yaygın skuamöz metaplazi (ok) H&Ex40

Konrol grubu ve deney grubu vokal kord epitelindeki hiperplazi karşılaştığında her iki grupta da ağırlıklı olarak fokal hiperplazi olduğu değerlendirildi (Şekil 4.6, Şekil 4.7). İstatistiksel olarak anlamlılık görülmedi (Tablo 4.1).

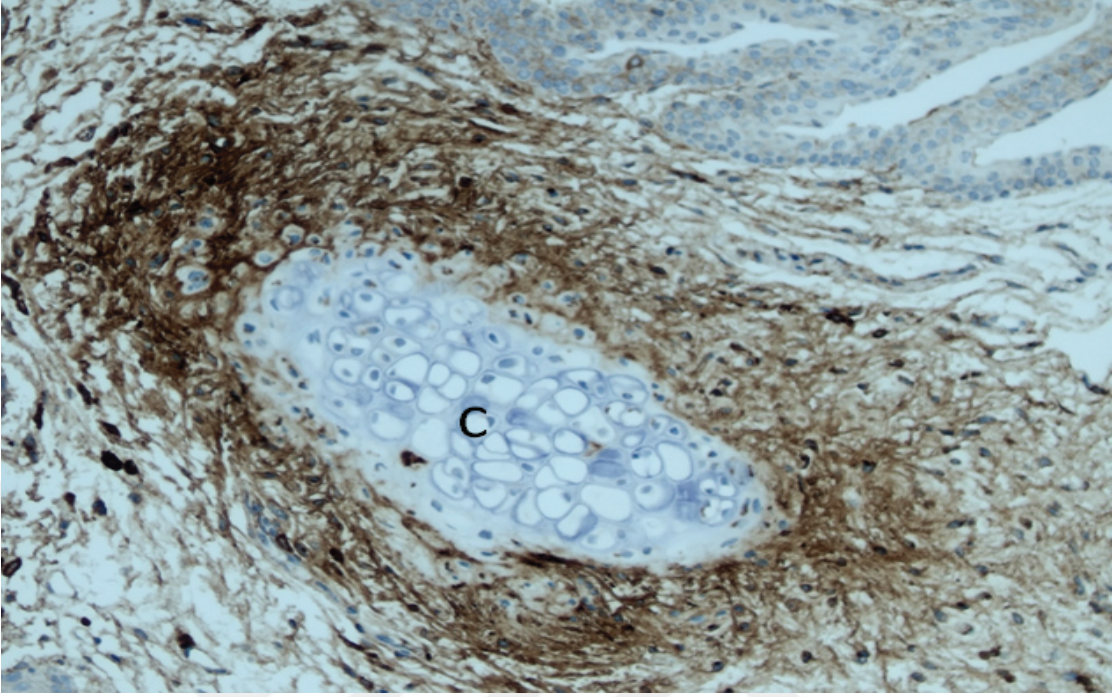


Şekil 4.6: Kontrol grubu; Mukozal yüzey epitelinde hiperplazi ve skuamöz metaplazi alanı (OK)
H&Ex100

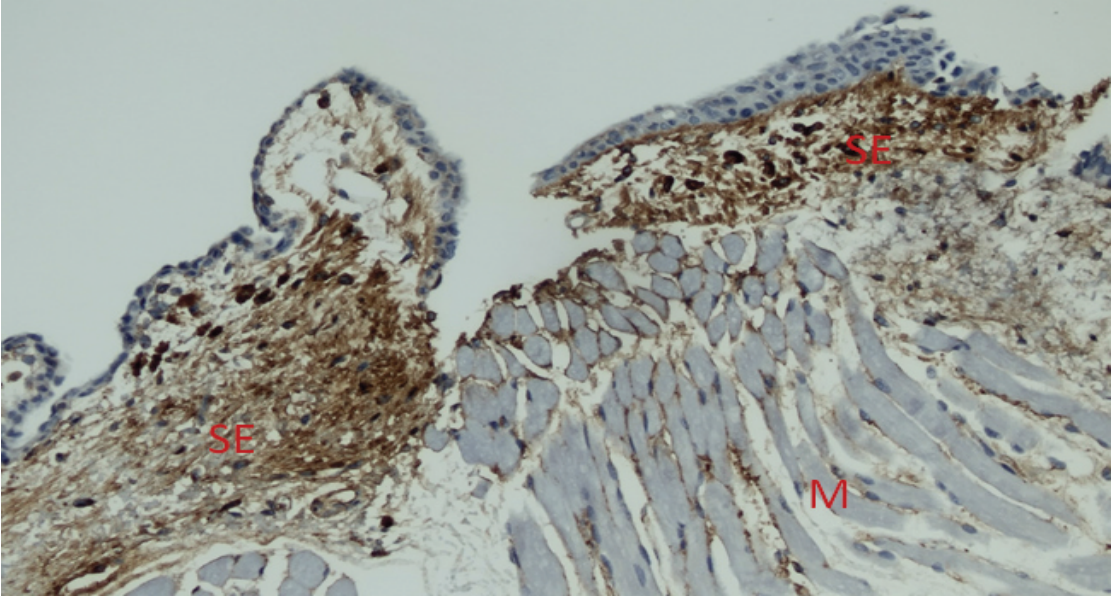


Şekil 4.7: Sigara grubu, yüzey epitelinde hiperplazi. (ok) H&Ex100

İmmünohistokimyasal olarak her iki grupta da en yaygın ve en yoğun boyanma perikondial iğsi hücrelerde tespit edildi. Gittikçe azalan sırası ile boyanma vokal ligament, subepitelyal fibroblastik hücreler, kondrositler, damar endoteli ve çizgili kas hücrelerinde de izlendi. Ayrıca mukozal mast hücrelerinde boyanma gözlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



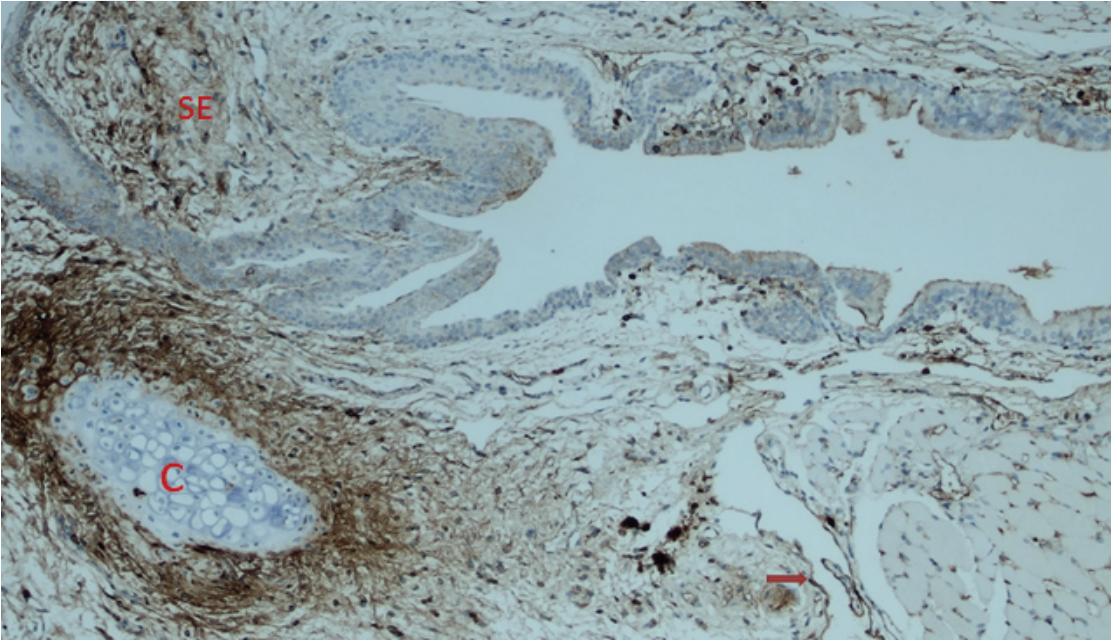
Şekil 4.8: Kontrol grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile kondroid adacıkta (c) periferel kondrositlerde ve iğsi hücrelerde gözlenen kuvvetli boyama . Immunostaining x 200



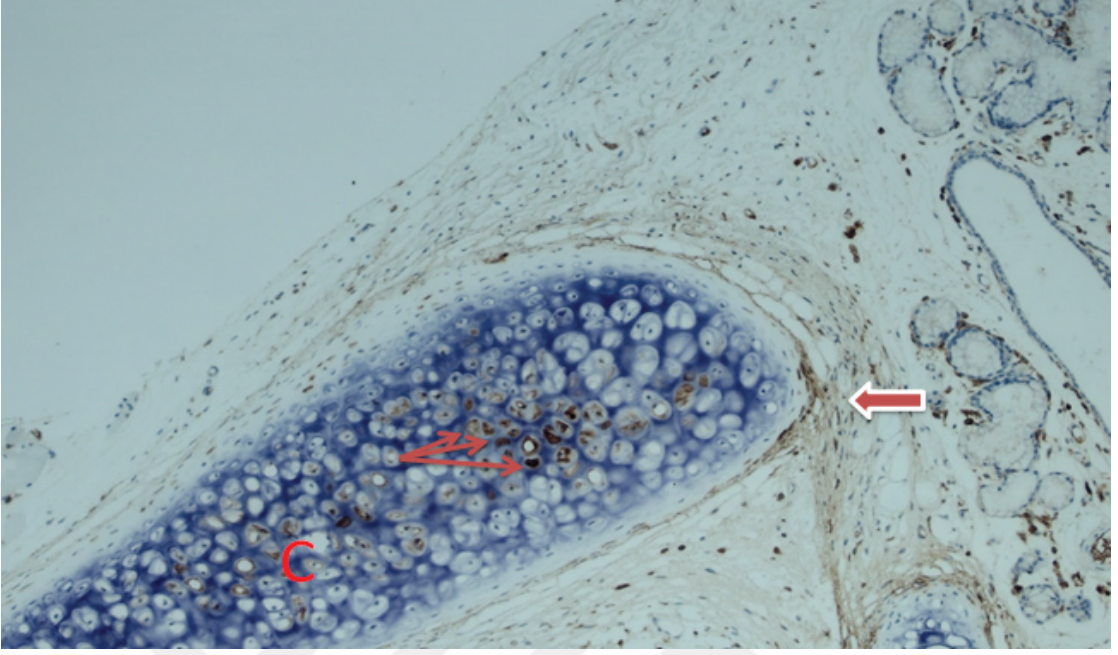
Şekil 4.9: Kontrol grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile subepitelyal fibroblastlarda (SE) çizgili kas dokusunda (M) gözlenen orta düzeyde boyama . Immunostaining x 200

Kontrol ve deney grupları için anti-Lubricin/Proteoglycan 4, clone 9G3 immünohistokimyasal boyanma yaygınlığı karşılaştırıldığında her iki grubun orta derecede sonuç verdiği izlendi. Bu bulgulara göre boyanma yaygınlığı açısından istatistiksel anlamda farklılık gözlenmedi (Tablo 4.1).

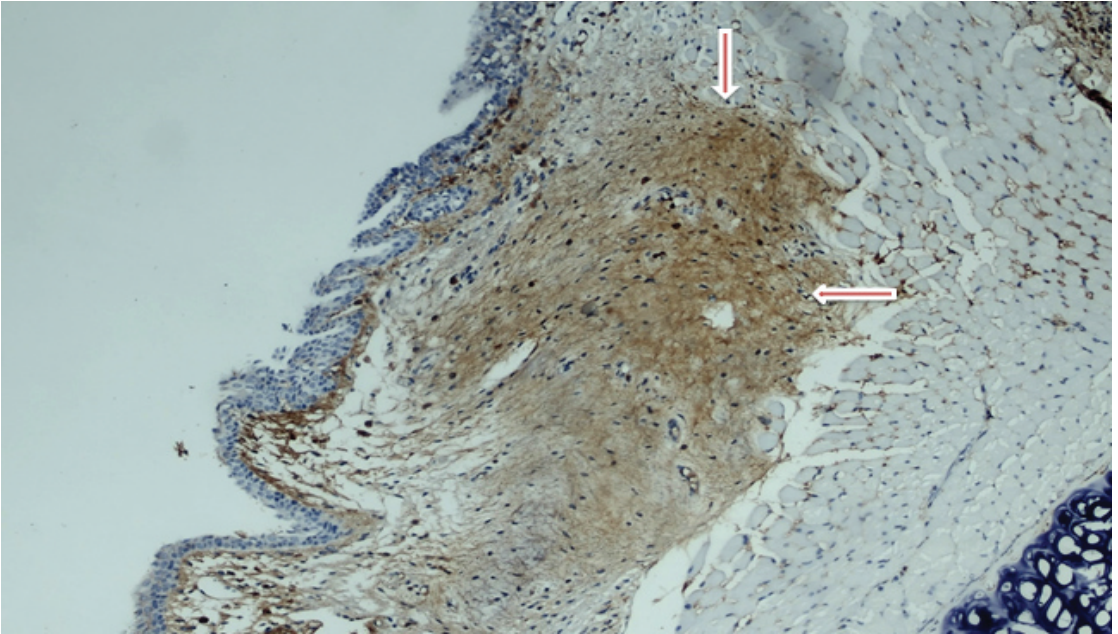
Anti-Lubricin/Proteoglycan 4, clone 9G3 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğu değerlendirildiğinde kontrol grubunda güçlü boyanma (Şekil 4.10), deney grubunda hafif-orta düzeyde boyanma (Şekil 4.11, Şekil 4.12) izlenmiştir. Gruplar arasındaki boyanma yoğunluğu farkı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur (Tablo 4.1).



Şekil 4.10: Kontrol grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile kondroid adacık (c) periferinde, subepitelyal bağ dokusunda (SE) ve damar endotellerinde (ok) gözlenen kuvvetli boyama. Immunostaining x 100



Şekil 4.11: Sigara grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile kondroid dokuda (c) kondrositlerde orta yoğunlukta boyanma (ince ok) perikondriyal işi hücrelerde (kalın ok) hafif boyanma. Immunostainingx100



Şekil 4.12: Sigara grubu; Lubricin/Proteoglycan 4 ile mukozal fibroblastlar ve ligamentte (ok) hafif boyanma. Immunostainingx100

Tablo 4.2’de araştırmanın deney grubunun anti-Lubricin/Proteoglycan 4, clone 9G3 immünohistokimyasal boyanma yoğunluğu ile histopatolojik değişikliklerin karşılaştırılması amacıyla oluşturulan çapraz tablo bulguları yer almaktadır. Elde edilen bulgular incelendiğinde değişkenler kapsamında belirli boyutlarda kümelenmelere rastlanılmıştır. Bulgular incelendiğinde deney grubunda boyanma yoğunluğu bakımından hafif- orta düzeyde boyama gösteren deneklerin kord epitelinde skumöz metaplazi ve hiperplazi izlenmiş olup, aynı şekilde bu deneklerde güçlü boyanma yoğunluğu izlenenlerde ağırlıklı olarak mukozal nötrofil infiltrasyonu göstermediği rastlantısal olarak anlamlı tespit edilmiştir.

Tablo 4.1: Araştırma Gruplarının Enflamatuvar ve İmmünohistokimyasal Değişikliklerin Dağılımları

		Deney Grubu (N = 8)		Kontrol Grubu (N = 8)		P
		N	%	N	%	
Mukozal mononükleer iltihabi infiltrasyonu (Mİ)	Yok	0	0	0	0	0,037
	Hafif derecede	3	38	7	87,5	
	Orta derecede	4	50	1	12,5	
	Ağır derecede	1	12	0	0	
Mukozal Nötrofil infiltrasyonu (Nİ)	Yok	5	62,5	7	87,5	0,252
	Hafif derecede	2	25	1	12,5	
	Orta derecede	0	0	0	0	
	Ağır derecede	1	12,5	0	0	
Kord epitelinde skumöz (SM) metaplazi	Yok	0	0	3	37,5	0,004
	Fokal	2	25	4	50	
	Vokal kord epitelinin %25'inden az	4	50	1	12,5	
	Vokal kord epitelinin %25 - %50'sinde	1	12,5	0	0	
	Vokal kord epitelinin 50'sinden fazla	1	12,5	0	0	
Kord epitelinde hiperplazi (H)	Yok	0	0	2	25	0,448
	Fokal	5	75	5	62,5	
	Vokal kord epitelinin %25'inden az	2	25	1	12,5	
	Vokal kord epitelinin %25 - %50'sinde	0	0	0	0	
	Vokal kord epitelinin 50'sinden fazla	0	0	0	0	
Lubricin Boyanma yaygınlığı (ES)	< %5	0	0	0	0	0,619
	%5 - %10	0	0	0	0	
	%11 - %25	6	75	5	62,5	
	%26 - %50	2	25	3	37,5	
	< %51	0	0	0	0	
Lubricin Boyanma Yoğunluğu (IS)	Boyama yok	0	0	0	0	0,049
	Zayıf boyama	2	25	0	0	
	Orta düzeyde boyama	5	62,5	4	50	
	Güçlü boyama	1	12,5	3	37,5	
	Çok güçlü boyama	0	0	1	12,5	

p < 0,05

Tablo 4.2: Deney Grubunun Boyanma Yoğunluğu ve Histopatolojik Enflamatuvar Değişikliklerin Dağılımları

		Mukozal mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu (Mİ)				
		Yok	Hafif derecede	Orta derecede	Ağır derecede	
Boyanma Yoğunluğu (IS)	Boyama yok	0	0	0	0	
	Zayıf boyama	0	1	1	0	
	Orta düzeyde boyama	0	1	3	1	
	Güçlü boyama	0	1	0	0	
	Çok güçlü boyama	0	0	0	0	
		Mukozal Nötrofil infiltrasyonu (Nİ)				
		Yok	Hafif derecede	Orta derecede	Ağır derecede	
Boyanma Yoğunluğu (IS)	Boyama yok	0	0	0	0	
	Zayıf boyama	0	2	0	0	
	Orta düzeyde boyama	4	0	1	0	
	Güçlü boyama	1	0	0	0	
	Çok güçlü boyama	0	0	0	0	
		Kord epitelinde skumöz metaplazi (SM)				
		Yok	Fokal	Vokal kord epitelinin %25'inden az	Vokal kord epitelinin %25 - %50'sinde	Vokal kord epitelinin 50'sinden fazla
Boyanma Yoğunluğu (IS)	Boyama yok	0	0	0	0	0
	Zayıf boyama	0	1	1	0	0
	Orta düzeyde boyama	0	1	3	0	1
	Güçlü boyama	0	0	0	1	0
	Çok güçlü boyama	0	0	0	0	0
		Kord epitelinde hiperplazi (H)				
		Yok	Fokal	Vokal kord epitelinin %25'inden az	Vokal kord epitelinin %25 - %50'sinde	Vokal kord epitelinin 50'sinden fazla
Boyanma Yoğunluğu (IS)	Boyama yok	0	0	0	0	0
	Zayıf boyama	0	0	2	0	0
	Orta düzeyde boyama	0	1	3	1	0
	Güçlü boyama	0	0	0	1	0
	Çok güçlü boyama	0	0	0	0	0

5. TARTIŞMA

Deneysel çalışmamızda sıçanları 30 gün boyunca günde 2 saat boyunca sigara dumanına maruz bıraktık. Bu maruziyet sonucunda elde edilen bulgulara göre anlamlı derecede mukozal mononükleer hücre infiltrasyonu ve epitelyal skuamöz metaplazi belirledik. Sıçanlarda nötrofil infiltrasyonu ve epitelyal hiperplazi de artmış izlense de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda hayvanlarda gözlenen inflamatuvar lezyonlar ve anatomik patolojik inceleme insanlarda bulunanlarla uyumludur. Ayrıca, günlük sigara dumanı maruziyetine rağmen, deney sırasında hayvan kaybının olmaması ve herhangi bir komorbidite gelişmemesi hayvanların bağışıklık sistemi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Literatürde tanımlandığı gibi insanlarla ilgili olarak, sigaraya maruziyetin direct olarak sigaraya bağlı hastalıklar geliştirmedini ve bu tür hastalıkların gelişiminin sigara dumanına maruz kalan hayvanlar ve insanlarla ilişkili komorbiditelere bağlı olacağını göstermektedir (50,51).

Çevresel sigara dumanına maruziyet, dünya çapında alışkanlık ve davranışlarda değişiklik yapılmasını ve özellikle kapalı mekanlarda sigara içmeyi kısıtlayan yasaları gerektiren bir halk sağlığı sorunudur. Pasif içicilik, bir başkası tarafından üretilen dumana maruz kalmak anlamına gelir. Sigaralar iki tür duman üretir. Bunlar sigaranın yanmasıyla ucunda meydana gelen ve yan akım dumanı olarak adlandırılan ve sigara içen kişinin ciğerlerinden gelen olarak sınıflanabilir (6).

Yan akım dumanı, yavaş yanma süreci nedeniyle daha fazla toksik madde içerir ve solunum mukozasının savunma mekanizmalarının ortadan kaldırması daha zor olan daha küçük partiküller üretir (52). Yanan tütünün dumanına maruz kalınması ve bunun sonucunda 44'ü kanıtlanmış kanserojen olan 4722'den fazla ürünün salınması yoluyla gerçekleşir. Ayrıca, başka bir araştırmada sigaranın yanması ile yaklaşık 5000 maddenin açığa çıktığını ve bunların 98'i kanserojen olarak kabul etmektedir (53).

Sigara, günümüzde insanlara hem fiziksel hem de psikolojik bağımlılıklara yol açan en zararlı ajanlardan biridir. Sigara alışkanlığının sona erdirilmesi, nikotine olan hem fiziksel hem de psikolojik bağımlılıkların ortadan kaldırılmasına yönelik tedavileri gerektirir. Sigara içeriğindeki maddeler oldukça kanserojen olmakla birlikte akciğer, ağız, gırtlak, yemek borusu, mide, prostat, mesane ve kolon kanserlerinin yüksek insidansından sorumludur (54). Çevresel sigara dumanı maruziyetiyle üst solunum sistemi etkilenmesi, orta kulak problemleri, alt solunum sistemi problemleri ve akciğer kapasitesinde azalma görülmektedir (7). Yine aynı şekilde kardiyovasküler sistemi de etkilemektedir (6).

Kadavra çalışmaları, sigara içmenin insan larenksi üzerinde zararlı etkileri olduğunu göstermiştir (55,56). Sigara içen kadavraların larenksleri üzerinde yapılan bir histolojik çalışmada gerçek vokal kordun sigaradan etkilenen ana bölge olduğu sonucuna varmıştır. Sigara içen ve içmeyenlerin larenkslerin karşılaştırılması, histolojik değişikliklerin (hücre atipik çekirdekleri, karsinoma in situ ve erken invaziv karsinom dahil) sigara içenlerde daha yaygın olduğunu ve ölümden önce gün içerisinde içilen sigara sayısı ile orantılı olarak arttığını gösterilmiştir (56).

Yapılan başka bir çalışmada sigara içmenin insan gırtlığında prekanseröz lezyonlara neden olduğu sonucuna varılmıştır (55). Vokal kordun üst ventriküler yüzeyinde yer alan lökoplak ve eritroplastik lezyonların sigara içenlerde atipi içerme olasılığının yüksek olduğu gösterilmiştir (57). Supraglottik bölgedeki metaplazinin yaşlanma ve tütün ve alkol tüketimi ile arttığı da belirtilmiştir (58). Larenkste skuamöz epitelden solunum epiteline geçiş bölgesinin özellikle ksenobiyotiklerin inhalasyonu ile dejenerasyon, skuamöz metaplazi veya hiperplazi gibi hücresel değişikliklerin gelişmesine duyarlı olduğu belirlenmiştir (59,60).

Larenksi inceleyen araştırmacılar arasında çok tartışılan bir diğer husus, glottisin lokalizasyonuna göre çeşitli epitel tipleri olduğundan, epitelinin dağılımıdır. Vokal kordun bulunduğu larenksin enine kesitlerinde, kordun orta kısmında ve larenksin dorsal kısmında çok katlı yassı epitel, dorsumda ve vokal kordun serbest ucunda yalancı çok katlı kolumnar epitel, vokal kord ve larenksin ventral kısmında kolumnar psödostratifye

siliat epitel olmak üzere üç farklı tipte epitel gözlemlendi (39). Çalışmamızda da benzer histolojik özelliklere sahip larenks epitel dağılımı izlendi.

Hayvan deneylerinde kullanılmak üzere sigara dumanı ortamlarını simüle etmek ve mukoza üzerindeki etkilerin çalışılmasını kolaylaştırmak için literatürde tarif edilen birkaç teknik vardır. Bu tür deneyler, sigaraların bir emme pompasına bağlı olduğu "sigara içme makinelerinin" kullanımını içeren veya bir fan aracılığıyla sigara dumanının deney ortamına iletildiği sistemlerle oluşturulmuştur (49,61,62). Bizim çalışmamızda da sıçanlarda sigara dumanına maruziyet önceki çalışmalarda kullanılan benzer model kullanılarak dumanın pasif olarak dağıldığı kapalı bir ortam oluşturuldu.

Sigaraya maruziyetin hayvanlar üzerine etkileri insanlara benzerlik göstermektedir. Doğumdan sonra ve yaşamın erken dönemlerinde sürekli olarak sigara dumanına maruz kalan fareleri içeren çalışmada akciğerlerde, karaciğerde ve üriner sistemde tümör oluşumu bildirmişlerdir (61).

Çevresel sigara dumanına maruz kalan sıçanların vokal kordlarının incelendiği bir çalışmada epitel tabakasının kalınlaştığını ve düzensizleştiğini bulunmuş ayrıca, dezmozomların kaybı nedeniyle hücreler arası boşlukların daha geniş olduğunu da belirtmişlerdir (63). Benzer bir çalışmada sigara dumanına maruz bırakılarak büyütülen sıçanların larenkslerinde inflamatuvar lezyonlar saptanmış, ancak kanserli lezyonlar tespit edilmemiştir (64). Maruziyetin infraglottik larenksteki ve glottik bölgede lokalize inflamatuvar yanıt oluşturulduğu gösterilmiştir (65). Aynı şekilde, başka bir çalışma uzun süreli sigara dumanına maruziyetin östaki tüpünü ve orta kulak mukozasını doğrudan etkilediğini göstermiştir (66). Bizim verilerimize göre de sigara dumanına maruz bırakılan mukozada mononükleer hücre infiltrasyonu anlamlı derecede artmıştır.

Larenksteki histolojik değişikliklerin ciddiyetinin içilen sigara sayısı ile ilişkili olduğu gösterildiğinden, vokal kord dokusundaki değişiklikleri ortaya çıkarmak için maruz kalma süresi veya sıklığı önemlidir (67). Epitel kalınlığında bir artış veya hiperplazi, larenksin sigara dumanına maruz kalan epitelinde meydana gelen patolojik değişikliktir (68,69). Bunun dışında maruziyetle oluşan yalancı çok katlı epitelin

skuamöz metaplazisi ve epiglot tabanında kadar ulaşan yaygın skuamöz hiperplazi bildirilmiştir (9). Bu lezyonlar larenks ve vokal kordun malign epiteli için bir öncü olabilir (70).

Yapılan bir çalışmada 25, 50 ve 75 günlük maruziyetten sonra vokal kord epitelinde hiperplazi tespit edildi. 50 ve 75. günlerde vokal kordların orta kısmında skuamöz metaplazi tespit edilmiştir (68). Elektron mikroskobu kullanarak yapılan başka bir çalışmada vokal kordların epitel tabakasının hücrelerini çevreleyen derin oluklar izlendi ve sigara dumanına 3-4 hafta maruz kaldıktan sonra larinks ve trakeada skuamöz metaplazi belirlenmiştir (71). Diğer bir çalışmada altı hafta sigara dumanına maruz kaldıktan sıçanların larenkslerinde skuamöz metaplazi bulunmuştur (72). Sıçanların 14 hafta boyunca haftada üç kez günde 6 saat sigara dumanına maruz bırakıldığı bir araştırmada solunum epitelinde neden olduğu tahribat deneysel olarak gösterilmiş ve önemli skuamöz metaplazi alanlarını izlenmiştir (73). Çalışmamızda 30 gün boyunca günde iki saat sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda anlamlı şekilde skuamöz metaplazi izlenmiştir. Bunun dışında mukozal iltihabi hücre infiltrasyonu, nötrofil infiltrasyonu ve epitelyal hiperplazi izlenmiştir.

Çevresel sigara dumanının deney hayvanları üzerindeki etkileri çeşitli hayvan modellerinde geliştirilmiştir. Çoğu çalışmada sigara içenlerin hava yolları için bahsettiği histopatolojik belirtiler hiperplazi ve hipertrofidir. Bu değişiklikler, kronik maruziyete maruz kaldığında hava yolunun adaptif bir yanıtı olarak yorumlanabilir. Bu nedenle, daha kalın bir mukus tabakasının varlığı, tahriş edici ajanların solunum epiteline geçişine karşı koruma sağlayacaktır (74). Larinks, sigara dumanına maruz kaldıktan sonra histopatolojik değişikliklere en duyarlı organlardan biri olarak kabul edilir (9).

PRG 4 geninin bir ürünü olan lubricin, sinoviyositler ve yüzeysel bölge kondrositleri tarafından üretilir (10). Lubricin, eklem kıkırdağı için kritik bir eklem kayganlaştırıcı olarak işlev gören ve normalde sinovyal sıvıdan izole edilen bir glikoproteindir (11). Yapılan çalışmalarda lubricin maddesinin immünohistokimyasal olarak tendon, menisküs, bağ, kas, deri ve intervertebral diskte olduğu belirlenmiştir

(12). Bu molekül kırıldak aşınmasını ve sinovyal hücre yapışmasını ve proliferasyonunu önlemede önemli bir koruyucu role sahip olduğu kabul edilmektedir (10).

Kamptodaktili-artropati-coxa vara-perikarditi olan hastalarda PRG4'ün eksprese edilemediği ve buna bağlı erken başlangıçlı poliartropati geliştiği gözlemlenmiştir (75,76). Bunun yanında çalışmalar, osteoartritli hastalarda sinoviyal sıvının kayganlıkta yetersiz olduğu ve bu eklem kayganlığının eksojen rekombinant lubricin ilavesiyle geri yüklenebileceğini ortaya koymuştur (77). Lubricin takviyesi, klinik uygulaması için yapılan araştırmalarla birlikte insanlarda yeni bir osteoartrit tedavisi olarak önerilmiştir (78).

Lubricinin oküler yüzey epitel hücreleri tarafından transkribe edildiği, translasyon ve eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca lubricin eksikliğinin kornea hasarını artırdığını ve kayganlaştırma varlığının kornea ile konjonktiva arasındaki sürtünmeyi önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir. Bu sonuçlar, lubricinin oküler yüzeydeki kayma gerilimini azaltmak için doğal bir kayganlaştırıcı olarak işlev gördüğünü göstermektedir (79).

Lubricinin anti inflamatuvar ve sepsisin olası biyobelirteci olarak bakılan çalışmalarda belirgin bir sepsis biyobelirteci olan IL-6'nın protein seviyelerini ve gen ekspresyonunu etkili bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir (80).

PRG 4, incelenen altı memelinin gerçek vocal kordunun lamina propriasında izlenmiştir ve insanlarda da mevcut olduğu ifade edilmiştir. Gerçek vocal kordun lamina propriası boyunca, kan damarlarının çevresinde, vokal proçesin elastik ucunda, bazı laringeal bağlarda ve bazı vokal kıvrımların yüzeyinde (özellikle köpeklerde) fibröz proteinlerle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Lubricinin kayganlaştırıcı olarak etki ettiği, fonlama ile ilişkili hasarı sınırladığı ve vokal kord içindeki iç sürtünmeyi (viskoziteyi) azaltarak vokal verimi arttırdığı düşünülmektedir (13).

Çalışmamızda lubricin maddesinin larenkste literature uygun şekilde immünohistokimyasal olarak boyandığını tespit ettik. Deneysel çalışmada her iki grupta da perikondriyal iğsi hücrelerde en yaygın ve en yoğun boyanma olduğunu belirledik.

Bunu dışında vokal ligament, subepitelyal fibroblastik hücreler, kondrositler, damar endoteli ve çizgili kas hücrelerinde de boyanma gördük.

Literatürde henüz benzeri olmayan bu çalışmada sigaraya maruziyetin vokal kord ve larenksteki lubricin maddesini nasıl etkilediğini belirlemeye çalıştık.

Deney ve kontrol grubundaki boyanma yaygınlığı ve yoğunluğunu karşılaştırmak amacıyla belirlediğimiz kriterlere göre, sigaraya maruz kalan deney grubunda lubricinin boyanma yaygınlığının anlamlı olarak değişmediğini gördük. Ancak maruziyetin lubricin ile boyanma yoğunluğunu azalttığını gözlemledik.

Deney grubu içerisinde artmış epitelyal skuamöz metaplazi gözlenen deneklerde aynı zamanda lubricin boyanma yoğunluğunun rastlantısal olarak azalmış olduğunu belirledik. Bu sonuç bize vokal kordlarda kayganlık ve koruyucu rol üstlendiğini düşündüğümüz lubricin maddesinin yoğunluğunun prekanseröz lezyonları engellemek açısından önemli olabileceğini düşündürmektedir. İleriki dönemde prekanseröz lezyonları engellemek için lubricin takviyesinin kullanılabilabileceğini öngörmekteyiz.

6. SONUÇ

Çalışmamızda vokal kord epitelinde mukozal mononükleer hücre infiltrasyonu, nötrofil infiltrasyonu, hiperplazi ve skuamöz metaplazi görülme durumu histopatolojik olarak, lubricinin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu immünohistokimyasal olarak araştırıldı. Elde edilen bulgular çerçevesinde mukozal mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ($p<0,05$), kord epitelindeki skuamöz metaplazi ($p<0,05$) ve lubricin maddesinin boyanma yoğunluğu ($p<0,05$) deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

Vokal kord üzerinde sigara dumanı ile azalan boyanma yoğunluğuna bağlı olarak lubricin/proteoglikan -4 düzeyleri, ileri aşamalardaki çalışmalarda bu biyokimyasal yapının düzeyini arttırmanın vokal kordun benign, premalign lezyonlarını ve maligniteyi azaltıcı yönde uygulamaların olabileceği öngörmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Global tobacco report 2019 [Internet]. [a.yer 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/access-to-assistive-technology-medical-devices/health-promotion>.
2. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspectives*. Aralık 1985;64:111-26.
3. Europe WHORO for. Air quality guidelines for Europe, second edition [Internet]. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2000 [a.yer 17 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/107335>.
4. Message from Donna E. Shalala Secretary of Health and Human Services [Internet]. American Psychological Association; 2000 [a.yer 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <http://doi.apa.org/get-pe-doi.cfm?doi=10.1037/e547982006-002>.
5. Brunnemann KD, Yu L, Hoffmann D. Assessment of Carcinogenic Volatile N-Nitrosamines in Tobacco and in Mainstream and Sidestream Smoke from Cigarettes. *Cancer Res*. 01 Eylül 1977;37(9):3218-22.
6. WHO air quality guidelines for Europe, 2nd edition, 2000 (CD ROM version) [Internet]. [a.yer 12 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/pre2009/who-air-quality-guidelines-for-europe,-2nd-edition,-2000-cd-rom-version>.
7. S Franceschi, E Bidoli, R Herrero, N Muñoz. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol*. 01 Ocak 2000;36(1):106-15.
8. Gallo O, Franchi A, Chiarelli I, Porfirio B, Grande A, Simonetti L, vd. Potential Biomarkers in Predicting Progression of Epithelial Hyperplastic Lesions of the Larynx. *Acta Oto-Laryngologica*. Ocak 1997;117(sup527):30-8.
9. Haussmann H-Jürgen, Anskait E, Becker D, Kuhl P, Stinn W, Teredesai A, vd. Comparison of Fresh and Room-Aged Cigarette Sidestream Smoke in a Subchronic Inhalation Study on Rats. *Toxicol Sci*. Ocak 1998;41(1):100-16.
10. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, vd. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*. 01 Mart 2005;115(3):622-31.
11. Swann DA, Slayter HS, Silver FH. The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry*. Haziran 1981;256(11):5921-5.
12. Sun Y, Berger EJ, Zhao C, An K-N, Amadio PC, Jay G. Mapping Lubricin in Canine Musculoskeletal Tissues. *Connective Tissue Research*. Ocak 2006;47(4):215-21.
13. Kobler JB, Tynan MA, Zeitels SM, Liss AS, Gianatasio MT, Morin AA, vd. Lubricin/proteoglycan 4 detected in vocal folds of humans and five other mammals: Lubricin/PRG4 in Mammalian Larynges. *The Laryngoscope*. Temmuz 2019;129(7):E229-37.

14. Inan M, Salturk Z, Ayaz G, Ozdemir E, Kumral TL, Berkiten G, vd. Comparison of the Effects of Cigarette Smoking on Male and Female Vocal Folds. *Journal of Craniofacial Surgery*. Mayıs 2018;29(3):e322.
15. Babalık M, Topaloğlu İ, Saltürk Z, Berkiten G, Atar Y, Tutar B, vd. The Effects of Exposure to Environmental Cigarette Smoke on the Vocal Folds of Rats. *Journal of Voice*. 01 Kasım 2018;32(6):652-4.
16. Domagala-Kulawik J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *J Physiol Pharmacol*. Aralık 2008;59 Suppl 6:19-34.
17. Görek Dilektaşlı A. Tütün dumanının içeriği ve farmakokinetiği. 2012 [a.yer 17 Mayıs 2021]; Erişim adresi: <https://avesis.uludag.edu.tr/yayin/cbe61a8d-0596-492f-a89b-294306a59ff7/tutun-dumaninin-icerigi-ve-farmakokinetigi>.
18. Kocyigit A, Selek S, Celik H, Dikilitas M. Mononuclear leukocyte DNA damage and oxidative stress: the association with smoking of hand-rolled and filter-cigarettes. *Mutat Res*. 03 Nisan 2011;721(2):136-41.
19. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clin Pharmacol Ther*. Mart 2005;77(3):145-58.
20. Health Effects of Exposure to Environmental Tobacco Smoke | Division of Cancer Control and Population Sciences (DCCPS) [İnternet]. [a.yer 17 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://cancercontrol.cancer.gov/brp/tcrb/monographs/monograph-10>.
21. WHO | The tobacco atlas (first edition, 2002) [İnternet]. WHO. World Health Organization; [a.yer 17 Mayıs 2021]. Erişim adresi: https://www.who.int/tobacco/resources/publications/tobacco_atlas/en/.
22. Kaufman N, Yach D. Tobacco control--challenges and prospects. *Bull World Health Organ*. 2000;78(7):867.
23. Warren CW, Riley L, Asma S, Eriksen MP, Green L, Blanton C, vd. Tobacco use by youth: a surveillance report from the Global Youth Tobacco Survey project. *Bull World Health Organ*. 2000;78(7):868-76.
24. Office of the Surgeon General (US), Office on Smoking and Health (US). *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General* [İnternet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2004 [a.yer 17 Mayıs 2021]. (Reports of the Surgeon General). Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44695/>.
25. Saraçoğlu S, Öztürk F. Türkiye’de Tütün Kontrol Politikaları ve Tütün Tüketimi Üzerine Bir Değerlendirme. *Politik Ekonomik Kuram*. 25 Haziran 2020;4(1):20-44.
26. Bilir N, Çak B, Da E, Ergüder T, Önder Z. Türkiye’de Tütün Kontrolü Politikaları. :98.
27. 2018-2023 Tütün Kontrolü Strateji Belgesi ve Eylem Planı [İnternet]. [a.yer 17 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bagimliliklamucadele-haberler/2018-2023-t%C3%BCt%C3%BCn-kontrol%C3%BC-strateji-belgesi-ve-eylem-plan%C4%B1.html>.

28. Battal S, Güneş G, Açık Y. Elazığ Merkez Bölgesinde Kadınların Çevresel Sigara Dumanına Maruziyeti ve Bu Konudaki Bilgi ve Tutumları. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*. 01 Haziran 2009;16(3):149-56.
29. Çimen A. *Larenks anatomisi. Anatomi, Uludağ Üniversitesi basımevi, Bursa, 1995; Beşinci baskı: 332-6.*
30. Hızalan İ. *Larenks Kanseri. Anatomik özellikler ve klinik gidis. Engin K, Erisen L, editörler. Bas-Boyun Kanseri 'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003. p. 345-52.*
31. *Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Toronto: Mosby Inc; 2004.*
32. Mills SE, Fechner ER. *Larynx and Pharynx. In Sternberg SS, editor. Histology for Pathologists. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven; 1997. p. 391-403.*
33. *Gnepp DR. Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000.*
34. Kirchner JA, Carter D. *Pathology of the Larynx. In: Mills SE, Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter V, Stoler MH, editors. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1007-31.*
35. *Sasaki CT, Driscoll BP, Gracco C. Larenks anatomisi ve fizyolojisi. In Ballenger JJ, Snow JB, editors. Senocak D, çeviri editörü. Otorinolaringoloji bas ve boyun cerrahisi. 16. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000. p. 422-37.*
36. *Kaya S. Larenks Hastalıkları. İzmir: Bilimsel tıp yayınevi; 2002.*
37. *Weir N. Anatomy of the Larynx and Tracheobronchial tree. In: Alan GK, Michael G, editor. Scott-Brown's Otolaryngology. Vol 1, 6th ed. London: Butterworth-Heinemann Int; 1997. p. 12/1-27.*
38. *Janfaza P, Nadol J, Galla JR, Faban LR, Montgomery WW, editors. Cansız H, çev. ed. Bas ve Boyunun Cerrahi Anatomisi. İstanbul: Nobel Kitabevleri; 2002.*
39. Smith G. Structure of the normal rat larynx. *Laboratory Animals* 1977; 11:223-8.
40. Lewis DJ, Prentice DE. The ultrastructure of rat laryngeal epithelia. *J Anat* 1980; 130:617- 32.
41. Swann DA, Silver FH, Slayter HS, Stafford W, Shore E. The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochemical Journal*. 01 Ocak 1985;225(1):195-201.
42. Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol*. Mart 2000;27(3):594-600.
43. Ikegawa S, Sano M, Koshizuka Y, Nakamura Y. Isolation, characterization and mapping of the mouse and human PRG4 (proteoglycan 4) genes. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;90(3-4):291-7.
44. Su JL, Schumacher BL, Lindley KM, Soloveychik V, Burkhardt W, Triantafillou JA, vd. Detection of superficial zone protein in human and animal body fluids by cross-species monoclonal antibodies specific to superficial zone protein. *Hybridoma*. Haziran 2001;20(3):149-57.

45. Liu YJ, Lu SH, Xu B, Yang RC, Ren Q, Liu B, vd. Hemangiopoietin, a novel human growth factor for the primitive cells of both hematopoietic and endothelial cell lineages. *Blood*. 15 Haziran 2004;103(12):4449-56.
46. Swann DA, Hendren RB, Radin EL, Sotman SL, Duda EA. The lubricating activity of synovial fluid glycoproteins. *Arthritis Rheum*. Ocak 1981;24(1):22-30.
47. Jay GD, Haberstroh K, Cha CJ. Comparison of the boundary-lubricating ability of bovine synovial fluid, lubricin, and Healon. *J Biomed Mater Res*. 05 Haziran 1998;40(3):414-8.
48. Merberg, D.M., Fitz, L.J., Temple, P., Giannotti, J., Murtha, P., Fitzgerald, M., Scaltreto, H., Kelleher, K., Preissner, K., Kriz, R., Jacobs, K., and Turner, K.A. (1993). "Comparison of vitronectin and megakaryocyte stimulating factor." In *Biology of Vitronectins and Their Receptors*, K.T. Preissner, S. Rosenblatt, C. Kost, J. Wegerhoff, and D.F. Mosher (eds.), pp. 45–52 (Elsevier Science, Amsterdam).
49. Zheng H, Liu Y, Huang T, Fang Z, Li G, He S. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. *Toxicology Letters*. Eylül 2009;189(3):225-34.
50. *Piccirillo JF, Vlahiotis A. Prognostigram. İçinde: Prognosis in Head and Neck Cancer. CRC Press; 2006.*
51. *Jong MBF and RJB de. OncologIQ. İçinde: Prognosis in Head and Neck Cancer. CRC Press; 2006.*
52. Schick S, Glantz SA. Sidestream cigarette smoke toxicity increases with aging and exposure duration. *Tobacco Control*. 01 Aralık 2006;15(6):424-9.
53. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health*. Şubat 2011;8(2):613-28.
54. Dube MF, Green CR. Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Advances in Tobacco Science*. 1982;
55. Xibib S, Meilan H, Moller H, Evans HS, Dixin D, Wenjie D, vd. Risk factors for oesophageal cancer in Linzhou, China: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*. Haziran 2003;4(2):119-24.
56. Islami F, Kamangar F, Nasrollahzadeh D, Aghcheli K, Sotoudeh M, Abedi-Ardekani B, vd. Socio-economic status and oesophageal cancer: results from a population-based case-control study in a high-risk area. *International Journal of Epidemiology*. Ağustos 2009;38(4):978-88.
57. Mao W-M, Zheng W-H, Ling Z-Q. Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(10):2461-6.
58. Brown LM, Hoover R, Silverman D, Baris D, Hayes R, Swanson GM, vd. Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am J Epidemiol*. 15 Ocak 2001;153(2):114-22.
59. Berry CL. *Atlas of experimental toxicological pathology*. C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis. MTP Press, Lancaster, 1988. No. of pages: 175. Price: £75.00. ISBN: 0 85200 332 3. *J Pathol*. Ağustos 1988;155(4):358-358.

60. Lewis D. Morphological assessment of pathological changes within the rat larynx. Toxicologic pathology. 01 Şubat 1991;19:352-7.
61. Balansky R, Ganchev G, Ilcheva M, Steele VE, D'Agostini F, De Flora S. Potent carcinogenicity of cigarette smoke in mice exposed early in life. Carcinogenesis. Ekim 2007;28(10):2236-43.
62. Dalbey WE, Nettesheim P, Griesemer R, Caton JE, Guerin MR. Chronic inhalation of cigarette smoke by F344 rats. J Natl Cancer Inst. Şubat 1980;64(2):383-90.
63. Işık ACU, Kalender Y, Yardimci S, Ergün A. Environmental tobacco smoke in rats. J Otolaryngol. Aralık 2004;33(6):382-6.
64. Zaquia Leão H, Galleano Zettler C, Cambruzzi E, Lammers M, Rigon da Luz Soster P, Bastos de Mello F, vd. The Effects of Passive Smoking on Laryngeal and Tracheal Mucosa in Male Wistar Rats During Growth: An Experimental Study. Journal of Voice. Ocak 2017;31(1):126.e19-126.e24.
65. Jecker P, Ptok M, Pabst R, Westermann J. Age dependency of the composition of immunocompetent cells and the expression of adhesion molecules in rat laryngeal mucosa. Laryngoscope. Haziran 1996;106(6):733-8.
66. Kong S-K, Chon K-M, Goh E-K, Lee I-W, Lee J-W, Wang S-G. Histologic changes in the auditory tube mucosa of rats after long-term exposure to cigarette smoke. Am J Otolaryngol. Aralık 2009;30(6):376-82.
67. Marcotullio D, Magliulo G, Pezone T. Reinke's edema and risk factors: clinical and histopathologic aspects. Am J Otolaryngol. Nisan 2002;23(2):81-4.
68. Duarte JL, de Faria FAC, Ceolin DS, Cestari TM, de Assis GF. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. Braz J Otorhinolaryngol. Nisan 2006;72(2):210-6.
69. de Oliveira Semenzati G, de Souza Salgado B, Rocha NS, Michelin Matheus SM, de Carvalho LR, Garcia Martins RH. Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx of rats exposed to cigarette smoke. Inhal Toxicol. Eylül 2012;24(11):723-31.
70. Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. Ann Otol Rhinol Laryngol. Ocak 2008;117(1):74-9.
71. Martins RHG, Goncalves TM, Madeira SL, Dias NH, de Oliveira Semenzati G. Scanning Electron Microscopy of the Tongue, Pharynx, and Larynx of Rats Exposed to Cigarette Smoke. Journal of Voice. Mayıs 2014;28(3):287-90.
72. Meade PD, Yamashiro S, Harada T, Basrur PK. Influence of vitamin A on the laryngeal response of hamsters exposed to cigarette smoke. Prog Exp Tumor Res. 1979;24:320-9.
73. Bolton SJ, Pinnion K, Oreffo V, Foster M, Pinkerton KE. Characterisation of the proximal airway squamous metaplasia induced by chronic tobacco smoke exposure in spontaneously hypertensive rats. Respir Res. 24 Kasım 2009;10:118.
74. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohlnikoff M, Pereira PM, Conceição GMS, vd. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. Braz J Med Biol Res. Ekim 1997;30(10):1241-7.

75. Marcelino J, Carpten JD, Suwairi WM, Gutierrez OM, Schwartz S, Robbins C, vd. CACP, encoding a secreted proteoglycan, is mutated in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *nature genetics*. 1999;23:4.
76. Bahabri SA, Suwairi WM, Laxer RM, Polinkovsky A, Dalaan AA, Warman ML. The camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome: Clinical features and genetic mapping to human chromosome 1. *Arthritis & Rheumatism*. 1998;41(4):730-5.
77. Ludwig TE, McAllister JR, Lun V, Wiley JP, Schmidt TA. Diminished cartilage-lubricating ability of human osteoarthritic synovial fluid deficient in proteoglycan 4: Restoration through proteoglycan 4 supplementation. *Arthritis & Rheumatism*. Aralık 2012;64(12):3963-71.
78. Reesink HL, Watts AE, Mohammed HO, Jay GD, Nixon AJ. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. Ocak 2017;25(1):128-37.
79. Schmidt TA, Sullivan DA, Knop E, Richards SM, Knop N, Liu S, vd. Transcription, Translation, and Function of Lubricin, a Boundary Lubricant, at the Ocular Surface. *JAMA Ophthalmol*. 01 Haziran 2013;131(6):766.
80. Richendrfer H, Jay GD. Lubricin as a Therapeutic and Potential Biomarker in Sepsis. *Critical Care Clinics*. Ocak 2020;36(1):55-67.