

DISERTASI

**PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE* TERHADAP
INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA
LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS**



Adelien

04013682025004

PROGRAM STUDI SAINS BIOMEDIS

PROGRAM DOKTOR

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS SRIWIJAYA

2025

DISERTASI

**PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE* TERHADAP
INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA
LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS**



Adelien

04013682025004

**PROGRAM STUDI SAINS BIOMEDIS
PROGRAM DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2025**

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE* TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS

LAPORAN AKHIR DISERTASI

Diajukan Untuk Melengkapi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Doktor Ilmu Biomedis

Oleh:

ADELIEN
04013682025004

Palembang, 16 Juli 2025

Promotor

Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, MPd.Ked
NIP 197306131999031001

Kopromotor I

Prof. dr. Hardi Darmawan, MPH&TM, FRSTM, AIF.M
NIP 194711241973071001

Kopromotor II

dr. Agus Surono, Sp.T.H.T.B.K.L, Subsp. BE(K), M.Sc, Ph.D.
NIP 196808242002121001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya



Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 196609291996011001

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya Tulis Ilmiah berupa Laporan Disertasi dengan judul “**PENGARUH PAPARAN ARTIFICIAL GASTRIC JUICE TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS**” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Program Studi Sains Biomedis Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya pada 16 Juli 2025.

Palembang, 16 Juli 2025

Ketua:

Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 196609291996011001

Anggota:

Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, MPd.Ked
NIP 197306131999031001

Prof. dr. Hardi Darmawan, MPH&TM, FRSTM, AIF.M
NIP 194711241973071001

dr. Agus Surono, Sp.T.H.T.B.K.L, Subsp. BE(K), M.Sc, Ph.D
NIP 196808242002121001

Prof. dr. Krisna Murti, Sp.PA, Subsp. H.L.E(K), M.Biotech.Stud, Ph.D
NIP 195301301978051001

Dr. dr. Debby Handayati Harahap, M.Kes
NIP 198312282015042001

Dr. dr. Elvie Zulka Kautzia Rachmawati, Sp.T.H.T.B.K.L, Subsp.BE(K)
NIP 196808242002121001

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)



Dekan Fakultas Kedokteran

Prof. Dr. dr. H. Muhammad Irsan Saleh, M.Biomed
NIP 196609291996011001

Plt. Wakil Dekan Bidang Akademik

Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, M.Pd. Ked
NIP 197306131999031001

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adelién

NIM : 04013682025004

Judul : PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE*
TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN
MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS

Menyatakan bahwa Disertasi saya merupakan hasil karya sendiri yang didampingi oleh tim pembimbing dan bukan merupakan hasil penjiplakan/plagiasi. Apabila ditemukan unsur penjiplakan/plagiasi dalam Disertasi ini, saya bersedia menerima sanksi akademis sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Sriwijaya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan tanpa ada paksaan dari pihak manapun.



Palembang, Juli 2025



Adelién

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kepada Tuhan yang Maha Kuasa sehingga disertasi berjudul “PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE* TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS” dapat diselesaikan. Disertasi ini disusun untuk melengkapi salah satu syarat guna memperoleh gelar doktor pada Program Studi Sains Biomedis Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.

Terlepas dari berbagai kendala yang dialami Penulis selama penulisan, disertasi ini dapat diselesaikan secara tepat waktu dengan hasil yang memuaskan. Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah mendukung tercapainya penelitian dengan hasil yang memuaskan.

Peneliti secara khusus ingin menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, Subsp.APK(K), M.Pd.Ked., Prof. dr. Hardi Darmawan, MPH&TM, FRSTM, AIF.M, dan dr. Agus Surono, Sp.T.H.T.B.K.L, Subsp.BE(K), M.Sc., Ph.D. atas bimbingan dan masukan yang diberikan selama penulisan disertasi ini. Penulis juga ingin menyampaikan terima kasih kepada Prof. dr. Krisna Murti, Sp.PA, Subsp.HLE(K), M.Biotech.Stud., Ph.D., Dr. dr. Debby Handayati Harahap, M.Kes., dan Dr. dr. Elvie Zulka Kautzia Rachmawati, Sp.T.H.T.B.K.L., Subsp.BE(K) atas masukan yang diberikan selama penulisan disertasi ini. Peneliti tak lupa ingin menghaturkan ucapan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah mendukung penulisan disertasi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Peneliti berharap bahwa disertasi ini dapat memberikan sekelumit sumbangsih untuk pengembangan ilmu pengetahuan. Akhirnya, Peneliti sangat mengharapkan saran dan kritik yang mendukung perbaikan di masa mendatang.

Palembang, Juli 2025

Adelien

ABSTRAK

PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE* TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS

Refluks laring faring merupakan refluks isi gaster dan duodenum ke regio laring dan faring serta menyebabkan perubahan terkait inflamasi pada regio tersebut. Sejauh ini belum terdapat model hewan yang diterima secara universal untuk memodelkan refluks laring faring. Penelitian ini bertujuan untuk menciptakan suatu model hewan tikus untuk penelitian terkait refluks laring faring sekaligus membuktikan peran refluks laring faring terhadap perbedaan ekspresi IL-6, MUC5AC, dan β -catenin pada regio tersebut. Penelitian ini memaparkan pepsin asam sebanyak 0,1-0,2 mL tiga kali sehari selama 5-15 hari secara langsung pada regio laring dan faring. Selanjutnya hewan menjalani *sacrifice* dan menjalani pemeriksaan ELISA untuk mengukur ekspresi IL-6 jaringan. Ekspresi MUC5AC dan β -catenin jaringan dilakukan dengan imunohistokimia. Penelitian ini menemukan bahwa model hewan yang dikembangkan dalam penelitian ini *feasible* untuk dilakukan. Ekspresi IL-6 laring bersifat *time-* dan *dose-dependent* sementara ekspresi IL-6 hipofaring bersifat *dose-dependent*. Ekspresi MUC5AC laring bersifat *dose-dependent*. Ekspresi β -catenin hipofaring bersifat *dose-dependent*. Penelitian ini menemukan bahwa terdapat hubungan positif antara ekspresi IL-6 dan ekspresi β -catenin dan hubungan positif antara ekspresi MUC5AC dengan ekspresi IL-6. Penelitian ini juga menemukan bahwa terdapat kompensasi pada jaringan laring dan faring terhadap pajanan pepsin asam dengan dosis dan waktu yang diberikan dalam perlakuan ini.

Kata kunci: refluks laring faring, model tikus, IL-6, β -catenin, MUC5AC

ABSTRACT

INFLAMMATORY AND MUCOSAL CHANGES OF RAT LARYNGEAL AND HYPOPHARYNGEAL REGION AFTER ARTIFICIAL GASTRIC JUICE EXPOSURE

Laryngopharyngeal reflux is a condition of gastroduodenal refluxate exposure to laryngopharyngeal region, resulting in inflammatory-related changes in these region. Up to this point there is no universally-accepted animal model of laryngopharyngeal reflux. This study aimed to create rat model of laryngopharyngeal reflux in addition to provide evidence of laryngopharyngeal reflux-related changes on the expression of IL-6, MUC5AC, and β -catenin in mentioned regions. This study directly exposed rat laryngopharyngeal region to artificial gastric juice, 0.1-0.2 mL three times per day for 5-15 days. Rat model underwent sacrifice and tissue IL-6 expression was measured through ELISA. Tissue expression of both MUC5AC and β -catenin was measured through immunohistochemical study. This study proved the feasibility of the animal model. Expression of laryngeal IL-6 was found to be both time- and dose-dependent while hypopharyngeal IL-6 expression was mainly dose-dependent. Expression of laryngeal MUC5AC was mainly dose-dependent. Expression of hypopharyngeal β -catenin was mainly dose-dependent. This study discovered positive correlation between IL-6 and β -catenin expressions and positive correlation between MUC5AC and IL-6 expressions. In addition, this study also discovered compensatory mechanism in the laryngopharyngeal region as the result of exposure of the artificial gastric juice in this study.

Keywords: *laryngopharyngeal reflux, rat model, IL-6, β -catenin, MUC5AC*

RINGKASAN

PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE* TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS

Karya tulis ilmiah berupa Disertasi, Juli 2025

Adelien, dibimbing oleh Prof. Dr. dr. Irfannuddin, Sp.KO, Subsp.APK(K), M.Pd.Ked., Prof. dr. Hardi Darmawan MPH&TM, FRSTM, AIF.M, dan dr. Agus Surono, Sp.T.H.T.B.K.L, Subsp.BE(K), M.Sc., Ph.D.

Program Studi Sains Biomedis Program Doktor, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

xviii + 168 halaman, 22 tabel, 31 gambar, 9 lampiran

Refluks laring faring merupakan refluks isi gaster dan duodenum ke regio laring dan faring serta menyebabkan perubahan terkait inflamasi pada regio tersebut. Perubahan pada refluks laring faring diketahui melibatkan peran IL-6, MUC5AC, dan β -catenin. Penelitian terkait refluks laring faring masih terkendala oleh tidak adanya model hewan yang diterima secara universal untuk memodelkan refluks laring faring. Penelitian ini bertujuan untuk menciptakan suatu model hewan tikus untuk penelitian terkait refluks laring faring sekaligus membuktikan peran refluks laring faring terhadap perbedaan ekspresi IL-6, MUC5AC, dan β -catenin pada regio tersebut.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* melalui pemajanan pepsin asam sebanyak 0,1 mL, 0,15 mL, dan 0,2 mL tiga kali sehari selama 5 hari, 10 hari, dan 15 hari secara langsung pada regio laring dan faring. Selanjutnya hewan menjalani *sacrifice* dan menjalani pemeriksaan ELISA untuk mengukur ekspresi IL-6 laring dan hipofaring. Ekspresi MUC5AC dan β -catenin jaringan laring dan hipofaring dilakukan dengan imunohistokimia. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hewan dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran

Universitas Sriwijaya serta Laboratorium Patologi Anatomi Barokah Palembang antara bulan Januari hingga Mei 2025.

Penelitian ini menemukan bahwa model hewan yang dikembangkan dalam penelitian ini *feasible* untuk dilakukan. Ekspresi IL-6 laring bersifat *time-* dan *dose-dependent* sementara ekspresi IL-6 hipofaring bersifat *dose-dependent*. Ekspresi MUC5AC laring bersifat *dose-dependent*. Ekspresi β -catenin hipofaring bersifat *dose-dependent*. Penelitian ini menemukan bahwa terdapat hubungan positif antara ekspresi IL-6 dan ekspresi β -catenin dan hubungan positif antara ekspresi MUC5AC dengan ekspresi IL-6. Penelitian ini juga menemukan bahwa terdapat kompensasi pada jaringan laring dan faring terhadap pajanan pepsin asam dengan dosis dan waktu yang diberikan dalam perlakuan ini. Penelitian ini tidak menemukan hubungan antara ekspresi β -catenin dengan MUC5AC pada jaringan.

Kata kunci: refluks laring faring, model tikus, IL-6, β -catenin, MUC5AC

SUMMARY

INFLAMMATORY AND MUCOSAL CHANGES OF RAT LARYNGEAL AND HYPOPHARYNGEAL REGION AFTER ARTIFICIAL GASTRIC JUICE EXPOSURE

Scientific paper in the form of Dissertation, July 2025

Adelien, supervised by Irfannuddin, M.D., Ph.D., M.Med.Ed. (consultant sports medicine and professor in physiology), Hardi Darmawan, M.D., MPH&TM, FRSTM, AIF.M (professor in physiology), and Agus Surono, M.D., Ph.D., M.sc. (consultant in bronchoesophagology, otorhinolaryngology surgeon)

*Doctorate in Biomedical Science, Faculty of Medicine, Sriwijaya University
xviii + 168 pages, 22 tables, 31 figures, 9 supplements*

Laryngopharyngeal reflux is an exposure of gastroduodenal refluxate to laryngopharyngeal region, resulting in inflammatory-related changes in these regions. Laryngopharyngeal changes are related to tissue IL-6, MUC5AC, and β -catenin. Studies of laryngopharyngeal reflux is limited due to paucity of suitable and universally-accepted animal model for laryngopharyngeal reflux. This study aimed to create rat model for laryngopharyngeal reflux, in addition to provide evidence of differences in IL-6, MUC5AC, and β -catenin expression as the result of laryngopharyngeal reflux.

This study was performed as in vivo experimental study. Laryngopharyngeal regions of the rats were directly exposed to artificial gastric juice (0.1 mL, 0.15 mL, dan 0.2 mL) three times per day for 5, 10, and 15 days. Animal models then underwent sacrifice. Expression of laryngeal and hypopharyngeal IL-6 were measured through ELISA. Expression of both laryngeal and hypopharyngeal MUC5AC and β -catenin were measured through immunohistochemical studies. This study was performed in Animal House, Faculty of Medicine, Sriwijaya University and Biotechnology Laboratory, Faculty of Medicine, Sriwijaya

University, in addition to Barokah Anatomical Pathology Laboratory, Palembang during the course of January to May, 2025.

This study proved the feasibility of the animal model. Expression of laryngeal IL-6 was found to be both time- and dose-dependent while hypopharyngeal IL-6 expression was mainly dose-dependent. Expression of laryngeal MUC5AC was mainly dose-dependent. Expression of hypopharyngeal β -catenin was mainly dose-dependent. This study discovered positive correlation between IL-6 and β -catenin expressions and positive correlation between MUC5AC and IL-6 expressions. In addition, this study also discovered compensatory mechanism in the laryngopharyngeal region as the result of exposure of the artificial gastric juice in this study. This study did not find any correlation between β -catenin and MUC5AC expressions.

Keywords: *laryngopharyngeal reflux, rat model, IL-6, β -catenin, MUC5AC*

HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adelen

NIM : 04013682025004

Judul : PENGARUH PAPARAN *ARTIFICIAL GASTRIC JUICE*
TERHADAP INDIKATOR INFLAMASI DAN PERUBAHAN
MUKOSA PADA LARING DAN HIPOFARING MODEL TIKUS

Memberikan izin kepada pihak Promotor/Ko-promotor dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya untuk kepentingan akademik apabila dalam kurun waktu satu tahun tidak mempublikasikan karya penelitian saya. Dalam kondisi tersebut, saya setuju untuk menempatkan Promotor sebagai penulis korespondensi (*corresponding author*).

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan tanpa ada paksaan dari pihak manapun.

Palembang, Juli 2025

Adelen

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
RINGKASAN	viii
<i>SUMMARY</i>.....	x
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. LATAR BELAKANG.....	1
1.2. RUMUSAN MASALAH	5
1.3. HIPOTESIS PENELITIAN	5
1.4. TUJUAN PENELITIAN	5
1.4.1. Tujuan Penelitian Umum	5
1.4.2. Tujuan Penelitian Khusus	6
1.5. MANFAAT PENELITIAN	7
1.5.1. Manfaat Akademis	7
1.5.2. Manfaat di Bidang Penelitian dan Pengembangan.....	7
1.6. KETERBARUAN PENELITIAN.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. DEFINISI REFLUKS LARING-FARING.....	9
2.2. KANDUNGAN <i>GASTRIC JUICE</i> TIKUS.....	9
2.3. PERLINDUNGAN PADA SALURAN CERNA BAGIAN ATAS	10
2.4. DAMPAK REFLUKS LARING-FARING	11
2.5. ANATOMI FARING DAN HIPOFARING MANUSIA	14
2.6. ANATOMI FARING DAN HIPOFARING TIKUS	17
2.7. INDUKSI REFLUKS LARING-FARING PADA HEWAN COBA	18
2.8. DAMPAK REFLUKS PADA HEWAN	23
2.9. PENCEGAHAN REFLUKS ISI GASTER PADA HEWAN	31
2.10. REFLUKS LARING-FARING SECARA KLINIS.....	34

2.11. KERANGKA TEORI	41
2.12. KERANGKA KONSEP	42
BAB III METODE PENELITIAN	43
3.1. DESAIN PENELITIAN	43
3.2. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN	43
3.3. SAMPEL PENELITIAN.....	43
3.4. BESAR SAMPEL PENELITIAN.....	43
3.5. KRITERIA INKLUSI	44
3.6. VARIABEL PENELITIAN.....	44
3.6.1. Variabel Bebas	44
Dalam penelitian ini, variabel bebas yang diteliti adalah:	44
3.6.2. Variabel Terikat	44
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah:	44
3.7. DEFINISI OPERASIONAL.....	45
3.8. ALAT DAN BAHAN	46
3.9. ALUR PENELITIAN	47
3.10. PROSEDUR PENELITIAN.....	48
3.10.1. Prosedur ELISA IL-6	49
3.10.2. Pemeriksaan Imunohistokimia	49
3.10.3. Kuantifikasi ImageJ	49
3.11. ANALISIS DATA.....	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	51
4.1. PELAKSANAAN PENELITIAN.....	51
4.2. DATA DASAR TIKUS.....	51
4.3. MORFOLOGI JARINGAN.....	52
4.4. EKSPRESI IL-6 JARINGAN.....	58
4.5. EKSPRESI MUC5AC JARINGAN	66
4.6. EKSPRESI β -CATENIN JARINGAN	71
4.7. HUBUNGAN ANTAR VARIABEL PENELITIAN.....	79
4.8. PEMBAHASAN	80
4.8.1. Perlakuan Hewan	80
4.8.2. Peran Pepsin Asam pada Kerusakan Mukosa	81
4.8.3. Keterbatasan Penelitian	96
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	97
5.1. SIMPULAN.....	97
5.2. SARAN	98
DAFTAR PUSTAKA	99

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Perbedaan Faring dan Laring Antara Tikus dan Manusia	18
Tabel 2 Definisi Operasional	45
Tabel 3 Tabel Perlakuan	48
Tabel 4 Berat Badan Tikus	52
Tabel 5 Gambaran Laring Tikus.....	53
Tabel 6 Gambaran Hipofaring Tikus.....	56
Tabel 7 Ekspresi IL-6 Jaringan	59
Tabel 8 Efek Hari dan Dosis pada IL-6 Laring.....	60
Tabel 9 Efek Hari dan Dosis pada IL-6 Hipofaring	61
Tabel 10 General Linear Model IL-6 Laring	63
Tabel 11 General Linear Model IL-6 Hipofaring.....	65
Tabel 12 Ekspresi MUC5AC Jaringan	66
Tabel 13 Efek Hari dan Dosis pada MUC5AC Laring.....	67
Tabel 14 Efek Hari dan Dosis pada MUC5AC Hipofaring.....	67
Tabel 15 General Linear Model MUC5AC Laring.....	69
Tabel 16 General Linear Model MUC5AC Hipofaring.....	71
Tabel 17 Ekspresi β -catenin Jaringan	72
Tabel 18 Efek Hari dan Dosis pada β -catenin Laring	73
Tabel 19 Efek Hari dan Dosis pada β -catenin Hipofaring	74
Tabel 20 General Linear Model β -catenin Laring	76
Tabel 21 General Linear Model β -catenin Hipofaring	78
Tabel 22 Korelasi Antar Variabel	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Patofisiologi <i>Gastroesophageal Reflux Disease</i>	11
Gambar 2 Perubahan Histopatologi pada Tikus Model Refluks Gastroesofageal	12
Gambar 3 Edema Laring Difus Akibat Refluks Gastroesofageal	12
Gambar 4 Epitel Normal (A) dan Terpapar Refluks Laring-faring (B)	14
Gambar 5 Regio Faring	15
Gambar 6 Hipofaring	15
Gambar 7 Histologi Faring	16
Gambar 8 Faring Rodensia	17
Gambar 9 Perubahan Epitel Mencit Pasca Paparan <i>Artificial Gastric Juice</i>	24
Gambar 10 Kerusakan Laring Pasca Paparan Pepsin	25
Gambar 11 Epitel Plika Vokalis Babi Pasca Paparan Pepsin	26
Gambar 12 Perubahan Mukosa Laring Pasca Pemasangan Stent.....	27
Gambar 13 Displasia Laring Mencit Pasca Paparan Empedu	28
Gambar 14 Aktivitas NF-kB di Mukosa Laring Mencit	29
Gambar 15 Metaplasia GMEM Babun.....	30
Gambar 16 Mukosa Hipofaring Pasca Perlakuan dengan Kurkumin	32
Gambar 17 Lesi Plika Vokalis Pasca Paparan MmuPPV1	33
Gambar 18 Regulasi Transkripsi IL-6.....	38
Gambar 19 <i>Crosstalk</i> Jaras NF-kB dan β -catenin	39
Gambar 20 <i>Dose-response Curve</i> Ekspresi IL-6 Laring	62
Gambar 21 <i>Time Series</i> Ekspresi IL-6 Laring.....	63
Gambar 22 <i>Dose-response Curve</i> Ekspresi IL-6 Hipofaring.....	64
Gambar 23 <i>Time Series</i> Ekspresi IL-6 Hipofaring	65
Gambar 24 <i>Dose-response Curve</i> Ekspresi MUC5AC Laring	68
Gambar 25 <i>Time Series</i> Ekspresi MUC5AC Laring.....	69
Gambar 26 <i>Dose-response Curve</i> Ekspresi MUC5AC Hipofaring	70
Gambar 27 <i>Time Series</i> Ekspresi MUC5AC Hipofaring.....	71
Gambar 28 <i>Dose-response Curve</i> Ekspresi β -catenin Laring	75
Gambar 29 <i>Time Series</i> Jumlah β -catenin Laring.....	76
Gambar 30 <i>Dose-response Curve</i> Ekspresi β -catenin Hipofaring	77
Gambar 31 <i>Time Series</i> Jumlah β -catenin Hipofaring	78

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Penelitian	107
Lampiran 2. Log Penelitian.....	108
Lampiran 3. Etik Penelitian	111
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian.....	112
Lampiran 5. Uji Statistik.....	114
Lampiran 6. Surat Keterangan Selesai Penelitian Laboratorium Bioteknologi..	163
Lampiran 7. Surat Keterangan Selesai Penelitian Laboratorium Hewan...	164
Lampiran 8. Surat Keterangan Selesai Penelitian Laboratorium Barokah	165
Lampiran 9. Preparat Histopatologi	166

DAFTAR SINGKATAN

Akt	: <i>protein kinase B</i>
BCS	: <i>body condition score</i>
CPAP	: <i>continuous positive airway pressure</i>
CXCL8	: <i>chemokine C-X-C motif ligand 8</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunoassay</i>
GMEM	: <i>glandulo-metaplastic esophageal mucosa</i>
IL	: <i>interleukin</i>
IPPV	: <i>intermittent positive pressure ventilation</i>
Kel.	: <i>kelompok</i>
kg	: <i>kilogram</i>
kgBB	: <i>kilogram berat badan</i>
LES	: <i>lower esophageal sphincter</i>
mEq	: <i>miliekuivalen</i>
mg	: <i>miligram</i>
MHC	: <i>major histocompatibility complex</i>
mL	: <i>mililiter</i>
MMP9	: <i>matrix metalloproteinase-9</i>
MmuPV1	: <i>Mus musculus Papillomavirus-1</i>
mRNA	: <i>messenger RNA</i>
RNA	: <i>ribonucleic acid</i>
MUC5AC	: <i>musin 5AC</i>
nCPAP	: <i>nasal CPAP</i>
NF- κ B	: <i>nuclear factor kappa light chain enhancer of B cells</i>
nIPPV	: <i>nasal intermittent positive pressure ventilation</i>
NKT	: <i>natural killer T cells</i>
nNAVA	: <i>nasal neurally-adjusted ventilatory assist</i>
nPSV	: <i>nasal pressure support ventilation</i>
NSG	: <i>NOD scid gamma</i>
OME	: <i>otitis media efusi</i>
OSA	: <i>obstructive sleep apnea</i>
PBS	: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	: <i>phosphoinositide-3-kinase</i>
PPI	: <i>proton pump inhibitors</i>
qPCR	: <i>quantitative PCR</i>
RSI	: <i>reflux symptoms indeks</i>
TNF	: <i>tumor necrosis factor</i>
U	: <i>unit</i>
μ Eq	: <i>mikroekuivalen</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Upper aerodigestive tract adalah zona di mana terjadi percampuran berbagai fungsi digestif dan respirasi. Zona ini meliputi kavum oris, kavum nasi, sinus paranasalis, faring, laring, dan esofagus bagian atas. Zona *upper aerodigestive tract* berperan penting dalam fungsi respirasi, menelan, dan berbicara. Sebagai bagian yang terekspos lingkungan luar, *upper aerodigestive tract* memiliki lapisan mukosa. Mucin dalam mukosa berperan sebagai matriks yang dapat menyimpan senyawa antimikroba di lingkungan mukosa. Selain mukosa sebagai *barrier*, terdapat sel-sel imun yang berperan dalam respons terhadap patogen dan kerusakan jaringan. Sitokin dan kemokin yang ditemukan di *upper aerodigestive tract* juga menjadi senyawa yang krusial dalam proteksi terhadap zat asing dan patogen.¹⁻³

Gastroesophageal reflux menjadi krusial dalam refluks laring-faring akibat keterkaitan antara keduanya. Dalam sebuah penelitian, diketahui bahwa terdapat peningkatan skor dari *reflux symptoms index* pada pasien dengan refluks laring-faring dan *gastroesophageal reflux* dibandingkan jika kedua penyakit tersebut berdiri sendiri. Hasil yang serupa ditemukan pada *reflux finding score*, di mana skor *reflux finding score* pada penderita refluks laring-faring yang disertai *gastroesophageal reflux* lebih tinggi dibandingkan dengan jika keduanya berdiri sendiri.⁴ Meskipun demikian, *gastroesophageal reflux* dan refluks laring-faring tidak serta-merta saling terkait. Terdapat perbedaan gejala dan patofisiologi, tetapi patofisiologi dari refluks laring-faring masih belum diketahui secara jelas, meskipun diduga bahwa pepsin dan enzim pencernaan lain terlibat. Sebagai tambahan, refluks garam empedu pada refluks laring-faring juga diketahui dapat menyebabkan timbulnya gejala-gejala refluks laring-faring.⁵

Refluks laring-faring sendiri merupakan refluks dari isi gaster dan duodenum ke area *upper aerodigestive tract* yang menyebabkan kerusakan mukosa, hipersekresi mukus, dan sekresi mediator proinflamatoris.¹⁻³ Refluks laring-faring

berbeda dari *gastroesophageal reflux disease* karena tidak menimbulkan gejala *heartburn* atau regurgitasi. Refluks yang ditemukan pada refluks laring-faring umumnya berupa refluks gas yang terjadi pada siang hari dan saat penderita berada dalam posisi tegak.² Refluks laring-faring umumnya menimbulkan gejala berupa sensasi globus, suara serak, mukosa berlebih, *postnasal drip*, laringitis dan faringitis, eritema pada laring, hipertrofi komisura posterior, dan edema laring difus.^{2,5,6} Tetapi, pada mukosa subglotis dan plika vokalis menjadi titik kerusakan terberat. Selain itu, refluks laring-faring diduga dapat memperberat penyakit asma karena adanya kandungan pepsin pada refluks.² Refluks laring-faring dapat menyebabkan munculnya granuloma, polip dan kista pada plika vokalis, batuk kering kronis akibat iritasi laring, laringitis, dan striktur dan displasia esofagus. Selain itu, diduga bahwa refluks laring-faring juga dapat memunculkan sinusitis dan otitis media kronis yang disertai efusi, meskipun bukti-bukti yang tersedia masih bersifat kontradiktif.⁶ Selain gejala-gejala tersebut, diketahui bahwa refluks laring-faring dapat menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA yang terjadi salah satunya disebabkan oleh kadar pepsin yang meningkat. Penelitian di Cina juga menemukan bahwa terjadi infiltrasi pepsin pada polip plika vokalis pada penderita refluks laring-faring, membuktikan lebih lanjut bahwa kerusakan DNA pada refluks laring-faring salah satunya disebabkan oleh pepsin.⁷

Faktor risiko refluks laring-faring dapat berupa konsumsi makanan dan minuman, gaya hidup, komorbiditas, dan gangguan struktur anatomis. Konsumsi makanan dan minuman yang mengandung alkohol, kafein, berbumbu kuat, dan tinggi lemak menjadi faktor risiko refluks laring-faring. Dari sisi gaya hidup dan komorbiditas, riwayat merokok, stres, kebiasaan untuk tidur segera sesudah makan, obesitas, diabetes, asma, *irritable bowel syndrome*, penyakit paru kronis, dan hipertensi juga menjadi faktor risiko refluks laring-faring. Spasme dan stenosis esofagus menjadi faktor risiko lain dari refluks laring-faring.⁶ Dalam sebuah studi menggunakan kultur epitel, diketahui bahwa terdapat kerusakan epitel yang berat pada pasien asma setelah dipaparkan dengan pepsin, senyawa asam, dan asam empedu. Diketahui bahwa terjadi peningkatan rongga interselular dan *detachment* dari epitel. Diketahui pula bahwa terdapat peningkatan sekresi CXCL8, IL-1 α , dan

TNF- α akibat perubahan ekspresi gen yang terkait. Temuan tersebut dikonfirmasi dengan biopsi bronkus dari pasien yang terlibat akibat kerusakan epitel yang menyebabkan perubahan permeabilitas epitel, yang menghasilkan respons serupa dengan stres oksidatif dan proses penyembuhan luka. Diduga bahwa *gastroesophageal reflux* berperan dalam meningkatkan paparan jalan napas terhadap alergen dan patogen, sehingga memperberat inflamasi dan *remodeling* yang menjadi salah satu ciri asma yang berat. Inflamasi faring dan laring akibat paparan pepsin melibatkan beberapa sitokin proinflamatoris.

Terdapat beberapa mediator yang terlibat dalam inflamasi mukosa esofagus pada refluks. Sitokin yang terlibat dapat mencakup sitokin proinflamatoris (IL-1, IL-6, IL-8), immunoregulatoris (IL-4, IL-10), *platelet-activating factors*, dan *reactive oxygen species*. Sitokin tersebut dapat bersumber dari epitel, sel mesenkim, endotel, maupun sel-sel imun pada jaringan. Sitokin-sitokin yang terlibat diketahui berperan menyebabkan gangguan fungsi motor esofagus sehingga berperan dalam perburukan *gastroesophageal reflux*.⁸ Refluks laring-faring diketahui menyebabkan perubahan ekspresi mRNA dari IL-6 akibat inflamasi mukosa. Sitokin IL-6 berperan dalam respons inflamasi dan imunitas fase akut. Musin, sebuah glikoprotein yang menjadi penyusun utama mukus, diekspresikan di epitel yang terpapar lingkungan ekstrem. Musin diketahui berperan dalam proteksi dan lubrikasi epitel. Paparan pepsin terhadap kultur epitel saluran napas diketahui meningkatkan ekspresi MUC5AC, salah satu jenis musin terlikosilasi, melalui jalur MMP9 dan NF- κ B.⁹ Penelitian lain pada model tikus menemukan bahwa terjadi ekspresi MUC5AC akibat refluks garam empedu di sel epitel esofagus manusia dengan *Barrett's esophagitis* melalui jalur PI3K/Akt.¹⁰

Jalur persinyalan *Wnt/ β -catenin* berperan penting dalam proses proliferasi sel melalui perannya sebagai faktor transkripsi utama. Diketahui bahwa *β -catenin* berperan dalam proses inflamasi dan keganasan.¹¹ Selain itu, diketahui bahwa pepsin berperan dalam transisi epitel-mesenkim pada karsinoma laring. Pepsin meningkatkan proliferasi, migrasi, dan sekresi IL-8 pada keganasan laring akibat kemampuannya untuk merusak protein pelindung dan merusak laring secara langsung. Pada inflamasi kronis di laring, seperti pada refluks laring-faring, dapat

terjadi displasia yang diperantarai pepsin. Pada inflamasi kronis, IL-8 dapat mempengaruhi jalur *Wnt/β-catenin*, sehingga memicu perkembangan keganasan laring¹² Selain itu, protein Dickkopf-1 menjadi antagonis jalur *Wnt* yang diinduksi oleh asam lambung, sehingga menyebabkan *senescence* pada epitel esofagus yang terpapar refluks.¹³

Sejauh ini, hanya tersedia sedikit model hewan untuk refluks laring-faring, di mana salah satu model yang tersedia menggunakan kelinci.¹⁴ Model penelitian lain telah dikembangkan menggunakan model *minipig* yang menjalani *stenting* pada esofagus.¹⁵ Selain kelinci dan *minipig*, terdapat model lain yang menggunakan tikus. Terkhusus untuk tikus, terdapat beberapa model yang telah menggunakan tikus sebagai model untuk refluks laring-faring, tetapi model ini berfokus pada perubahan histologis dan menggunakan prosedur untuk pembuatan model *gastroesophageal reflux*. Model ini dibuat dengan penggunaan kateter Nelaton setinggi pilorus untuk membatasi pengosongan gaster. Penelitian tersebut menemukan bahwa terdapat penebalan mukosa, infiltrasi sel radang, proliferasi fibroblas dan kolagen, dan perubahan lamina propria pada faring. Pada laring, ditemukan penebalan mukosa.¹⁶ Pembuatan model non-operatif untuk *gastroesophageal reflux* pada mencit telah dilakukan dengan cara pemberian makan berlebihan yang diselingi dengan pemuasaan. Temuan histologis pada model ini serupa dengan temuan pada *gastroesophageal reflux*.¹⁷

Pada hewan, diketahui bahwa *gastric juice* pada tikus Wistar normal mengandung $0,72 \pm 0,3$ mEq HCl dan 280 ± 155 mg pepsin dalam 24 jam.¹⁸ Penelitian lain menyebutkan bahwa, pada tikus Wistar, sekresi asam *gastric juice* mencapai 1,3 mL dan pH pada lambung tikus hampir mencapai 3,0 setelah 45 menit pasca pemberian makanan. Jumlah asam yang disekresikan sekitar 50 μ Eq, dan sekitar 60 U pepsin disekresikan dalam periode yang sama.¹⁹ Tingkat keasaman *gastric juice* pada tikus sendiri bervariasi, di mana sebuah penelitian menemukan bahwa pH lambung tikus yang dipuasakan adalah $3,90 \pm 1,0$ dan pH lambung tikus setelah diberi makan berkurang menjadi $3,20 \pm 1,0$.²⁰ Sekresi *gastric juice* juga diketahui terkait dengan usia. Pada tikus berusia 4 bulan, ditemukan bahwa sekresi pepsin kurang lebih sebanyak 1,3 mg/3 jam, kemudian meningkat menjadi kurang

lebih 1,8 mg/3 jam pada usia 14 bulan, lalu menurun menjadi kurang lebih 0,9 mg/3 jam pada usia 21 bulan.²¹ Penelitian lain menemukan bahwa terjadi penurunan sekresi asam pada *gastric juice* tikus yang lebih tua ($6,3 \pm 2,3 \mu\text{Eq}/15 \text{ menit/kgBB}$ pada tikus berusia 3 bulan, sementara pada tikus berusia 32 bulan sekresi asam hanya sebesar $1,3 \pm 0,5 \mu\text{Eq}/15 \text{ menit/kgBB}$; $p < 0,05$).²²

Dari temuan bahwa refluks laring-faring menyebabkan komorbiditas yang berat akibat inflamasi yang persisten dan disertai dengan kurangnya model tikus untuk refluks laring-faring, penelitian ini dilakukan untuk mengangkat pembuatan model refluks laring-faring menggunakan tikus sekaligus melihat perubahan ekspresi IL-6, β -catenin, dan MUC5AC pada jaringan laring dan faring dari model tersebut.

1.2. RUMUSAN MASALAH

1. Bagaimana membuat suatu model refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada hewan coba tikus?
2. Bagaimana perbedaan kadar ekspresi IL-6, β -catenin, dan MUC5AC pada regio faring dan hipofaring tikus model refluks laring-faring pasca paparan *artificial gastric juice*?

1.3. HIPOTESIS PENELITIAN

Terdapat perbedaan kadar ekspresi IL-6, β -catenin, dan MUC5AC pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring paparan *artificial gastric juice*.

1.4. TUJUAN PENELITIAN

1.4.1. Tujuan Penelitian Umum

1. Membuat suatu model refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada hewan coba tikus.
2. Menganalisis perbedaan kadar ekspresi IL-6, β -catenin, dan MUC5AC pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks

laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.

1.4.2. Tujuan Penelitian Khusus

1. Menilai *feasibility* pembuatan model refluks laring-faring pada hewan coba tikus melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
2. Menilai kadar ekspresi IL-6, β -catenin, dan MUC5AC pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
3. Menganalisis perbedaan ekspresi IL-6 pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
4. Menganalisis perbedaan ekspresi β -catenin pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
5. Menganalisis perbedaan ekspresi MUC5AC pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
6. Menganalisis hubungan ekspresi IL-6 terhadap ekspresi β -catenin pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
7. Menganalisis hubungan ekspresi β -catenin terhadap ekspresi MUC5AC pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.
8. Menganalisis hubungan ekspresi IL-6 terhadap ekspresi MUC5AC pada regio laring dan hipofaring model tikus refluks

laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice* pada dosis dan waktu yang berbeda.

1.5. MANFAAT PENELITIAN

1.5.1. Manfaat Akademis

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dari penggunaan hewan coba tikus untuk model refluks laring-faring melalui paparan *artificial gastric juice*.
2. Penelitian ini menambah data bagi model hewan coba untuk penelitian di Divisi Bronkoesofagologi, Bagian/KSM THT-BKL RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

1.5.2. Manfaat di Bidang Penelitian dan Pengembangan

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan penelitian mengenai risiko refluks laring-faring menggunakan model tikus melalui paparan *artificial gastric juice*.
2. Penelitian ini dapat digunakan untuk pengembangan penelitian mengenai terapi refluks laring-faring menggunakan model tikus melalui paparan *artificial gastric juice*.

1.5.3. Manfaat Klinis

Penelitian ini dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk melakukan terapi pada refluks laring-faring pada pasien.

1.6. KETERBARUAN PENELITIAN

Potensi kebaruan penelitian adalah dalam penggunaan model tikus untuk melihat kadar ekspresi IL-6, β -catenin, dan MUC5AC pada regio laring dan hipofaring tikus. Potensi kebaruan tersebut muncul karena beberapa faktor:

1. Peneliti belum menemukan literatur yang cukup terkait pembuatan model tikus untuk refluks laring-faring.

2. Peneliti menggunakan model tikus untuk refluks laring-faring yang telah dibuat sebelumnya untuk melihat ekspresi protein IL-6, *β -catenin*, dan MUC5AC berdasarkan pemeriksaan imunohistokimia dan ELISA untuk melihat dampak refluks laring-faring terhadap ekspresi protein tersebut pada regio laring dan hipofaring.

DAFTAR PUSTAKA

1. Perotin JM, Whewey G, Tariq K, Azim A, Ridley RA, Ward JA, et al. Vulnerability to acid reflux of the airway epithelium in severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2022 Aug;60(2):2101634.
2. Liu D, Qian T, Sun S, Jiang JJ. Laryngopharyngeal reflux and inflammatory responses in mucosal barrier dysfunction of the upper aerodigestive tract. *J Inflamm Res*. 2020;13:1291–304.
3. Lechien JR, Saussez S, Muls V, Barillari MR, Chiesa-Estomba CM, Hans S, et al. Laryngopharyngeal reflux: A state-of-the-art algorithm management for primary care physicians. Vol. 9, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2020. p. 1–18.
4. Shilpa C, Sandeep S, Chandresh S, Grampurohit A, Shetty TS. Laryngopharyngeal Reflux and GERD: Correlation Between Reflux Symptom Index and Reflux Finding Score. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*. 2019 Oct 23;71(S1):684–8.
5. Lechien JR, Saussez S, Muls V, Barillari MR, Chiesa-Estomba CM, Hans S, et al. Laryngopharyngeal Reflux: A State-of-the-Art Algorithm Management for Primary Care Physicians. *J Clin Med*. 2020 Nov 10;9(11):3618.
6. Brar S, Watters C, Watson N, Birchall M, Karagama Y. Ear, nose and throat (ENT) manifestations and complications of reflux. *Frontline Gastroenterol*. 2022 Aug;13(e1):e57–64.
7. Dai YF, Tan JJ, Deng CQ, Liu X, Lv ZH, Li XP. Association of pepsin and DNA damage in laryngopharyngeal reflux-related vocal fold polyps. *Am J Otolaryngol*. 2020 Nov;41(6):102681.
8. Rieder F, Biancani P, Harnett K, Yerian L, Falk GW. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: Impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(5).
9. Choi YS, Na HG, Bae CH, Song S, Kim Y. Pepsin exposure in a non-acidic environment upregulates mucin 5AC (MUC5AC) expression via matrix metalloproteinase 9 (MMP9)/nuclear factor κ B (NF- κ B) in human airway epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2021 May 26;11(5):894–901.
10. Song S, Byrd JC, Guha S, Liu KF, Koul D, Bresalier RS. Induction of MUC5AC mucin by conjugated bile acids in the esophagus involves the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase C/activator protein-1 pathway. *Cancer*. 2011;117(11):2386–97.
11. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Jan 3;7(1):3.
12. Tan JJ, Wang L, Mo TT, Wang J, Wang MG, Li XP. Pepsin promotes IL-8 signaling-induced epithelial–mesenchymal transition in laryngeal carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2019 Dec 20;19(1):64.
13. Lyros O, Rafiee P, Nie L, Medda R, Jovanovic N, Schmidt J, et al. Dickkopf-1, the Wnt antagonist, is induced by acidic pH and mediates epithelial

- cellular senescence in human reflux esophagitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2014 Apr 1;306(7):G557–74.
14. Cao J, Zhang L, Liu YJ, Wang WL, Wang YG, Li CF, et al. Properties of a Novel Animal Model of LPR. *Journal of Voice*. 2021 Sep;35(5):805.e17-805.e26.
 15. Feng G, Zhang Z, Diao C, Jiang J, Zheng S, Liu Y. A Bama Minipig Model of Laryngopharyngeal Reflux and the Change of Laryngopharyngeal Mucosal Ultrastructure. *J Neurogastroenterol Motil*. 2015 Apr 3;21(2):182–8.
 16. Shimazu R, Kusano K, Kuratomi Y, Inokuchi A. Histological changes of the pharynx and larynx in rats with chronic acid reflux esophagitis. *Acta Otolaryngol*. 2009 Jan 13;129(8):886–92.
 17. Nu-Ri I, Kim B, Jung KY, Kim TH, Baek SK. Non-Surgical Animal Model of Gastroesophageal Reflux Disease by Overeating Induced in Mice. *Journal of Investigative Medicine*. 2021 Aug 5;69(6):1208–14.
 18. Kowalewski K. Gastric Secretion and Peptic Ulcer in Rats with Experimentally-Induced Polycythemia. *Digestion*. 1972;7(3–4):212–9.
 19. Valberg LS, Witts LJ. The histamine test meal in the rat. *Gut*. 1961 Mar 1;2(1):32–6.
 20. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010 Feb 18;60(1):63–70.
 21. Maitra RS, Edgerton EA, Majumdar APN. Gastric secretion during aging in pyloric-ligated rats and effects of pentagastrin. *Exp Gerontol*. 1988 Jan;23(6):463–72.
 22. Khalil T, Singh P, Fujimura M, Townsend CM, Greeley GH, Thompson JC. Effect of aging on gastric acid secretion, serum gastrin, and antral gastrin content in rats. *Dig Dis Sci*. 1988 Dec;33(12):1544–8.
 23. Ward FW, Coates ME. Gastrointestinal pH measurement in rats: Influence of the microbial flora, diet and fasting. *Lab Anim*. 1987;21(3):216–22.
 24. Kotts C, Jenness R. Rennin and Pepsin in Stomachs of Rats (*Rattus Norvegicus*). *J Dairy Sci*. 1976 Aug;59(8):1398–400.
 25. Vaezi MF. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Diagnosis and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease*. Springer International Publishing; 2015. 1–160 p.
 26. Xavier SD, Moraes JP, Eckley CA. Prevalence of signs and symptoms of laryngopharyngeal reflux in snorers with suspected obstructive sleep apnea. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(5):589–93.
 27. Divakaran S, Rajendran S, Thomas RM, Jacob J, Kurien M. Laryngopharyngeal reflux: Symptoms, signs, and presence of pepsin in saliva - A reliable diagnostic triad. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2021 Apr 1;25(2):E273–8.
 28. Wood JM, Hussey DJ, Woods CM, Watson DI, Carney AS. Biomarkers and laryngopharyngeal reflux. *J Laryngol Otol*. 2011 Dec 14;125(12):1218–24.

29. Liu D, Qian T, Sun S, Jiang JJ. Laryngopharyngeal reflux and inflammatory responses in mucosal barrier dysfunction of the upper aerodigestive tract. *J Inflamm Res.* 2020;13:1291–304.
30. Rees LEN, Pazmany L, Gutowska-Owsiak D, Inman CF, Phillips A, Stokes CR, et al. The Mucosal Immune Response to Laryngopharyngeal Reflux. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Jun 1;177(11):1187–93.
31. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Henriquez CC, Mouawad F, Ristagno C, Barillari MR, et al. Laryngopharyngeal reflux, gastroesophageal reflux and dental disorders: A systematic review. Vol. 15, *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2020.
32. van Gijn DR, Dunne J. *Oxford Handbook of Head and Neck Anatomy.* Standring S, Eccles S, editors. Oxford University Press Oxford; 2022.
33. Standring S, editor. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice.* 42nd ed. London: Elsevier Ltd.; 2021.
34. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter's Essential Histology: With Correlated Histopathology.* Third Edit. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2021.
35. Treuting PM, Dintzis SM. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.* In: *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.* Academic Press; 2012. p. 46–51.
36. Young B, O'Dowd G, Woodford P. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas.* Sixth. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2014.
37. *An Atlas of Comparative Vertebrate Histology. An Atlas of Comparative Vertebrate Histology.* 2018.
38. Budde RB, Pederson DJ, Biggs EN, Jefferys JGR, Irazoqui PP. Mechanisms and prevention of acid reflux induced laryngospasm in seizing rats. *Epilepsy and Behavior.* 2020;111:1–26.
39. Ao YJ, Wu TT, Cao ZZ, Zhou SH, Bao YY, Shen LF. The role of Glut-1 and H⁺/K⁺-ATPase expression in hyperplasia of mice laryngeal epithelium induced by pepsin. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2022;279(6):2981–7.
40. Doukas SG, Doukas PG, Sasaki CT, Vageli D. The in vivo preventive and therapeutic properties of curcumin in bile reflux-related oncogenesis of the hypopharynx. *J Cell Mol Med.* 2020;24(18):10311–21.
41. Sasaki CT, Doukas SG, Vageli DP. In Vivo Short-Term Topical Application of BAY 11-7082 Prevents the Acidic Bile-Induced mRNA and miRNA Oncogenic Phenotypes in Exposed Murine Hypopharyngeal Mucosa. *Neoplasia (United States).* 2018;20(4):374–86.
42. Sasaki CT, Vageli DP. miR-21, miR-155, miR-192, and miR-375 Deregulations Related to NF-kappaB Activation in Gastroduodenal Fluid-Induced Early Preneoplastic Lesions of Laryngeal Mucosa In Vivo. *Neoplasia (United States).* 2016;18(6):329–38.
43. Cantin D, Djeddi D, Carrière V, Samson N, Nault S, Jia WL, et al. Inhibitory effect of nasal intermittent positive pressure ventilation on gastroesophageal reflux. *PLoS One.* 2016;11(1):1–13.

44. Djeddi D, Cantin D, Samson N, Praud JP. Nasal continuous positive airway pressure inhibits gastroesophageal reflux in newborn lambs. *PLoS One*. 2014;9(9):1–5.
45. Grobman ME, Maitz CA, Reinero CR. Detection of silent reflux events by nuclear scintigraphy in healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2020;34(4):1432–9.
46. Durkes A, Sivasankar MP. In vivo investigation of acidified pepsin exposure to porcine vocal fold epithelia. *Laryngoscope*. 2016 Jan;126(1):E12–7.
47. Carreau AM, Patural H, Samson N, Doueik AA, Hamon J, Fortier PH, et al. Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol*. 2011;111(2):400–6.
48. Rubio CA, Dick EJ, Orrego A, Hubbard GB. Further Studies on the Frequency and Length of the Glandulo-Metaplastic Esophageal Mucosa in Baboons. *In Vivo (Brooklyn)*. 2009;23(6):955–8.
49. Tsai TL, Chang SY, Ho CY, Kou YR. Neural and hydroxyl radical mechanisms underlying laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats. *J Appl Physiol*. 2006;101(1):328–38.
50. Tsai TL, Chang SY, Ho CY, Yu RK. Role of ATP in the ROS-mediated laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats. *J Appl Physiol*. 2009;106(5):1584–92.
51. King RE, Bilger A, Rademacher J, Ward-Shaw ET, Hu R, Lambert PF, et al. A Novel In Vivo Model of Laryngeal Papillomavirus-Associated Disease Using *Mus musculus* Papillomavirus. *Viruses*. 2022;14(5).
52. Nault S, Samson N, Nadeau C, Djeddi D, Praud JP. Reflex cardiorespiratory events from esophageal origin are heightened by preterm birth. *J Appl Physiol*. 2017;123(2):489–97.
53. Samareh Fekri M, Poursalehi HR, Najafipour H, Shahouza B, Harandi NB. Chronic aspiration of gastric and duodenal contents and their effects on inflammatory cytokine production in respiratory system of rats. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(1):40–6.
54. Budde RB, Arafat MA, Pederson DJ, Lovick TA, Jefferys JGR, Irazoqui PP. Acid reflux induced laryngospasm as a potential mechanism of sudden death in epilepsy. *Epilepsy Res*. 2018 Dec;148(3):23–31.
55. Tang X, Tang Q, Li S, Yang X, Zhang Y, Zeng S, et al. Changes in laryngopharyngeal reflux after uvulopalatopharyngoplasty for obstructive sleep apnea: An observational study. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2022 Feb 1;7(1):266–73.
56. Lang IM, Haworth ST, Medda BK, Roerig DL, Forster H V., Shaker R. Airway responses to esophageal acidification. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(1):211–9.
57. Zhen Z, Zhao T, Wang Q, Zhang J, Zhong Z. Laryngopharyngeal reflux as a potential cause of Eustachian tube dysfunction in patients with otitis media with effusion. *Front Neurol*. 2022 Nov 3;13.
58. Doğru M, Kuran G, Haytoğlu S, Dengiz R, Arıkan OK. Role of laryngopharyngeal reflux in the pathogenesis of otitis media with effusion. *Journal of International Advanced Otology*. 2015;11(1):66–71.

59. Yan S, Feng Y, Yao L. Analysis of effects of laryngopharyngeal reflux disease and proton pump inhibitor treatment on Eustachian tube function in patients with obstructive sleep apnea hypopnea. *Ear Nose Throat J.* 2022 May 1;101(4):248–54.
60. Lin YS, Shen YJ, Ou PH, Lai CJ. HIF-1 α -Mediated, NADPH Oxidase-Derived ROS Contributes to Laryngeal Airway Hyperreactivity Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Front Physiol.* 2020;11(October):1–11.
61. Vageli DP, Prasad ML, Sasaki CT. Gastro-duodenal fluid induced Nuclear Factor-kappa β activation and early pre-malignant alterations in murine hypopharyngeal mucosa. *Oncotarget.* 2016;7(5):5892–908.
62. Dembic Z. The Cytokines of the Immune System: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Respons. New York: Academic Press; 2015.
63. Board E, Cohen IR, Lambris JD. Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. Ma X, editor. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 941).
64. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Vol. 6, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2021.
65. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. Vol. 1765, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2006. p. 189–222.
66. Fujisawa T, Velichko S, Thai P, Hung LY, Huang F, Wu R. Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 β and IL-17A; the NF- κ B Paradigm . *The Journal of Immunology.* 2009 Nov 15;183(10):6236–43.
67. Sikder MA, Lee HJ, Mia MZ, Park SH, Ryu J, Kim JH, et al. Inhibition of TNF- α -induced MUC5AC mucin gene expression and production by wogonin through the inactivation of NF- κ B signaling in airway epithelial cells. *Phytotherapy Research.* 2014 Jan 1;28(1):62–8.
68. Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Lin BP, Schofield B, Sealfon SC, et al. Chronic exposure to TNF- α increases airway mucus gene expression in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2005 Dec;116(6):1256–63.
69. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation. Vol. 7, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2016.
70. Vallée A, Lecarpentier Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical WNT/ β -catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis. Vol. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.
71. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011;12(8):695–708.
72. Ermund A, Meiss LN, Rodriguez-Pineiro AM, Bähr A, Nilsson HE, Trillo-Muyo S, et al. The normal trachea is cleaned by MUC5B mucin bundles from the submucosal glands coated with the MUC5AC mucin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Oct 21;492(3):331–7.

73. Tong J, Gu Q. Expression and Clinical Significance of Mucin Gene in Chronic Rhinosinusitis. Vol. 20, *Current Allergy and Asthma Reports*. Springer; 2020.
74. Lai X, Li X, Chang L, Chen X, Huang Z, Bao H, et al. IL-19 up-regulates mucin 5ac production in patients with chronic rhinosinusitis via STAT3 pathway. *Front Immunol*. 2019;10(JULY).
75. Seibold MA. Interleukin-13 stimulation reveals the cellular and functional plasticity of the airway epithelium. In: *Annals of the American Thoracic Society*. American Thoracic Society; 2018. p. S98–106.
76. Zhang Y, Tang H, Yuan X, Ran Q, Wang X, Song Q, et al. TGF- β 3 Promotes MUC5AC Hyper-Expression by Modulating Autophagy Pathway in Airway Epithelium. *EBioMedicine*. 2018 Jul 1;33:242–52.
77. Vageli DP, Prasad ML, Sasaki CT. Gastro-duodenal fluid induced nuclear factor-kappaB activation and early pre-malignant alterations in murine hypopharyngeal mucosa. Vol. 7.
78. Yildiz F, Zeybek N, Terzi A, Coban S. Accurate esophageal volume of rats: an accurate gateway to esophageal burn studies. *Pediatr Surg Int*. 2008 Aug 4;24(8):971–2.
79. Li Y, Xu G, Zhou B, Tang Y, Liu X, Wu Y, et al. Effects of acids, pepsin, bile acids, and trypsin on laryngopharyngeal reflux diseases: physiopathology and therapeutic targets. Vol. 279, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 2743–52.
80. Zalvan Editor CH. Laryngopharyngeal and Gastroesophageal Reflux. Zalvan CH, editor. Cham: Springer International Publishing; 2020.
81. Campagnolo AM, Priston J, Thoen RH, Medeiros T, Assunção AR. Laryngopharyngeal reflux: Diagnosis, treatment, and latest research. Vol. 18, *International Archives of Otorhinolaryngology*. Fundacao Otorrinolaringologia; 2014. p. 184–91.
82. Rees CJ, Belafsky PC. Laryngopharyngeal reflux: Current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. Vol. 10, *International Journal of Speech-Language Pathology*. 2008. p. 245–53.
83. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-Cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. Vol. 2011, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011.
84. Mehta S, Nijhuis A, Kumagai T, Lindsay J, Silver A. Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease. Vol. 360, *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag; 2015. p. 749–60.
85. Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and-catenin translocation [Internet]. 2005. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500918102
86. Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/ β -catenin signalling: From plasma membrane to nucleus. Vol. 450, *Biochemical Journal*. 2013. p. 9–21.
87. Thrassivoulou C, Millar M, Ahmed A. Activation of intracellular calcium by multiple Wnt ligands and translocation of β -catenin into the nucleus: A

- convergent model of Wnt/Ca²⁺ and Wnt/ β -catenin pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Dec 13;288(50):35651–9.
88. Thiel S, Behrmann I, Dittrich E, Muys L, Tavernier J, Wijdenes J, et al. Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. Vol. 330, *Biochem. J*. 1998.
 89. Smith G. Structure of the normal rat larynx. Vol. 11, *Laboratory Animals*. 1977.
 90. Inagi K, Schultz E, Ford CN. An anatomic study of the rat larynx: Establishing the rat model for neuromuscular function. Vol. 118, *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998.
 91. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2009 Nov;141(5):559–63.
 92. Bulmer DM, Ali MS, Brownlee IA, Dettmar PW, Pearson JP. Laryngeal mucosa: Its susceptibility to damage by acid and pepsin. *Laryngoscope*. 2010 Apr;120(4):777–82.
 93. Kishimoto T. IL-6: From its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010 Feb 1;22(5):347–52.
 94. Chen S, Wang M, Zhang S, Huang X, Sui X, Li D, et al. The complexity of mucosal damage in gastroesophageal airway reflux disease: A molecular perspective. Vol. 3, *Gastroenterology and Endoscopy*. KeAi Communications Co.; 2025. p. 39–46.
 95. Hou C, Zhou L, Zheng Y, Chen T, Hu R, Zheng J, et al. Weak acid and pepsin reflux induce laryngopharyngeal mucosal barrier injury: A rabbit-model-based study. *PLoS One*. 2025 Jan 1;20(1 January).
 96. Li C, Cao X, Wang H. Pathogenesis of pepsin-induced gastroesophageal reflux disease with advanced diagnostic tools and therapeutic implications. Vol. 12, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media SA; 2025.
 97. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 1;6(10).
 98. Wang XM, Hamza M, Wu TX, Dionne RA. Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain. *Pain*. 2009 Apr;142(3):275–83.
 99. Fielding CA, McLoughlin RM, Mcleod L, Colmont CS, Najdovska M, Grail D, et al. IL-6 Regulates Neutrophil Trafficking during Acute Inflammation via STAT3 1 [Internet]. Vol. 181, *The Journal of Immunology*. 2008. Available from: www.jimmunol.org
 100. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. Vol. 16, *Nature Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 448–57.
 101. Walia B, Wang L, Merlin D, Sitaraman S V. TGF-beta down-regulates IL-6 signaling in intestinal epithelial cells: critical role of SMAD-2. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(14):2130–2.
 102. Robinson KF, Narasipura SD, Wallace J, Ritz EM, Al-Harathi L. β -Catenin and TCFs/LEF signaling discordantly regulate IL-6 expression in astrocytes. *Cell Communication and Signaling*. 2020 Jun 16;18(1).

103. Edara VV, Nooka S, Proulx J, Stacy S, Ghorpade A, Borgmann K. β -Catenin Regulates Wound Healing and IL-6 Expression in Activated Human Astrocytes. *Biomedicines*. 2020 Nov 1;8(11):1–18.
104. Wang W, Zheng M. Mucin 5 subtype AC expression and upregulation in the nasal mucosa of allergic rhinitis rats. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. 2012 Dec;147(6):1012–9.
105. Neveu WA, Allard JB, Dienz O, Wargo MJ, Ciliberto G, Whittaker LA, et al. IL-6 Is Required for Airway Mucus Production Induced by Inhaled Fungal Allergens. *The Journal of Immunology*. 2009 Aug 1;183(3):1732–8.
106. Fujisawa T, Velichko S, Thai P, Hung LY, Huang F, Wu R. Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 β and IL-17A; the NF- κ B Paradigm . *The Journal of Immunology*. 2009 Nov 15;183(10):6236–43.