

# DOPRINOS GAMMA DELTA ( $\gamma\delta$ ) T-LIMFOCITA U RAZVOJU TIPA 2 UPALE U SINONAZALNOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD KRONIČNOG ALERGIJSKOG RINOSINUITISA S NOSNOM POLIPOZOM

---

Milanković, Stjepan Grga

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:236:531891>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University in Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Stjepan Grga Milanković

DOPRINOS GAMMA DELTA ( $\gamma\delta$ ) T-LIMFOCITA U RAZVOJU  
TIPA 2 UPALE U SINONAZALNOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD  
KRONIČNOG ALERGIJSKOG RINOSINUITISA S NOSNOM  
POLIPOZOM

Doktorski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Stjepan Grga Milanković

DOPRINOS GAMMA DELTA ( $\gamma\delta$ ) T-LIMFOCITA U RAZVOJU  
TIPA 2 UPALE U SINONAZALNOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD  
KRONIČNOG ALERGIJSKOG RINOSINUITISA S NOSNOM  
POLIPOZOM

*Doktorski rad predložen je Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske  
studije u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na  
Doktorskom studiju Molekularne bioznanosti – modul biomedicina*

Osijek, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** temeljne medicinske znanosti i biologija

### DOPRINOS GAMA DELTA ( $\gamma\delta$ ) T-LIMFOCITA U RAZVOJU TIP 2 UPALE U SINONAZALNOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD KRONIČNOG ALERGIJSKOG RINOSINUITISA S NOSNOM POLIPOZOM

Stjepan Grga Milanković

**Doktorski rad je izrađen u:** KBC-u Osijek (Klinika za ORL i kirurgiju glave i vrata, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku) i Medicinskom fakultetu Osijek (Laboratorij za analizu DNA)

**Mentor 1:** doc.dr.sc. Hrvoje Mihalj

**Mentor 2:** izv.prof.dr.sc. Stana Tokić

**Kratki sažetak doktorskog rada:** Metodom protočne citometrije zabilježena je povećana distribucija subpopulacija  $\delta 1$ - $\delta 2$ -  $\gamma\delta$  T-limfocita u sinonazalnoj sluznici bolesnika s eKRSsNP. Također, metodom RT-qPCR zabilježen je povećan genski izražaj CCR3 i IL-13 u sinonazalnoj sluznici bolesnika s eKRSsNP u odnosu na sinonazalnu sluznicu kontrolnih ispitanika. U ovom istraživanju dokazana je važna uloga  $\gamma\delta$  T-limfocita u nastanku eKRSsNP, kao i snažna veza između opisanih stanica i IL-13 – važnog citokina upale tipa 2.

**Broj stranica:** 119

**Broj slika:** 31

**Broj tablica:** 29

**Broj literaturnih navoda:** 184

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** kronični rinosinuitis, nosna polipoza, gamma delta T-limfociti, Th2 upala

**Datum javne obrane:** 08.03.2024.

#### Povjerenstvo za javnu obranu:

1. prof.dr.sc. Ines Drenjančević (predsjednica)
2. prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić (član)
3. izv.prof.dr.sc. Rosemary Vuković (član)
4. prof.dr.sc. Martina Smolić (zamjena člana)
5. prof.dr.sc. Sven Kurbel (zamjena člana)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruder Bošković Institute**

**PhD thesis**

**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences**

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science

**Scientific Fields:** Basic Medical Sciences and Biology

### **CONTRIBUTION OF GAMMA DELTA T LYMPHOCYTES IN THE DEVELOPMENT OF TYPE 2 INFLAMMATION IN SINONASAL MUCOSA OF PATIENTS WITH CHRONIC ALLERGIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPOSIS**

**Stjepan Grga Milanković**

**Thesis performed at:** University Hospital Osijek (Department of ENT and Head and Neck surgery, Clinical Department for Laboratory Diagnostics) and Faculty of Medicine Osijek (Laboratory for DNA analysis)

#### **Supervisors:**

**Menthor 1:** Assist. Prof. Hrvoje Mihalj, PhD

**Menthor 2** Assoc. Prof. Stana Tokić, PhD

**Short abstract:** An increased distribution of  $\delta 1$ - $\delta 2$ - subpopulations  $\gamma\delta$  T-lymphocytes in the sinonasal mucosa of patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (eCRSwNP) was detected using the flow cytometry method. Also, using the RT-qPCR method, increased gene expression of CCR3 and IL-13 was recorded in the sinonasal mucosa of eCRSwNP patients compared to sinonasal mucosa of controls. In this research, we proved the importance of  $\gamma\delta$  T-lymphocytes in the development of eCRSwNP, as well as the strong connection between the described cells and the IL-13 – important cytokine of type 2 inflammation.

**Number of pages:** 119

**Number of figures:** 31

**Number of tables:** 29

**Number of references:** 184

**Original in:** Croatian

**Key words:** chronic rhinosinusitis, nasal polyps, gamma delta T-lymphocytes, Th2 inflammation

**Date of the thesis defense:** 08.03.2024.

#### **Reviewers:**

1. Prof. Ines Drenjančević, PhD (president)
2. Prof. Ines Mrakovčić-Šutić, PhD (reviewer)
3. Assoc. Prof. Rosemary Vuković, PhD (reviewer)
4. Prof. Martina Smolić, PhD (substitute)
5. Prof. Sven Kurbel, PhD (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## ZAHVALE

*Zahvaljujem svojim mentorima doc. dr. sc. Hrvoju Mihalju, dr. med. i izv. prof. dr. sc. Stani Tokić, mag. mol. biol. na podršci, strpljenju te znanstvenom i stručnom usmjeravanju tijekom izrade doktorskog rada.*

*Hvala i cijeloj mojoj ekipi s Klinike za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC-a Osijek*

*na pomoći i razumijevanju tijekom provedbe istraživanja, posebno kolegi Vjeranu Bogoviću, dr. med na suradnji i pomoći pri pripremanju bolesnika za istraživanje te kolegici dr. sc. Anamariji Šestak, dr. med na nesebičnoj pomoći i podršci.*

*Zahvaljujem i prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. na stručnim savjetima i prijedlozima u samom istraživanju te prof. dr. sc. Mariu Štefaniću, dr. med. na pomoći oko izrade statistike i uređivanja rezultata zbog kojih ovaj rad ima dodatnu vrijednost.*

*Izrada disertacije bila bi mnogo teža bez zaposlenika Kliničkoga zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu, KBC-a Osijek, a i bez cijele ekipe iz Laboratorija za analizu DNA, Medicinskog fakulteta Osijek.*

*Hvala svima od srca.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji. Zahvaljujem roditeljima na apsolutnoj podršci tijekom cijelog obrazovanja. Uvijek ste bili moj oslonac i vjetar u leđa.*

*Najviše zahvaljujem Ines; svojoj supruzi, najboljoj prijateljici, šegrtu i asistentu u svim životnim izazovima i uspjesima. Hvala ti za svaku poruku podrške, za svaku minutu razumijevanja i za svaku skuhanu kavu dok sam pisao ovaj rad. Bez tebe ovo sve ne bi bilo moguće.*

# SADRŽAJ

---

1. UVOD .....	1
1.1. Fiziologija respiratorne sluznice u nosu i paranazalnim sinusima .....	1
1.2. Kronični rinosinitis.....	2
1.3. Epidemiologija kroničnog rinosinitisa .....	4
1.4. Etiologija kroničnog rinosinitisa .....	5
1.5. Dijagnostika i liječenje kroničnog rinosinitisa .....	6
1.6. Mikrobiom nosne sluznice u kroničnom rinosinitisu .....	9
1.7. Th2 upala.....	10
1.7.2. Površinski i sekrecijski biljezi imunskog odgovora tipa 2.....	12
1.7.3. Signalni put upale sluznice nosa posredovane Th2-stanicama .....	14
1.8. Gamma delta T-limfociti .....	17
1.8.1. Građa $\gamma\delta$ T staničnog receptora .....	17
1.8.2. Fenotipska i funkcijska raznolikost humanih $\gamma\delta$ T limfocita.....	18
1.8.3. Uloga gamma delta T-limfocita u eKRS .....	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
3. Materijali i metode .....	23
3.1. Materijali .....	23
3.1.1. Bolesnici i klinička evaluacija proširenosti eKRSsNP .....	23
3.1.2. Upotrijebljene kemikalije .....	23
3.2. METODE .....	26
3.2.1. Laboratorijska obrada ispitanika i uzoraka.....	26
3.2.2. Uzorkovanje tkiva sinonazalne sluznice i nosnog polipa.....	28
3.2.3. Izolacija i kriokonzervacija mononuklearnih stanica iz tkiva.....	29
3.2.4. Imunofenotipizacija $\gamma\delta$ T-limfocita metodom protočne citometrije.....	30
3.2.5. Izolacija i mjerenje koncentracije ukupne RNA iz tkivnih mononuklearnih stanica.....	33
3.2.6. Kvantitativna analiza transkriptoma mononuklearnih stanica izoliranih iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa primjenom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR).....	34
3.2.7. Uzorkovanje obrisaka sluznice sinusa i nosne šupljine za mikrobiološku analizu.....	40
3.2.8. Patohistološka analiza na prisutnost eozinofila u uzorcima sluznice srednje nosne školjke i nosnog polipa .....	40
3.2.9. Statističke metode.....	40
4. REZULTATI.....	45

4.1. Deskriptivna analiza .....	45
4.2. Zastupljenost subpopulacija gamma delta ( $\gamma\delta$ ) T-limfocita u nosnim polipima eKRSsNP bolesnika te sluznici srednje nosne školjke (SNŠ) eKRSsNP i kontrolnih ispitanika.....	47
4.3 Učinci tkivnog sijela, spola i dobi na promjene Frekvencije ispitivanih staničnih populacija zdravih i oboljelih ispitanika (GLMM, osnovni model).....	53
4.4 Učinci serumske razine IgE protutijela i subjektivnih (SNOT) mjera težine bolesti na stanični sastav polipoidne sluznice i sluznice SNŠ u oboljelih i zdravih ispitanika (GLMM, osnovni model) 58	
4.4.1. Povezanost serumske razine IgE protutijela s promjenama staničnog sastava .....	58
4.4.2. Povezanost subjektivnih mjera težine bolesti (SNOT) s promjenama staničnog sastava	60
4.5. Učinak objektivnih mjera težine bolesti na stanični sastav polipoidne i sluznice snš u oboljelih i zdravih ispitanika (GLM-ANCOVA) .....	61
4.5.1. Povezanost Lund-Mackey indeksa s promjenama staničnog sastava .....	62
4.5.2. Povezanost prisustva eozinofila u brisu nosa s promjenama staničnog sastava .....	65
4.6. Usporedba izražaja gena između skupina.....	67
4.7. Učinci tkivnog sijela, spola i dobi na promjene genskog izražaja u polipoidnoj i sluznici SNŠ oboljelih i zdravih ispitanika (GLMM, osnovni model) .....	71
4.7.1 Povezanost serumske razine IgE s promjenama genskog izražaja u polipoidnoj i sluznici SNŠ	73
4.7.2. Povezanost subjektivnih mjera težine bolesti (SNOT) s promjenama genskog izražaja u polipoidnoj sluznici i sluznici SNŠ .....	74
4.7.3. Povezanost Lund-Mackey indeksa s promjenama genskog izražaja u polipoidnoj sluznici i sluznici SNŠ.....	75
4.7.4 Povezanost prisutnosti eozinofila u obrisku nosa s genskim izražajem u polipoidnoj i sluznici SNŠ .....	76
4.8. Povezanost staničnog sastava s transkripcijskim profilom ispitivanih citokina .....	76
4.9. Analiza staničnog izvora razlikovno izraženih prijepisa primjenom javno dostupnih podataka sekvenciranja jednostanične RNA .....	78
5. RASPRAVA.....	82
5.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta T-limfocita u tkivu polipa bolesnika sa eKRSsNP i tkivu SNŠ bolesnika s eKRS te kontrolnih ispitanika značajno se razlikuje.....	82
5.2. Povezanost kliničkih i upalnih biljega sa subpopulacijom gamma delta T-limfocita .....	85
5.3. IL-13 i IL-4 izražaj i povezanost s $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima .....	87
5.4. GATA3 genski izražaj i povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima	89
5.5. Genski izražaj TRDV1, TRDV2 i TRDV3 te povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima.....	90
5.6 Genski izražaj CCR3 i MMP7 te povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima.....	91
5.7. Ograničenje istraživanja .....	91



6. ZAKLJUČAK .....	92
7. Reference.....	94
8. SAŽETAK.....	111
9. SUMMARY .....	113
10. Životopis.....	115

## KRATICE:

ARS – akutni rinosinitis

EPOS – *engl. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps*

SNOT 22 – *engl. Sino Nasal outcome test 22*

KRSsNP – kronični rinosinitis s nosnom polipozom

KRSbNP – kronični rinosinitis bez nosne polipoze

CT PNŠ – kompjutorizirana tomografija paranazalnih šuplina

neKRS – neozinofilni kronični rinosinitis

eKRS – eozinofilni kronični rinosinitis

AR – alergijski rinitis

TGF – transformirajući faktor rasta (*engl. transforming growth factor*)

TCR – T-stanični receptor (*engl. T cell receptor*)

MHC – *engl. Major histocompatibility complex*

TLR – *engl. Toll like receptor*

NK – *engl. Natural killer*

hsCRP – *engl. High sensitive C reactive protein*

STAT6 – *engl. Signal transducer and activator of transcription 6*

SHH – *engl. sonic hedgehog*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl. Deoxyribonucleid acid, DNA*)

RNA – ribonukleinska kiselina (*engl. Ribonucleid acid, RNA*)

NALT – *limfno tkivo nosa (engl. Nasal lymphoid tissue)*

TJ – tijesni spojevi (*engl. Tight junctions*)

MR – magnetna rezonancija

ILC2 – unutarne limfoidne stanice tipa 2 (*engl. Innate lymphoid cells group 2*)

CCR3 – C kemokinski receptor 3 (*engl. C chemokine receptor 3*)

JAK3 – Janus kinaza 3 (*engl. Janus kinase 3*)

MTA2 – protein povezan s metastazama 2 (*engl. Metastasis associated protein 2*)

ECM – izvanstanični matriks (*engl. Extracellular matrix*)

MMP – metaloproteinaze matriksa (*engl. Matrix metalloproteinase*)

TIMP - tkivni inhibitor metaloproteinaza (*engl. Tissue inhibitors of metalloproteinase*)

TSLP – timusni stromalni limfoidni neoplastični čimbenik (*engl. Thymic stromal lymphoid neoplastic factor*)

PBMC - mononuklearne stanice periferne krvi (*engl. Peripheral blood mononuclear cells*)

IL-4 - interleukin 4

IL-13 – interleukin 13

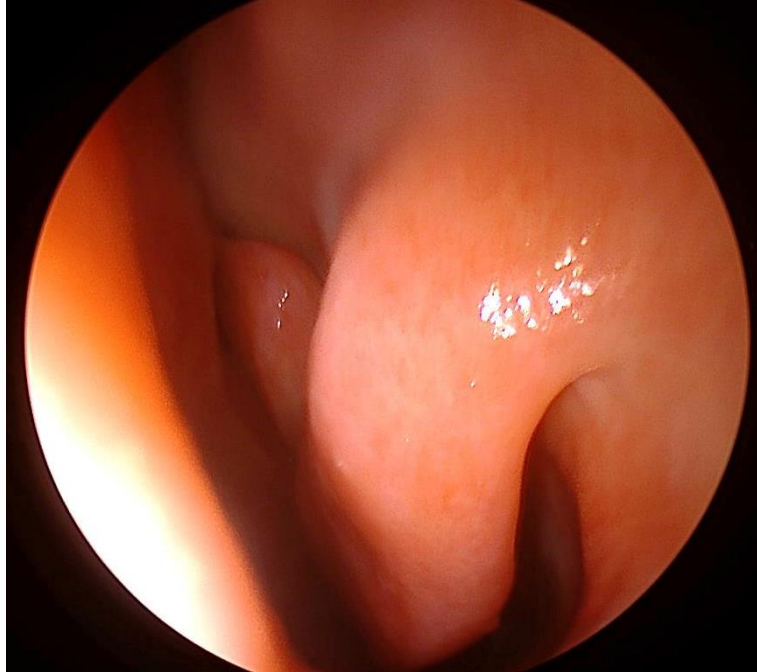
# 1. UVOD

---

## 1.1. FIZIOLOGIJA RESPIRATORNE SLUZNICE U NOSU I PARANAZALNIM SINUSIMA

Uloga je nosa u disanju višestruka. U minuti udahnemo između 12 i 24 puta, i to u prosjeku 12000 litara zraka na dan različite temperature i vlažnosti, pomiješanog s prašinom i mikroorganizmima. Funkcije su nosa: osjet njuha, imunološka uloga, mukocilijarni transport, filtracija zraka, zagrijavanje i ovlaživanje zraka, nosni ciklus i dinamika protoka zraka. U području etmoidne kosti nalaze se specijalizirane stanice za osjet njuha – završeci olfaktornoga živca koji su dio živčanoga sustava. Donji dio nosne šupljine prekriven je sluznicom, nosnim dlačicama i cilijama s pomoću kojih nos obavlja svoje funkcije (Slika 1). Nosne dlačice sprečavaju prolazak većih čestica prema plućima dok cilije i mukozni sekret prašinu i patogene transportiraju do ždrijela gdje dalje bivaju uništeni u probavnom traktu. Osim čišćenja zraka, nos zagrijava i vlaži udahnuti zrak i time ga priprema za prolazak do pluća. Šupljine paranazalnih sinusa prekrivene su respiratornim epitelom (jednoslojni cilindrični epitel s cilijama). Iako funkcija paranazalnih sinusa nije do danas u potpunosti razjašnjena, poznato je da im je uloga stvaranje i drenaža stvorenog sekreta prema nosnoj šupljini i nazofarinksu kako bi se regulirao tlak u nosnoj šupljini. Također, čine i imunološku barijeru stvarajući antimikrobne proteine i s pomoću mukoznog sekreta nakupljene mikrobe na sluznici nosa transportiraju prema nazofarinksu. Osim imunološke uloge, smatra se da imaju ulogu u rezonanciji glasa, potpori neurokranija i viscerokranija, zagrijavanju i ovlaživanju zraka (Beule, 2010). Nosna sluznica predstavlja prvu barijeru obrane i kontakta sa svim inhaliranim česticama i antigenima (Himi T, 2011). Jedan od uzroka nastanka kroničnog rinosinuitisa, alergijskog rinitisa, ali i astme i atopijskog dermatitisa jest narušavanje epitelne barijere, tijesnih spojeva (*eng. tight junction – TJ*) i adherirajućih spojeva u epitelu, čime je patogenima i alergenima put prema unutarnjem tkivu slobodan (Steelant, 2018). U nosnoj sluznici imunološku barijeru čine T i B-limfociti, dentritičke stanice, makrofazi i antigen prezentirajuće stanice koje čine nosno limfoidno tkivo (*engl. Nasal lymphoid tissue – NALT*) (Heritage, 1997; Mutoh M, 2016). Inhalirani antigeni transportiraju se do NALT-a s pomoću antigen prezentirajućih stanica i obrađuju se s pomoću dentritičkih stanica za predočenje T-limfocitima. Aktivacijom T-

limfocita i produkcijom citokina stvara se mikrookolina za IgA protutijela koja se pojačano stvaraju radi imunološke obrane od patogena (Himi T, 2011).



**Slika 1.** Endoskopski prikaz zdrave nosne sluznice. Vlastiti izvor.

## 1.2. KRONIČNI RINOSINUITIS

Rinosinitis je definiran kao upala sluznice nosne šupljine i paranazalnih sinusa i povezan je sa simptomima kao što su nosna opstrukcija i kongestija, sekrecija iz nosa, bol i pritisak u licu te poremećen osjećaj mirisa.

Akutni rinosinitis (ARS) ima prevalenciju od 6 do 15 % i obično je posljedica virusne prehlade. ARS je bolest koja obično ima benigni tijek i spontano je izlječiva dok ozbiljne komplikacije bolesti koje su rijetke mogu biti životno ugrožavajuće. To je i najčešći razlog propisivanja antibiotika, a pravilno liječenje iznimno je bitno u kontekstu globalne antibiotske rezistencije. (Fokkens, 2020)

Najčešći uzrok ARS-a jest virusna infekcija koja traje do 10 dana i može prethoditi akutnom bakterijskom sinuitisu. Najzastupljenije bakterije koje uzrokuju sinuitis jesu *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes* (Kucuksezer, 2018).

Kronični rinosinuitis složena je heterogena upalna bolest s različitim fenotipovima i endotipovima. Prema EPOS smjernicama, klinička definicija kroničnog rinosinuitisa u odraslih definirana je kao upala nosa i paranazalnih sinusa karakteriziranih s dvama ili više simptoma od kojih vodeći simptom mora biti jedno od sljedećeg: nosna opstrukcija, nosna kongestija ili nosna sekrecija (prednji ili postnazalni drip), uz prisutnost ili pritiska/boli u licu ili gubitak ili poremećaj osjeta njuha uz trajanje opisanih simptoma duže od 12 tjedana uzastopno.

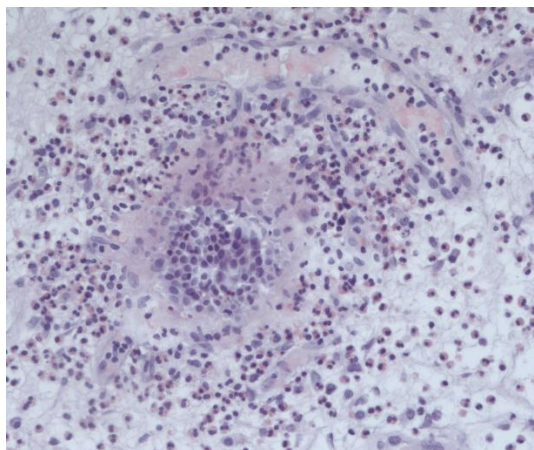
Akutni i kronični rinosinuitis povezani su sa značajno lošijom kvalitetom života, što je dokazivo ispunjavanjem različitih upitnika od koji je najpoznatiji SNOT-22 (*engl. sinonasal outcome score*) koji bolesnici samostalno ispunjavaju i subjektivno procijenjuju intenzitet različitih simptoma.

Fenotipski, dijeli se u dva glavna oblika: kronični rinosinuitis s nosnom polipozom (KRSsNP) i kronični rinosinuitis bez nosne polipoze (KRSbNP) (Mullol, 2022). Nosna opstrukcija i poremećaj osjeta njuha i okusa najčešće su smetnje kod bolesnika s KRSsNP, dok su kod bolesnika s KRSbNP najčešće i najteže tegobe nosna opstrukcija uz bol i pritisak u licu te nosna sekrecija.

Nosni polipi benigne su tvorbe koje nastaju iz sluznice nosnih sinusa ili nosne šupljine. Etiologija nastanka polipa još u potpunosti nije razjašnjena; smatra se da su posljedica stanja kronične upale u nosu i nosnim sinusima, karakterizirani edemom strome i različitim infiltratom upalnih stanica (Newton, 2008). Smatra se da je nosna polipoza završni stadij manifestacije nekontrolirane i neodgovarajuće liječene alergije (del Toro E, 2023).

Histološki gledano, polipi sadržavaju edematoznu stromu s oskudnim fibroblastima, mukoznim žlijezdama, metaplastični pločasti epitel, proliferativnu stromu i epitelne elemente uz zadebljanje bazalne membrane. Staničnu sastavnicu čine različite vrste stanica uključujući eozinofile, mastocite, limfocite, neutrofile i plazma stanice (Slika 2). U većini nosnih polipa, eozinofili čine 60 % stanične populacije, osim u cističnoj fibrozi. Postoji više histoloških vrsta nosnih polipa, od kojih su eozinofilni (alergijski) i kronični inflamatorni tip (sadržava više neutrofila i limfocita) najčešći (Pawankar R. N., 2007).

Osim dvaju glavnih fenotipa, postoji i alergijski fungalni rinosinuitis (uključuje invazivne i neinvazivne podtipove), infektivni rinosinuitis, KRS u aspirin-intolerantnoj respiratornoj bolesti, KRS u sklopu cistične fibroze, pedijatrijski KRS i KRS povezan sa sistemskim bolestima.



**Slika 2.** Patohistološki nalaz tkiva nosne polipoze odstranjene tijekom operacije – stroma polipa. U stromi je vidljivo mnoštvo stanica u kojima prevladavaju eozinofili uz obilnu stromu. Izvor: ustupljeno ljubaznošću doc. dr. sc. Jasmine Rajc, dr. med.

### **1.3. EPIDEMIOLOGIJA KRONIČNOG RINOSINUITISA**

Kronični rinosinusitis (KRS) izrazito je zastupljeno upalno stanje paranazalnih sinusa i nosne šupljine koje pogađa 5-12 % opće populacije pogađajući sve dobne skupine. Incidencija u SAD-u iznosi približno 12,3 %, 10,9 % u Europi i 13 % u Kini. Smatra se da KRS ima veći utjecaj na društvene funkcije nego ishemijska bolest srca ili kronično srčano zatajenje. Osim društvenog utjecaja, KRS je teret i za ekonomiju. Procjenjuje se da trošak povezan sa KRS u SAD-u iznosi 10-13 milijardi USD godišnje. Također, neizravni trošak vezan za bolovanja i smanjenu produktivnost iznosi dodatnih 20 milijardi američkih dolara godišnje u SAD-u (Albu, 2020). Prevalencija KRSsNP u hospitaliziranih bolesnika jest 4,2 %, dok je u astmatičara prevalencija nešto veća i iznosi 6,7 %. Prosječna je dob pojave polipa 42 godine (Beule A. , 2015).

Znakovi kroničnog rinosinuitisa detektirani CT snimkom paranazalnih sinusa postoje u 20-40 % opće populacije koji nemaju simptoma bolesti (Dietz de Loos, 2019).

## 1.4. ETIOLOGIJA KRONIČNOG RINOSINUITISA

Povijesno gledano, KRSbNP smatrao se kao posljedica nedovoljno zaliječene bakterijske infekcije, dok se za KRSsNP povezivalo s alergijama. Istraživanja u proteklih 20 godina pokazala su da su etiologija i patogeneza tih oblika bolesti daleko kompleksnija. Pregledom literature sa sigurnošću se može reći da postoji konsenzus u dvjema točkama: a) specifični čimbenici vjerojatno se razlikuju u pojedinačnih bolesnika i b) KRS je proces u kojem je upaljena sluznica potaknuta egzogenim čimbenikom udahnutim kroz nos. Smatra se da je KRS posljedica disfunkcionalnih odnosa između domaćina i okolišnih čimbenika. Imunološki sustav domaćina obično reagira hiperreaktivno pod utjecajem okolišnih čimbenika poput alergena, toksina i mikrobiote (Lam K, 2015).

Osim eozinofilije u nekih bolesnika, gotovo polovica Azijata sa KRSsNP pokazuju karakteristike neutrofilne upale, koja se primarno prezentira Th1 i Th17 tipom upale. (Takabayashi T, 2020). Na temelju tkivne eozinofilije, KRSsNP može se podijeliti u dva podtipa: eozinofilni KRS (eKRS) i neozinofilni KRS (neKRS). Poznato nam je da je KRSsNP zahtjevno liječiti zbog visoke stope recidiva bolesti unatoč dostupnoj kvalitetnoj medikamentnoj i kirurškoj terapiji, no bolesnici s mukoznom eozinofilijom imaju značajno veću stopu recidiva polipoze i lošiji kirurški ishod. Također, eozinofilna upala u uskoj je vezi s težinom astme u bolesnika koji boluju od KRS uz pridruženu astmu. Kod bolesnika s teškom astmom (potvrđene razinom eozinofila u sputumu ili perifernoj krvi te razinom NO u ekspiriju) dokazani su teži simptomi i veći opseg upalno zahvaćene sluznice sinusa potvrđene CT paranazalnih sinusa (Maniscalco, 2019). Također, bolesnici s KRSsNP i astmom imaju težu bolest koja je karakterizirana visokim udjelom recidiva nosne polipoze i većom ovisnošću o kortikosteroidima (Laidlaw TM, 2021).

Eozinofilni KRS (eKRS) potaknut je Th2 upalnim procesom koji obuhvaća infiltraciju eozinofila i drugih upalnih stanica u podsluznicu nosa potaknuti Th2 citokinima proizvedenima od CD4+ Th2 stanica. Poznato je i da, ovisno o zemljopisnoj regiji, dobi, etničkoj skupini i komorbiditetima, varira i inflamatorni profil stanica koje dominiraju u KRSsNP. Upala Th2 glavni je pokretač u patogenezi KRSsNP i povezana je s češćim recidivom bolesti te astmom (Maspero, 2022).



## 1.5. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE KRONIČNOG RINOSINUITISA

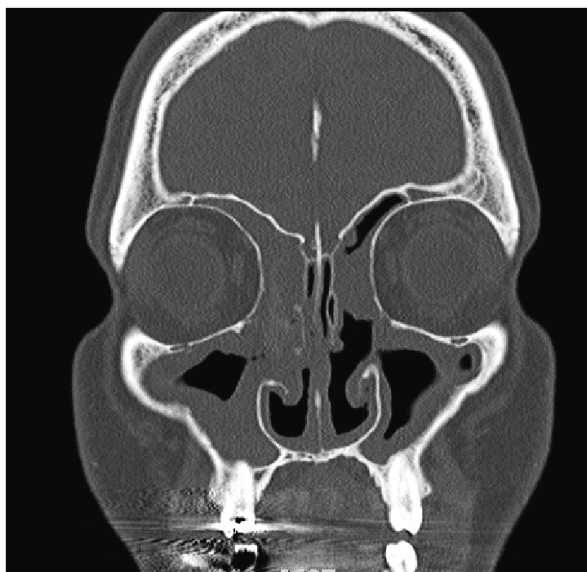
Dijagnostikom i liječenjem KRS bavi se otorinolaringolog, koji obradu i dijagnostiku započinje anamnezom i kliničkim pregledom. Potrebno je prikupiti važne informacije o duljini, težini i vrsti simptoma povezanih s nosom i paranazalnim sinusima. Klinička dijagnoza kroničnog rinosinuitisa može se postaviti ako bolesnik ispunjava kriterije prema EPOS 2020 smjernicama, no zbog potrebe za optimalnom terapijom i uspješnom kontrolom bolesti potrebno je pregled upotpuniti ostalim dijagnostičkim metodama.

Nakon anamneze i kliničkog pregleda potrebno je učiniti prednju rinoskopiju i endoskopiju nosa. Prednja rinoskopija neinvazivna je pretraga kojom vizualiziramo nosnu sluznicu. Nedostatak prednje rinoskopije jest to što je često teško vizualizirati stražnji dio nosne šupljine, čak i nakon primjene topičkih dekonjestiva. Endoskopija nosa, iako invazivnija metoda, omogućava vizualizaciju nosne sluznice u stražnjim dijelovima nosa te nosne školjke u cijelosti. Endoskopskim pregledom mogu se uzorkovati i mikrobiološki brisevi sinusa ili drugih lokalizacija (Meltzer EO, 2004). Endoskopski nalaz nosne polipoze kvantificiran je u četiri stupnja prema Malmu (0-3) (Tablica 1), kojima se označava klinički stadij bolesti (Malm, 1997).

**Tablica 1.** Klasifikacija endoskopskog nalaza nosne polipoze po Malmu. Izvor: (Malm, 1997).

<b>Bodovi</b>	<b>Nalaz</b>
<b>0</b>	Nema vidljivih polipa
<b>1</b>	Polipi unutar OMC-a
<b>2</b>	Polipi izvan OMC-a
<b>3</b>	Polipi ispunjavaju čitavu nosnu šupljinu

Zlatni standard za vizualizaciju nosne šupljine i paranazalnih sinusa jest kompjutorizirana tomografija paranazalnih šupljina (CT PNŠ) (AR, 2017). Koronarni presjeci CT-a omogućuju jasan pogled koštanih struktura i stanja sluznice. Ti presjeci korisni su kod bolesnika s rekurentnim sinuitisom ili za procjenu stanja KRS radi određivanja terapije. Kod kandidata za kirurško liječenje, s pomoću CT-a prikazana je jasno anatomija i proširenost bolesti (Slika 3). Osim kirurške anatomije, prikazuje se i zadebljanje sluznice, promjene na kosti i količina zraka i tekućine u sinusima.



**Slika 3.** Koronarni presjek CT-a paranazalnih šupljina. Maksilarni sinus djelomično ispunjen polipoidnim tvorbama, kao i etmoidni sinusi. Ostiomeatalni kompleks s desne strane opstruiran polipima. Vlastiti izvor.

Nakon snimanja CT PNS, određuje se Lund-Mackey sustavi (*eng. Lund-Mackey score*) s pomoću kojeg se objektivizira stanje bolesti (Tablica 2). Lund-Mackey sustav dobije se pregledavanjem ukupno šest lokalizacija (frontalni, prednji i stražnji etmoidni, sfenoidni, maksilarni sinus i ostiomeatalni kompleks) na CT snimci i određivanjem stanja svake od šest lokalizacija dobije se ukupni broj bodova. Za svaku lokalizaciju dodjeljuje se 0 bodova ako je fiziološko stanje, 1 bod ako je djelomično opstruiran, a 2 boda u slučaju potpune opstrukcije sinusa ili ostiomeatalnog kompleksa (u slučaju ostiomeatalnog kompleksa postoji 0 ili 2, ovisno o opstrukciji).

**Tablica 2.** Stupnjevanje CT nalaza prema Lund-Mackey sustav. Izvor: (Hopkins C, 2007).

<b>Sinus</b>	<b>Lijevo</b>	<b>Desno</b>
<b>Maksilarni</b>	0-2	0-2
<b>Prednji etmoid</b>	0-2	0-2
<b>Stražnji etmoid</b>	0-2	0-2
<b>Sfenoid</b>	0-2	0-2
<b>Frontalni</b>	0-2	0-2
<b>OMC</b>	0 ili 2	0-2
<b>Ukupno bodova</b>	<b>0-12</b>	<b>0-12</b>

Dosadašnje studije pokazale su da Lund-Mackey korelira s drugim pokazateljima težine stanja KRS (Hopkins C, 2007). Osim CT PNSŠ, ponekad se može učiniti i magnetna rezonancija (MR) paranazalnih sinusa. MR može razlučiti stupanj proširenosti bolesti prema orbiti i intrakranijalno, no za diferencijaciju infektivnih stanja (bakterijska ili gljivična podloga) od maligniteta CT superiorniji je u odnosu na MR (Benninger MS, 2003).

Pri dijagnosticiranju KRSsNP i KRSbNP konzervativno liječenje započinje s topičkim kortikosteroidima koji su u više dosadašnjih studija pokazali učinkovitost u odnosu na placebo te, veću učinkovitost u kontroli bolesti nakon kirurškog liječenja u odnosu na bolesnike koji nisu bili podvrgnuti kirurškom liječenju.

Upotreba antibiotika kod KRSbNP opravdana je u slučaju akutne egzacerbacije, i to se preporučuje amoksicilin uz klavulansku kiselinu ili cefuroksim. Kod KRSsNP korištenje doksiciklina tijekom 20 dana pokazalo se učinkovito u smanjenju veličine polipa uz redukciju postnazalne sekrecije. Dugotrajno neprestano liječenje antibioticima u bolesnika s KRSbNP nije pokazalo značajan utjecaj (Rotter, 2016).

Slana otopina za ispiranje nosne šupljine pokazuje brojne koristi u liječenju KRS. Osim niske cijene i najmanjih mogućih nuspojava, poboljšava mukocilijarni transport, smanjuje edem sluznice i otplavljuje antigene s nosne sluznice, stoga bi trebala uvijek biti potporna terapija uz druge medikamente (Orlandi RR, 2016).

U slučaju neuspješnog konzervativnog liječenja KRS, potrebno je razmotriti kirurško liječenje. Preoperativno potrebno je učiniti CT PNSŠ radi uvida u proširenost bolesti, stanje sluznice i anatomiju paranazalnih sinusa te odnos prema vitalnim strukturama. Točan opis kirurške anatomije paranazalnih sinusa koji će učiniti radiolog značajno pozitivno korelira sa sigurnim i preciznim operativnim zahvatom gdje su komplikacije značajno smanjene (Chong VF, 1998).

Funkcionalna endoskopska sinusna kirurgija (*eng. functional endoscopic sinus surgery*) pripada minimalno invazivnim kirurškim zahvatima za bolesti sinusa. Kirurg (otorinolaringolog) za operativni zahvat koristi se nosnim endoskopom s lećom i izvorom svjetla s pomoću kojeg uz rinokirurške instrumente otvara zračne šupljine u sinusima i dilatira (po potrebi širi) prirodna ušća sinusa. Cilj operacije jest omogućiti ventilaciju sinusa i uspostavljanje normalne funkcije i drenaže. Tijekom operativnog zahvata uklanjaju se i polipoidne tvorbe ako ih ima.

Ako kirurško liječenje u kombinaciji s optimalnom medikamentoznom terapijom ne ostvari zadovoljavajuće rezultate, potrebno je razmotriti i dodatnu terapiju, u prvome redu biološku terapiju. Kirurško liječenje KRS-a samo je jedan korak u kroničnom liječenju te

bolesti, gdje se pripremaju bolji uvjeti za lokalnu terapiju koju će bolesnik nastaviti nakon operativnog zahvata.

Kada su Američka institucija za hranu i lijekove (FDA) i Europska agencija za lijekove (EMA) 2019. prihvatile dupilumab (anti IL-4) za liječenje KRSsNP, značajno su se promijenile terapijske opcije za liječenje eKRS. Zbog visoke cijene postoje kriteriji prema kojima se biološka terapija može propisati, a to su prije svega bolesnici s obostranom nosnom polipozom, koji su ranije kirurški liječeni i unatoč tomu i dalje imaju simptome i objektivne znakove bolesti ili bolesnici koji nisu kandidati za operativni zahvat zbog općeg stanja, a uz to zadovoljavaju barem 3 od navedenih 5 kriterija:

- 1) dokazani eKRS ( $\geq 10$  tkivnih eozinofila na preparatu ili  $\geq 250$  eozinofila u krvi ili  $\geq$  ukupni IgE u krvi)
- 2) potreba za barem 2 ciklusa sistemskih kortikosteroida ili kontinuirana primjena sistemskih kortikosteroida ( $\geq 2$  ciklusa godišnje ili dugoročna ( $>3$  mjeseca) primjena niskih doza kortikosteroida ili kontraindikacija primjene sistemskih kortikosteroida)
- 3) značajno loša kvaliteta života prema SNOT 22 ( $\geq 40$ )
- 4) anosmija na olfaktometrijskom testu
- 5) dijagnosticirana astma i potreba za inhalacijskim kortikosteroidima (Fokkens, 2020).

## 1.6. MIKROBIOM NOSNE SLUZNICE U KRONIČNOM RINOSINUITISU

Postoji više vrsta mikrobiote u gornjem dišnom putu u zdravih pojedinaca. Nosna šupljina kao prva barijera predstavlja izravan kontakt s vanjskom okolinom. Inhalacijom zraka, nosna je šupljina u izravnom kontaktu s različitom mikrobiotom, gljivičnim sporama i drugim česticama iz zraka. Mikrobiota zdravih pojedinaca najčešće sadrži *Actinobacteriu*, *Firmicutes* i *Proteobacteriu* (Bassis C.M., 2014). Prema drugom istraživanju 236 zdravih odraslih pojedinaca, najčešći mikrobi uzeti brisom iz prednjeg nosa bili su *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* i *Moraxella* (Zhou Y., 2014). Analizom briseva iz srednjeg hodnika u zdravih odraslih pojedinaca najzastupljenije bakterije bile su *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*) i *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) (Ramakrishnan V.R., 2013)

Usporedbom mikrobiote prije i nakon medikamentozne terapije KRS značajno se smanjuje raznolikost i rasprostranjenost bakterija na sluznici nosa. Također, u presječnoj studiji dokazano je da kirurško liječenje utječe na mikrobiotu u sinusima smanjujući količinu bakterija

(Feazel L.M., 2012). Kirurško liječenje jednak utjecaj ima i na gljivičnu floru koja se značajno smanjuje u sinusnim šupljinama nakon endoskopske operacija sinusa.

*S. aureus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* i *Peptoniphilus* značajnije su prisutni u bolesnika koji boluju od alergijskog rinitisa uz smanjenu zastupljenost *Prevotella* i *Streptococcus* (Lal D. K., 2017).

U gornjem dišnom putu, mikrobiota ima ključnu ulogu u Th2 imunološkom odgovoru. Poznato je da *S. aureus*, koji je prisutan na sluznici nosa i sinusa, potiče stvaranje citokina kao što su IL-5 i IL-13, koji potiču Th2 upalu (Lan, 2016). Enterotoksin B *S. aureus* potiče otpuštanje IL-5 i IL-13 utječući na Th2 limfocite (Gorski S.A., 2013). IL-5 i IL-13 aktiviraju različite vrste antigen-specifičnih B limfocita koji proizvode poliklonalni IgE. Vežanjem IgE na mastocite uzrokuju otpuštanje kemijskih medijatora kao odgovor na specifične antigene i potiču eozinofilnu upalu (Fujieda, 2019).

## 1.7. TH2 UPALA

### 1.7.1. Uloga prirodnih i adaptivnih stanica

Nakupljanje eozinofila u tkivu nosnog polipa i infiltracija drugih vrsta upalnih stanica u alergijskim i infektivnim stanjima, potaknuti su djelovanjem interleukina 4 (IL-4), interleukina 5 (IL-5) i interleukina 13 (IL-13), ključnih upalnih medijatora tipa 2 imunskog odgovora čiju uspostavu potpomažu različite prirodene i adaptivne stanične loze, posebice eozinofili, mastociti, prirodene limfoidne stanice tipa 2 (*engl. innate lymphoid cells group 2, ILC2*) i pomoćnički T limfociti tipa 2 (*engl. type 2 helper T cells – Th2*), a potencijalno važnu ulogu imaju i specijalizirane vrste prirodnih stanica nalik na T limfocite (*engl. innate-like T cells*), poput  $\gamma\delta$ T i NKT (*engl. Natural killer T*) stanica (Vogt, 2021; Born, 2010). Stanice imunskog odgovora tipa 2 redovito naseljavaju tkivna sjela izložena pojavi alergena i poznato je da imaju važnu ulogu u patogenezi alergijskih bolesti (Ryu G, 2020).

Eozinofili pripadaju podskupini diferenciranih granulocita koji cirkuliraju perifernom krvi, ali su prisutni i u brojnim tkivima, gdje izlučivanjem kemokina, citokina i citotoksičnih medijatora sudjeluju u alergijskim reakcijama i obrani od parazitarnih infekcija. U tom kontekstu, do danas su prepoznati učinci eozinofila u patogenezi atopijskog dermatitisa, alergijskog rinitisa i astme (Folci, 2021). Od ranije je poznato da su KRS i alergijski rinitis (AR) rizični čimbenici za obolijevanje od astme, a djelomično je za taj rizik odgovorna

disfunkcija epitelne barijere koja je zajednička tim kroničnim stanjima (Hellings, 2020). Eozinofili imaju važnu ulogu i u patologiji KRSsNP, o čemu svjedoči njihovo nakupljanje u polipoidnoj sluznici oboljelih. Jednom aktivirani, eozinofili stvaraju proteine, kemokine, citokine, oksidativne produkte, lipide i faktore rasta koji doprinose razvoju Th2 upalnog mikrookoliša. Pri tome, eozinofili posreduju važne učinke u remodeliranju izvanstaničnog matriksa i okolnog tkiva, pospješujući transformaciju sluznice i razvoj fibroznog tkiva u polipu (Gevaert, 2022). Svojim citotoksičnim djelovanjem, eozinofili narušavaju epitelnu barijeru sluznice nosa KRSsNP oboljelih, što dovodi do olakšanog pristupa stranih antigena do podsluznice (Shin SH, 2022). Inhalacijom alergena ujedno dolazi do izravne degranulacije mastocita i oštećenja respiracijskog epitela nosa. Upalni medijatori mastocita, i Th2 citokini IL-4 i IL-13 otpuštaju se u podsluznici nosa kao odgovor na alergene u senzibiliziranog domaćina i doprinose disfunkciji epitelne barijere. U KRS dolazi do oštećenja respiracijskog epitela s pločastom metaplazijom, destrukcijom cilija, povećanjem broja mukoznih žlijezda i hiperplazijom vrčastih stanica. U donjem dišnom putu, u remodeliranju strome sudjeluju stanice Th2 upale koje stvaraju subepitelijalnu fibrozu (Amirapu S, 2021).

Tkivna infiltracija eozinofila u bolesnika s KRSsNP posredovana je površinskom ekspresijom C-C kemokinskog receptora 3 (*engl. Chemokine receptor 3, CCR3*), koji potiče kemotaksiju i udomljavanje eozinofila u polipoidnoj sluznici, potencijalno kao odgovor na aktivaciju stromalnih stanica nosnog polipa i pojačano lučenje kemokinskog liganda CCL11 (*engl. C chemokine ligand 11*) (Jang YJ, 2018). Štoviše, pojava IgE protutijela, ključnog obilježja alergijskog odgovora, izravno potiče migraciju eozinofila, vezanjem IgE za površinske receptore koji susljednim nizom signala stimuliraju pojačani izražaj CCR3 u eozinofilima bolesnika s KRSsNP (Yu, 2023). Pojačani izražaj CCR3 i CCR4 opisan je i kod Th2 limfocitnih vrsta porijeklom iz krvi i bronhoalveolarnog epitela, koji staničnim sastavom uvelike nalikuje nosnom epitelu (Morgan, 2005). Zanimljivo, pojačan izražaj CCR3 zabilježen je i u tkivu nosnog polipa u odnosu na zdravu nosnu sluznicu (Fundová P, 2012), najvjerojatnije kao posljedica upalnog Th2 okoliša (Lv, 2018), tragom kojeg dolazi do udomljavanja i drugih imunskih stanica u polipoidnoj sluznici prvenstveno makrofaga i limfocita (Ivanovska, 2020).

## 1.7.2. Površinski i sekrecijski biljezi imunosnog odgovora tipa 2

Kako je ranije naglašeno, ključnu ulogu u nastanku Th2 upale imaju citokini IL-5, IL-9, a ponajviše IL-4 i IL-13 koji dalje aktiviraju i održavaju humoralni imunološki odgovor protiv izvanstaničnih parazita, bakterija, alergena i toksina (Carsuzaa, 2022).

IL-13 prvi je puta opisan 1983. godine, kao protein izlučen iz aktiviranih Th2 mišjih stanica, a humana varijanta izolirana je 1993. godine. Geni koji izražavaju IL-13 i IL-4 nalaze se na kromosomskom lokusu 5q31. Gen koji kodira IL-13 sadrži četiri egzona i tri introna i smješten je 12 kilobaza uzvodno od gena koji kodira IL-4. IL-4 otkriven je 1982. godine kao čimbenik proliferacije mišjih B limfocita. IL4 i IL13 strukturalno se podudaraju u 25 % aminokiselinskog slijeda i imaju brojne zajedničke uloge (Iwaszko, 2021), pri čemu se sinteza IL-4 najčešće spominje u pozadini proliferacije Th2 stanica, proizvodnje citokina i IgE protutijela, dok se učinci IL-13 povezuju s patološkim značajkama nekontroliranog imunološkog odgovora tipa 2 (hipersekreција, pretjerani odgovor dišnog puta i taloženje kolagena) (Gour N, 2015).

Zanimljivo da IL-4 i IL-13, osim nominalno pridruženih površinskih receptora (tip I i lažni IL-13 receptor), prepoznaju i zajednički heterodimerni kompleks (tip II), građen od  $\alpha$  podjedinice IL-4 receptora i  $\alpha 1$  podjedinice IL-13 receptora (Slika 4).

IL-4R $\alpha$  podjedinica nalazi se i u tipu 1 receptora koji je u međudjelovanju samo sa IL-4, iako je u hematopoetskim stanicama dokazano da IL-13 može imitirati vezanje IL-4 na tip 1 receptor, i signalizirati izražaj istih genskih meta aktivacijom tirozin kinaze JAK3 (*engl. Janus kinase 3*) i STAT6 (*engl. Signal transducer and activator of transcription 6*) (Malabarba MG, 1996). Vezanje IL-13 ili IL-4 za tip 2 receptora aktivira JAK1 i tirozin kinazu 2 (*engl. Tyrosine kinase 2 – TYK2*), što ima za posljedicu fosforilaciju i premještanje STAT6 u jezgru. Alternativno vezanje IL-4/IL-13 za tip 2 receptora aktivira i druge signalne puteve poput STAT3 (*engl. Signal transducer and activator of transcription 3*), fosfatidil inozitol kinaze (*engl. phosphatidylinozitol 3-kinase – PI3K*) i mitogen aktivirajuće protein kinaze (*engl. Mitogen activated protein kinase – MAPK*). Receptor tipa 2 nalazi na velikom broju stanica; B limfociti, eozinofili, bazofili, monociti, fibroblasti, stanice endotela, epitelne stanice dišnog puta, stanice glatkog mišićja i keratinocita (Iwaszko, 2021).

Ubrzo nakon otkrića GATA3 transkripcijskog čimbenika 1990. g., opisana je njegova važna uloga u timusnoj fazi sazrijevanja T-limfocita, i diferencijaciji naivnih CD4+ vrsta u Th2 stanice. U sisavaca, poznato je šest GATA transkripcijskih čimbenika. GATA proteini sadrže dva karakteristična Cys4 DNA-vezujuća cinkova prsta koje vežu konzervirane ciljne regije. Molekularna funkcija GATA3 najviše je proučavana u kontekstu kontrole izražaja Th2 citokina,

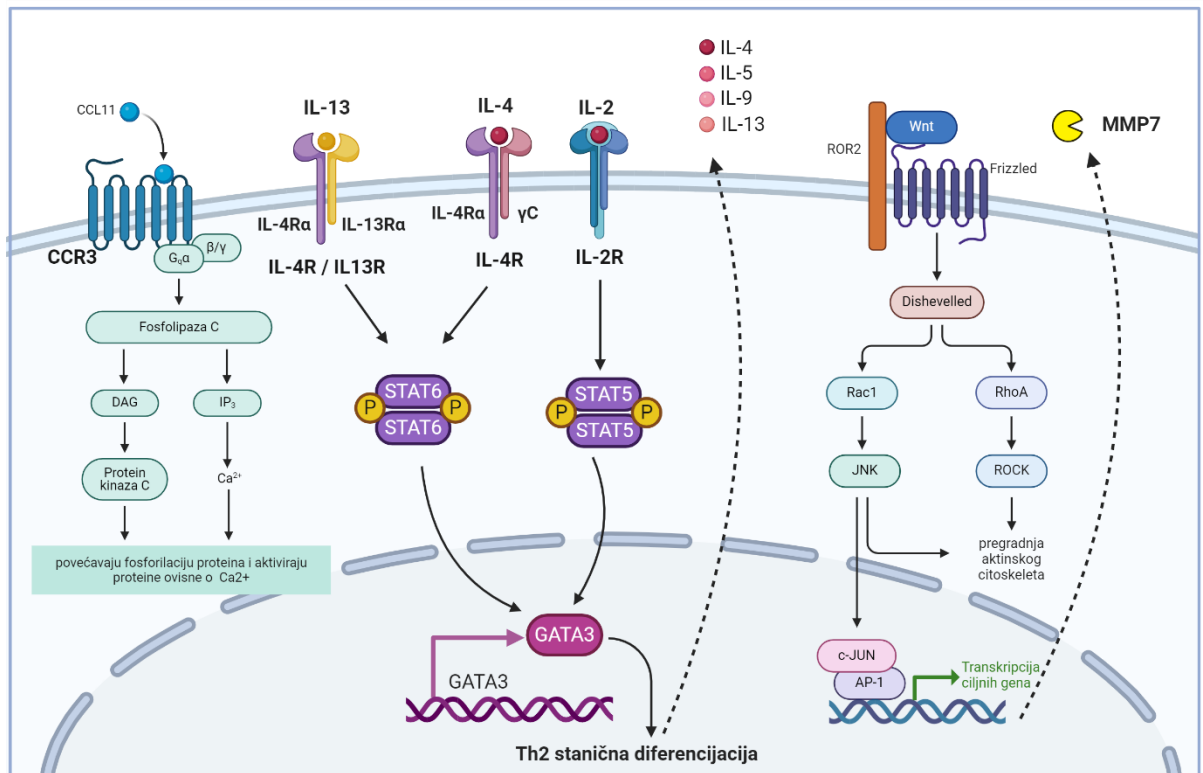
posebno IL-4, IL-5 i IL-13. Aktivacija GATA3 ujedno je neophodna za razvoj ILC2 stanica, pripadnika prirodene grane imunosti i velikih proizvođača IL-5 i IL-13 (Tindemans, 2014). Način na koji GATA3 regulira stvaranje Th2 citokina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da GATA3 prepoznaje protein MTA-2 (*engl. Metastasis-associated protein 2*), dio NuRD kompleksa koji služi za remodelaciju kromatina. GATA3 i MTA-2 zajednički se vežu na regulatorne promotorske regije gena u u kontroli izražaja Th2 citokina (Hwang SS, 2010).

CC kemokinski receptor 3 (CCR3) je transmembranski G-proteinski receptor koji izražavaju eozinofili, bazofili, mastociti i Th2 stanice. Smatra se da CCR3 pospješuje kemotaksiju i udomljavanje gore navedenih stanica u tkivima, pri čemu dolazi do degranulacije i otpuštanja medijatora upale koji uzrokuju alergijsku reakciju. Ovi procesi upućuju na važnu ulogu CCR3 u atopijskom dermatitisu (Chai, 2023), ali i u alergijskom rinitisu jer je prisutan na 50% CD4+ T-limfocita koji migriraju prema sluznici nosa, dok je na istim stanicama u perifernoj krvi prisutan u manje od 1% slučajeva (Danilova, 2015).

Imunosne stanice koje posreduju uspostavu imunskog odgovora tipa 2 izražavaju i receptor za interleukin 33 (IL-33), koji se otpušta prilikom ozljede tkiva. Th2 stanice uključene su u proces popravka tkivnih oštećenja uzrokovanih parazitarnim infekcijama, kućnom prašinom i zračnim česticama. Citokinski produkti aktiviranih Th2 stanica, IL-4 i IL-13, stimuliraju aktivaciju makrofaga i epitelnih stanica, te proizvodnju proteina izvanstaničnog matriksa (*engl. Extracellular matrix – ECM*), neophodnih za regeneraciju tkiva. U slučaju nekontrolirane sinteze upalnih citokina tipa 2, može doći do pojave patoloških promjena u sastavu izvanstaničnog matriksa, i razvoja fibroze na mjestima kronične upale. Popravlak tkiva uključuje stvaranje i razgradnju ECM u tkivu polipa i predstavlja važan proces u patogenezi KRSsNP (Du K, 2021).

Važnu ulogu u ovim procesima imaju i proteaze koje sudjeluju u održavanju homeostaze ECM, preciznije enzimi metaloproteinaze (*engl. Matrix metalloproteinase, MMP*) i njihovi tkivni inhibitori (*engl. Tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs*) (Guerra G, 2021). MMP su velika skupina izvanstaničnih proteina koji pripadaju superobitelji metaloproteinaza. Svim MMP zajedničke su dvije konzervacijske regije, pro-domena i katalitička domena, koja sadrži cinkov ion. MMP su izraženi na aktiviranim stanicama i imaju važnu ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa, proteolize izlučenih proteina i migraciji stanica (Burke, 2004). MMP2, MMP7 i MMP9 značajno su većih koncentracija u tkivu nosnog polipa u bolesnika s KRSsNP u odnosu na kontrole što ukazuje na važnu ulogu ovih proteina u stvaranju nosnih polipa (Guerra G, 2021). Na Slici 4 prikazani su biljezi upalnog odgovora tipa 2.





**Slika 4.** Površinski i sekrecijski biljezi imunskog odgovora tipa 2. Vlastiti izvor, kreirano pomoću Biorender programskog alata.

Smatra se da je Th2 adaptivni upalni odgovor najznačajniji u nastajanju nosne polipoze (Ryu G, 2020), međutim nepoznati su okidači upale, kao i uloga prirodnih limfocitnih linija u inicijaciji i održavanju Th2 odgovora u sinonazalnoj sluznici.

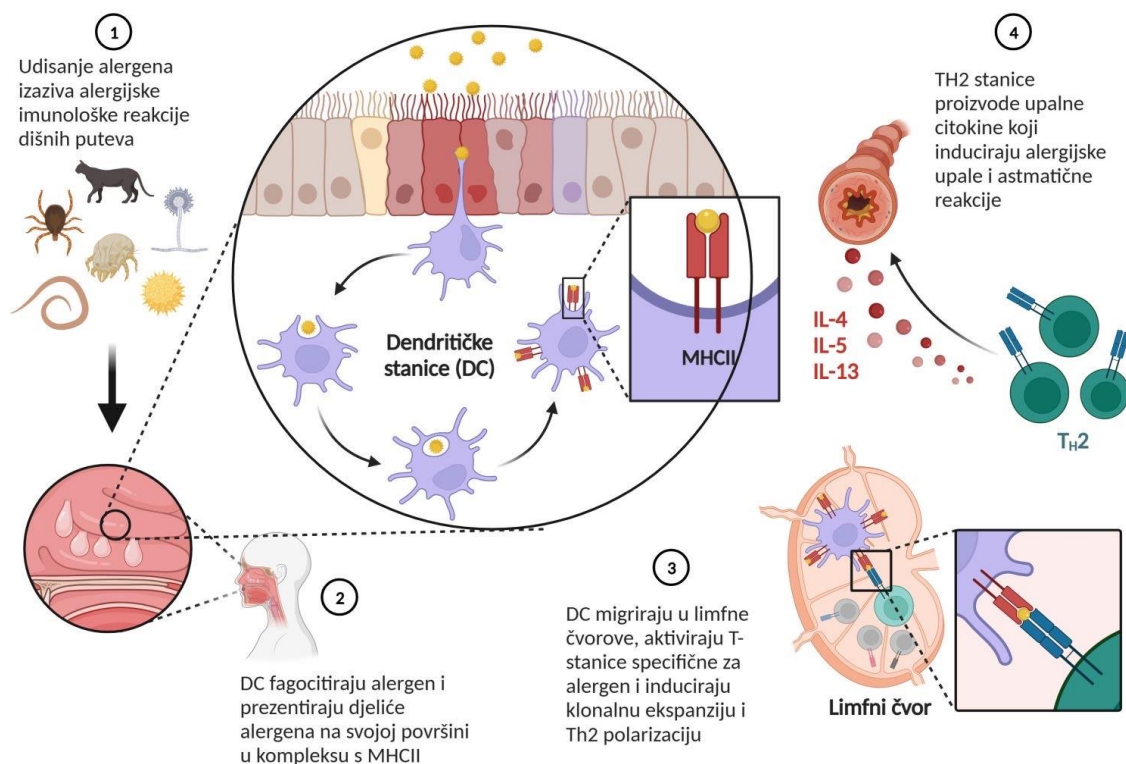
### 1.7.3. Signalni put upale sluznice nosa posredovane Th2-stanicama

Nakon invazije nosnog epitela parazitarnom infekcijom, česticama kućne prašine ili zračnim česticama, prirodne imunološke stanice reagiraju aktivacijom ovisnom o *Toll-like* receptorima (TLR), i izlučuju upalne citokine poput interferona, IL-23 i IL-33. Ovi upalni medijatori potiču izražaj timusnog stromalnog limfoidnog neoplastičnog čimbenika (*engl. thymic stromal lymphoid neoplastic factor -TSLP*) iz pogođenih epitelnih stanica. TSLP povratno izaziva odgovor urođenih limfoidnih stanica neovisnih o IL-33 (Kim BS, 2013) i aktivira lokalne dendritičke stanice na sekreciju kemokinskog liganda 22 (CCL22) i CCL17, što potiče diferencijaciju Th2 limfocita u lokalnim limfoidnim čvorovima. Kemokini igraju važnu ulogu u akutnoj i kroničnoj fazi alergijskog upalnog procesa. U Th2 upali aktiviraju stanice imunološkog sustava (mastocite i eozinofile), i potiču njihovu migraciju do nosne sluznice.

Pospješuju i aktivaciju makrofaga koji potiču B-limfocite na stvaranje alergijski specifičnog IgE protutijela. (Bao Y, 2022). Jedan od ključnih kemokinskih receptora u alergijskoj upali sluznice nosa mogao bi biti CCR3, koji je prisutan na 50% CD4+ T-limfocita koji migriraju prema sluznici nosa, dok je na istim stanicama u perifernoj krvi prisutan u manje od 1% slučajeva (Danilova, 2015).

IL-25 potiče stvaranje IL-4, IL-5 i IL-13 iz antigen prezentirajućih stanica i također pospješuje diferencijaciju Th2 limfocita (Roan, 2019), fosforilacijom STAT6 i povećanim izražajem GATA3. IL-4 važan je u diferencijaciji B limfocita u alergijski specifične B-limfocite koji produciraju IgE (Fujieda, 2019), dok je GATA3 važan za funkciju Th2 limfocita jer je uključen u remodelaciju kromatina na genskim lokusima Th2 citokina (Kokubo, 2022). GATA3 ujedno inhibira izražaj T-bet, ključnog transkripcijskog biljega imunskog odgovora tipa 1, i time jača razvoj imunskog odgovora tipa 2 (Ouyang W, 1998). Sintaza IL-5 i diferencijacija CD4+ limfocita izraženija je u polipima oboljelih od eKRS (Inuma T, 2015), i doprinosi transformaciji izvanstaničnog matriksa narušavajući ravnotežu između metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora. Prekomjerna degradacija izvanstaničnog matriksa može biti posljedica neravnoteže aktivnosti MMP i TIMPs. Li i suradnici dokazali su značajno veći udio aktivnosti MMP7 i MMP9 u sinonazalnoj sluznici bolesnika s KRS u odnosu na zdrave kontrole (Li X. W., 2019; Watelet, 2004). Značajno veće razine MMP7 zabilježene su i u bazalnim epitelnim stanicama oboljelih od teških oblika astme, što govori o važnosti ovih proteina u patogenezi alergijskih bolesti (Wadsworth, 2010). Mogući scenarij Th2 upale u sinonazalnoj sluznici prikazan je na Slici 5.

## Alergijska senzibilizacija dišnih puteva



**Slika 5.** Shematski prikaz slijeda događaja Th2 upale u sinonazalnoj sluznici. Vlastiti izvor, kreirano pomoću Biorender programskog alata.

Uspoređujući perenijalni alergijski rinitis (PAR) s kroničnim infektivnim rinitisom (KIR), dokazan je veći izražaj IL-4 i IL-5 u oboljelih od PAR. (Pawankar, 1996). IL-4 i IL-13 citokini potiču izražaj SHH (*engl. Sonic Hedgehog*) puta koji pridonosi preoblikovanju sinonazalnog epitela u alergiji dišnog puta. U preoblikovanju sluznice u astmi, IL-13 potiče metaplaziju sluznice, hipersekreciju sluzničnih žlijezda te proliferaciju fibroblasta, miofibroblasta i glatkih mišićnih stanica u bronhima. Istovremeno, IL-4 potiče stvaranje kolagena i fibronektina u podsluznici i doprinosi dugoročnom preoblikovanju sluznice u bolesnika s teškom astmom. Ranije spomenutom aktivacijom JAK3 izravno se fosforilira i aktivira STAT6 koji potiče izražaj gena odgovornih za staničnu proliferaciju, upalu, sintezu IL-4 i IL-13 citokina, kemokina, kolagena, mucina i hiperreaktivnost dišnog epitela. Suprotno tome, inhibicija STAT6 smanjuje izražaj SHH, ali i metaplaziju vrčastih stanica i hiperaktivnost dišnih puteva (Wang X, 2020). Više studija zabilježilo je prisutnost i  $\gamma\delta$  T-limfocita u Th2 upali (Li X. W., 2019; Born, 2010). Limfociti  $\gamma\delta$  T pronađeni su u mišjim i humanim modelima tijekom trudnoće u dišnim putevima bolesnika s astmom te, u jetri miševa inficiranih s

*Leishmania major*, ali i u ranim stadijima melanoma u miševa. Nije jasno zbog čega su  $\gamma\delta$  T-limfociti u značajnim količinama u tim upalama Th2 (Born, 2010).

## 1.8. GAMMA DELTA T-LIMFOCITI

T-limfociti koji se pojavljuju u respiratornoj i gastrointestinalnoj sluznici imaju važnu ulogu u regulaciji sluzničnog imunološkog odgovora na strane antigene koji dolaze na površinu sluznice. T-limfociti prepoznaju antigene preko heterodimernog površinskog receptora (*engl. T-cell receptor, TCR*). Većina T-limfocita izražava  $\alpha\beta$  TCR, koji prepoznaju i vežu peptidne antigene u kompleksu s molekulama glavnog sustava tkivne histokompatibilnosti (*engl. major histocompatibility complex, MHC*). Drugi oblik heterodimernih receptora izražavaju  $\gamma\delta$  T stanice, koje pak prepoznaju nepeptidne, često lipidne, mikrobne antigene u kompleksu s neklasičnim antigen predočnim molekulama kao što su CD1 i MR1 (*od engl. MHC class I-related protein.*)

### 1.8.1. Građa $\gamma\delta$ T staničnog receptora

Raznolikost  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca,  $\gamma\delta$  T staničnog receptora ( $\gamma\delta$ TCR), ovisi o rekombinaciji više različitih V (14 za  $\gamma$ -lanac, 8 za  $\delta$ -lanac), D (3 samo za  $\delta$ -lanac) i J (5 za  $\gamma$ -lanac, 4 za  $\delta$ -lanac) genskih varijanti smještenih unutar lokusa TRG (7p15-p14) i TRD (14q11.2) (Hirata, 2000). Sposobnost odgovora  $\gamma\delta$  T limfocita na različite nepetidne antigene počiva na preuredbi ovih genskih segmenata u svrhu sinteze raznolikih  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca, pri čemu se najprije povezuju pojedine D i J varijante, kojima se potom pridružuje jedan V segment. Sinteza varijabilne polipeptidne domene T staničnog receptora podrazumijeva nasumično spajanje (somatsku rekombinaciju) VDJ genskih segmenata, pri čemu  $\alpha$  i  $\gamma$  lanac nastaju rekombinacijom gena V (49 TRAV+5 TRAV/TRDV za  $\alpha$ -lanac, 12-15 za  $\gamma$ -lanac) i J (61 za  $\alpha$  lanac, 5 za  $\gamma$ -lanac), dok se  $\beta$  i  $\delta$  lanci generiraju preslagivanjem gena V (66 za  $\beta$ -lanac, 3 TRDV+5 TRAV/TRDV za  $\delta$ -lanac), D (2 za  $\beta$ -lanac, 3 za  $\delta$ -lanac) i J (14 za  $\beta$  lanac, 4 za  $\delta$ lanac) (The international ImMunoGeneTics information system. Locus and genes., 2022).

U ljudi, TRD lokus smješten je unutar TRA lokusa. Tri uniformna V $\delta$  alela, TRDV1, 2 i 3 koriste se za klasifikaciju TCR- $\delta$ 1, - $\delta$ 2 i - $\delta$ 3 lanace. Različitim kombinacijama V, J i D regija nastaju različiti antigenski receptori (Deniger, 2014). TRAV i TRDV genski dijelovi

kompatibilni su za preuređivanje s TRDD genskim dijelovima (Lee YN, 2009). Konstantne polipeptidne regije  $\alpha$  i  $\delta$  lanaca kodirane su jednim (TRAC ili TRDC), a  $\beta$  i  $\gamma$  lanaca s jednim od dva C gena prisutna unutar TRB i TRG lokusa. U okviru varijabilnih domena  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - i  $\delta$ -polipeptidnih lanaca nalaze se komplementarne CDR regije (*engl. Complementary Determining Region*) odgovorne za prepoznavanje antigena. CDR1 i CDR2 domene kodirane su germinativnim varijantama V gena, i smještene iza vodeće peptidne sekvence na amino kraju polipeptidnih lanaca, dok se najvažnije promjene događaju unutar CDR3 regije koja obuhvaća V(D)J spojnicu (Merleev, 2018).

### 1.8.2. Fenotipska i funkcijska raznolikost humanih $\gamma\delta$ T limfocita

$\gamma\delta$  T limfociti čine do 5 % limfocita T u krvi, i čak 10-100 % T limfocita u sluznicama i epitelu pluća, crijeva i kože (Nielsen, 2017). U ljudi je opisano više  $\gamma\delta$  T subpopulacija čiji je biološki značaj nejasan. Prema repertoaru  $\delta$  lanaca,  $\gamma\delta$  stanice najčešće se dijele u tri razreda ( $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$ ), od kojih  $\delta 2^+$  stanice dominantno prebivaju u perifernoj krvi i najčešće izražavaju  $\gamma 9$  lanac, dok  $\delta 1/\delta 3$  linije uglavnom nalazimo u tkivima i sluznicama, a izražavaju raznolike  $\gamma$ -lance ( $\gamma 2, \gamma 3, \gamma 4, \gamma 5, \gamma 8, \gamma 9$ ) (Zarobkiewicz, 2021). U postnatalnom timusu 15% ukupne količine  $\gamma\delta$  T-limfocita čine  $V\delta 2^+$  stanice, a 80%  $V\delta 1^+$  stanice (Vaessen LMB, 1996). Postoje i dvostruko negativne stanice ( $V\delta 1-V\delta 2^-$ ), odnosno stanice koje na svojoj površini nemaju prisutan ni  $\delta 1$  ni  $\delta 2$  lanac, a prema dosadašnjim istraživanjima čine manjinu u  $\gamma\delta$  T-limfocitima (Rutishauser, 2019). T-limfociti  $V\delta 1$  i  $V\delta 2$  izražavaju i receptore TLR (*engl. toll like receptor*) i NK (*engl. Natural killer*), što im omogućava odgovor na mnoge mikrobne antigene te transformirane i inficirane stanice domaćina. Jednom aktivirani  $\gamma\delta$  T-limfociti izražavaju brzi efektorski odgovor lučenjem citokina, kemokina, antiviralnih i antimikrobnih čimbenika, a mogu djelovati citotoksično i prema tumorskim stanicama (Caccamo N, 2006; Agrati CC, E., 2009.). Periferni udjeli  $\gamma\delta$  T-limfocita značajno se smanjuju u starijoj dobi, ponajviše odjeljak  $\delta 2^+$  stanica. Ove promjene su štoviše, izraženije u ispitanika muškog spola u odnosu na ženske ispitanike iste dobi. Osim dobi i spola, udjeli  $\gamma\delta$  T-limfocita variraju i u odnosu na rasu, pa tako bijelci posjeduju dvostruko manje  $\gamma\delta$  T stanica u usporedbi sa Zapadnim Afrikancima. Zanimljivo, kod Europljana oko 70%  $\gamma\delta$  T-limfocita sadrži  $\gamma 9$  lanac u perifernoj krvi (Bank, 2014). Ovisno o izražaju upalnih citokina i površinskih biljega,  $\gamma\delta$  T-limfociti mogu se podijeliti u više funkcionalnih podtipova nalik različitim inačicama adaptivnih T-limfocitnih linija, stoga se često nazivaju  $\gamma\delta$  T-limfocitima nalik na Th1, -Th2, -Th9, - Th17, -Tfh, -Treg (*od engl.*

*regulatory T*) ili antigen-prezentirajuće stanice. Fenotip  $\gamma\delta$  T-limfocita u ljudi najčešće se klasificira na temelju izražaja određene varijabilne (V) regije TCR $\delta$  lanca. Različiti podtipovi  $\gamma\delta$  T-limfocita razlikuju se prema V genima zbog čega i mogu prepoznati različite antigene i prezentirajuće molekule. Npr, humani  $\gamma\delta$  TCR koji se koristi genima V $\gamma$ 9 i V $\delta$ 2 često prepoznaju butyrophilin 3A1 združen s fosforiliranim metaboličkim produktima sinteze izoprenoida u ciljnim stanicama (Yang, i dr., 2019). Drugi butirofilini, poput CD1d, mogu biti meta drugih podskupina humanih  $\gamma\delta$  T-limfocita, koji su definirani lancem V $\delta$ 1 (Melandri, i dr., 2018) (Adams, Gu, & Luoma, 2015). Većina  $\gamma\delta$  T-limfocita uz  $\gamma\delta$ TCR, izražavaju CD8 koreceptorske molekule ili CD8- CD4- (dvostruko negativni) koreceptorski profil, a vrlo rijetko izražavaju CD4. Velik broj  $\gamma\delta$  T-limfocita diferencira se i mobilizira u fetalnom timusu, odakle migriraju u periferna tkiva, gdje zatim posreduju brze, citotoksične učinke u obrani od brojnih virusnih i bakterijskih infekcija.

Limfociti  $\gamma\delta$ T imaju važnu obrambenu i regulacijsku ulogu u infektivnim, upalnim i tumorskim procesima, te potpomažu regeneraciju epitela i sluznica. Uloga  $\gamma\delta$ T-limfocita u kroničnim upalnim bolestima dišnog sustava kao plućna tuberkuloza, astma, alergijski rinitis, pokazuju da te stanice mogu migrirati u sluznice gornjeg i donjeg dišnog puta i sudjelovati u stvaranju kronične upale (Hahn, 2004). Također,  $\gamma\delta$  T-limfociti predstavljaju prvu liniju obrane površine sluznice. Međutim, snažna izvršna uloga i nizak prag aktivacije  $\gamma\delta$  T-limfocita, predstavljaju rizični čimbenik za poremećaj homeostaze sluznice (Kang I. K., 2023). Međutim, mehanizam kojim  $\gamma\delta$  T-limfociti reguliraju upalu tipa 2 u KRSsNP još uvijek je nerazjašnjen.

Osim uloge u kroničnim upalnim procesima, u miševima je dokazana prisutnost pojedinih podtipova  $\gamma\delta$  T-limfocita poput V $\gamma$ 6, V $\gamma$ 4 i V $\gamma$ 1 u tumorskom mikrookolišu. Limfociti V $\gamma$ 6 glavni su upalni T-limfociti u tumoru i produciraju dominantno IL-17 uz druge upalne citokine IL-22, GM-CSF i IL-8 (Fleming, 2017). Također, brojni tumori ekspimiraju NKG2D ligande i druge stres inducibilne molekule za koje je dokazano da ih  $\gamma\delta$  T-limfociti mogu prepoznati i uništiti (Wrobel P, 2007).

### **1.8.3. Uloga gamma delta T-limfocita u eKRS**

Do danas se brojnost i fenotip  $\gamma\delta$  T limfocita u eKRS istraživala u većem broju studija, ali je njihova konačna uloga i dalje nerazjašnjena, ponajviše radi značajnih razlika u veličini, demografiji i rasi ispitivanih populacija, te brojnim kliničkim i fenotipskim varijetetima bolesti. Šarenilu rezultata pridonose i studije na mišjim modelima, koji se obzirom na značajne razlike

u građi i sastavu TR genskih lokusa, te fenotipskim, funkcijskim i tkivnim razlikama u kontekstu  $\gamma\delta$  T subpopulacija, ne mogu izravno uspoređivati, ali mogu služiti za generiranje i testiranje novih hipoteza.

Mišje  $\gamma\delta$  T stanice dijele se temeljem razlike u izražaju  $\gamma$  lanaca u 6 podrazreda ( $\gamma$ -1,-2,-4,-5,-6 i -7), dok se humane  $\gamma$  genske varijante dijele u 4 podskupine, pri čemu V $\gamma$ I uključuje  $\gamma$ 2,-3,-4,-5 i -8. Od preostale tri V $\gamma$  podskupine, jedino je V $\gamma$ 9 (iz V $\gamma$ II skupine) genska varijanta funkcionalna. Uspoređujući prisutnost u tkivu i utjecaj mikrookoliša na  $\gamma\delta$  T-limfocite, ljudske i mišje  $\gamma\delta$  T-limfocitne vrste izražavaju različiti tkivni tropizam. Primjerice,  $\delta$ 1- $\delta$ 2-subpopulacija je uz  $\delta$ 1+ stanice najzastupljenije subpopulacija u plućima ljudi, dok su  $\gamma$ 1+,  $\gamma$ 4+ i  $\gamma$ 6+ vrste najzastupljenije u mišjim plućima (Qu, 2022). Nadalje, dominantna periferna populacija V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 u ljudi, nema svoj pandan miševa, kao što ni mišje V $\gamma$ V $\delta$ 5 stanice ne pronalazimo u ljudi (Pang DJ, 2012). Prijašnje imunohistokemijske analize nosne sluznice oboljelih sa (KRSsNP) i bez (KRSbNP) nosnih polipa, pokazuju značajno veći broj  $\gamma\delta$  T-limfocita u nosnoj sluznici KRSsNP u usporedbi s tkivom KRSbNP i zdravih ispitanika. Štoviše, brojnost  $\gamma\delta$  T limfocita povezana je sa većom stopom recidiva nosne polipoze, kao i s težim nalazima tkivne eozinofilne infiltracije. U istoj studiji, zabilježen je pojačani izražaj V $\gamma$ 1 mRNA (*engl. messenger ribonucleic acid, mRNA*) na sinonazalnoj sluznici bolesnika s KRSsNP u usporedbi s kontrolama (Lee W. C., 2017). U sinonazalnoj sluznici oboljelih od eozinofilnog oblika KRSsNP zabilježena je pojačana sekrecija IL-4, IL-5, IL-13, GATA3 i eozinofilnog kationskog proteina (EKP) (Li X. W., 2019), dok je u studiji Babe i suradnika (Baba, 2015), opisan značajno niži izražaj GATA3 u bolesnika s kroničnom polipozom. Prema Seki i suradnicima, poticajem proizvodnje citokina IL-4 povećava se stvaranje i GATA3 u mišjih modela (Seki, 2004). Li i suradnici također su zabilježili i povećani udio  $\gamma\delta$  T-limfocita (Li X. W., 2019), što potvrđuje važnu ulogu  $\gamma\delta$  T-limfocita i upalnog odgovora tipa 2 u KRSsNP. Mišje V $\gamma$ 6 T stanice proizvode IL-17, dok  $\gamma\delta$  T-limfociti nalik Th17 limfocitima, pojačavaju infiltraciju neutrofila i eozinofila u akutnoj fazi upale, ali imaju protuupalne učinke u kroničnoj fazi. Ljudske V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 T stanice mogu pokazivati karakteristike slične Th1 ili Th2 upali kao odgovor na određene vrste stimulacije (Hsu, 2023). Štoviše, u mišjim modelima, uočeno je da primjena anti-V $\gamma$ 1 protutijela smanjuje upalni odgovor tipa 2 i eozinofilnu infiltraciju, ali je potencijalna uloga humanih  $\delta$ 1,  $\delta$ 2 i  $\delta$ 3 podvrsta u uvjetima upale eKRSsNP u potpunosti nepoznata.

U ovoj studiji istražila se pojavnost  $\gamma\delta$  T-limfocita i njihovih podskupina u nosnim polipima u bolesnika s dokazanim eKRSsNP i usporedila se s uzorcima srednje nosne školjke

istih bolesnika i srednje nosne školjke u kontrolnoj skupini. Također, uspoređivane su i istražene povezanosti između kliničkih pokazatelja bolesti eKRS s frekvencijom pojavnosti stanica  $\gamma\delta T$  i njihovih podskupina.



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

1. Odrediti udio  $\gamma\delta$  T-limfocita i njihovih subpopulacija ( $V\delta 1+$   $V\delta 2-$ ,  $V\delta 1-$   $V\delta 2+$ ,  $V\delta 1-$   $V\delta 2-$ ) u sluznici srednje nosne školjke i nosnog polipa oboljelih od eKRSsNP te usporediti s udjelom istih staničnih populacija u sluznici srednje nosne školjke kontrolnih ispitanika.
2. Ispitati povezanost kliničkih pokazatelja težine bolesti (udio eozinofila u sluznici nosa, ukupni IgE, Lund Mackeyjeva i Malmova klasifikacija), biokemijskih upalnih biljega (hsCRP) te kvalitete života (SNOT-22), s tkivnim udjelima i fenotipom  $\gamma\delta T$  vrsta.
3. U populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz nosnih polipa i srednje nosne školjke eKRSsNP oboljelih i kontrolnih ispitanika, istražiti i usporediti izražaj i zastupljenost  $V\delta 1$ ,  $V\delta 2$ ,  $V\delta 3$  mRNA, transkripcijski profil gena u kontroli razvoja imunskog odgovora tipa 2 (IL-4, IL-13, GATA3, CCR3 i MMP7).

## **3. MATERIJALI I METODE**

---

### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Bolesnici i klinička evaluacija proširenosti eKRSsNP**

U istraživanju je sudjelovalo 84 bolesnika koji su podijeljeni u dvije skupine, a potom jedna skupina na dodatne dvije. 43 bolesnika hospitalizirana su u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata radi operativnog zahvata -FESS zbog KRSsNP i prema kliničkim i laboratorijskim kriterijima zadovoljavaju dijagnozu eozinofilnog kroničnog rinosinitisa s nosnom polipozom (eKRSsNP) te su svrstani u skupinu KRSsNP. Sve bolesnike operirao je isti kirurg. Za kontrolnu skupinu odabran je 41 uzastopni ispitanik koji je hospitaliziran u Klinici zbog drugih rinokirurških operacija (npr. rinoseptoplastika, septoplastika, redukcija donjih nosnih školjki), a ujedno i nemaju dijagnozu KRSsNP. Za procjenu kliničkog stanja bolesnika koristile su se dvije najvažnije dijagnostičke metode – endoskopski pregled i CT dijagnostika paranazalnih sinusa. Za evaluaciju stupnja nosne polipoze koristi se međunarodno prihvaćena klasifikacija po Malmu (klasifikacija Malm), koja s obzirom na stupanj opstrukcije nosnih šupljina polipoidnim tvorbama, klasificira stupanj nosne polipoze bodovima od 0 do 4, pri čemu 0 označava stanje bez nosne polipoze, a 4 prolaps nosnih polipa izvan nosne šupljine. Isključni kriteriji bili su: <18 godina, poznata alergijska sklonost, prisutnost astme, preosjetljivosti na salicilate, onkološki bolesnici, korištenje intranazalnih ili oralnih kortikosteroida, antihistaminika i antibiotika unutar mjesec dana prije planiranoga operativnog zahvata.

#### **3.1.2. Upotrijebljene kemikalije**

- DMEM sa L-glutaminom (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- FBS (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- DMSO (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- 1mM Na-piruvat
- Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada)

- LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- TRIzol™ Reagent Invitrogen™
- RNA Later
- Human TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD)
- anti-human CD3εFITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma)
- Anti-human TCRγδ PE-Cy7 (BioLegend, klon B1)
- Anti-human TCRVδ1 APC (eBiosciences, klon TS8.2)
- Anti-human TCRVδ2 PerCP/CY5.5 (BioLegend, klon B6)
- Direct-zol RNA Microprep Kit (Zymo Research, SAD)
- Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen, SAD)
- PrimeScript™ RT Reagent Kit-a (Takara Bio, SAD)
- TaqMan komercijalni kompleti početnica i fluorescentno obilježenih proba (Tablica 3. i Tablica 4)
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

**Tablica 3.** Popis gotovih, pred-dizajniranih kompleta TaqMan proba i početnica.

<b>Pristupni broj mRNA u NCBI bazi podataka</b>	<b>Pristupni broj pred-dizajniranih početnica i TaqMan proba</b>	<b>Naziv genskog produkta</b>	<b>Veličina PCR produkta (pb)</b>
NM_001101.3	Hs99999903_m1	Aktin beta	171
NM_000589.3	Hs00174122_m1	Interleukin 4	70
NM_002188.2	Hs00174379_m1	Interleukin 13	82
NM_001002295.1	Hs00231122_m1	GATA vezujući protein 3	80
NM_001837.3	Hs00266213_s1	CC kemokinski receptor 3	75
NM_002423.4	Hs01042796_m1	Matriksna metaloproteinaza 7	64

NCBI – od engl. *National Center for Biotechnology Information*; FAM – 5' reporter fluorescentna boja (fluorescein); MGB – od engl. *minor groove binder* (3' biljeg za utišavanje fluorescentnog signala reporter boje s 5' kraja TaqMan probe); pb – parovi baza.

**Tablica 4.** Popis na zahtjev dizajniranih kompleta TaqMan proba i početnica namjenjenih za analizu fuzijskih prijepisa humanih TRDV gena.

Popis početnica preuzet iz (Boria, 2008) (Lev A, 2012)

Ciljni fuzijski prijepisi TRDV gena	Puni naziv TRDV gena	Pristupni broj mRNA u NCBI bazi podataka	Pristupni broj dizajniranih početnica i TaqMan proba	Početnice i probe u 5'-3' smjeru	Nukleotidni slijed	Pozicija unutar prijepisa	Veličina PCR produkta (pb)
TRDV1	T-stanični receptor, mRNA delta lanca varijabilne varijante 1	X06557.1	APGZPMN	FWD	5'-ATGCAAAAAGTGGTCGCTATT-3'	247-268	<b>212</b>
				REV	GGATGGTTTGGTATGAGGCTG	439-459	
				TAQMAN	FAM-CTAGAAGATTCAGCAAAGTA-MGB	325-344	
TRDV2	T-stanični receptor, mRNA delta lanca varijabilne varijante 2	X53849.1	APH6H7K	FWD	GCCATTGAGTTGGTGCCTGA	87-106	<b>383</b>
				REV	GGATGGTTTGGTATGAGGCTG	450-470	
				TAQMAN	FAM-AAGCGATCGGTAACACTACTA-MGB	169-186	
TRDV3	T-stanični receptor, mRNA delta lanca varijabilne varijante 3	X13953.1	APNKZJG	FWD	TGTGACAAAGTAACCCAGAG	110-129	<b>393</b>
				REV	ATGGTTTGGTATGAGGCTG	485-503	
				TAQMAN	FAM-CGACACTGTATATTCAAATC-MGB	184-203	

NCBI – od engl. *National Center for Biotechnology Information*; FWD – vodeća početnica; REV – povratna početnica; FAM – 5' reporter fluorescentna boja (fluorescein); MGB – od engl. *minor groove binder* (3' biljeg za utišavanje fluorescentnog signala reporter boje s 5' kraja TaqMan probe); pb – parovi baza.

## 3.2. METODE

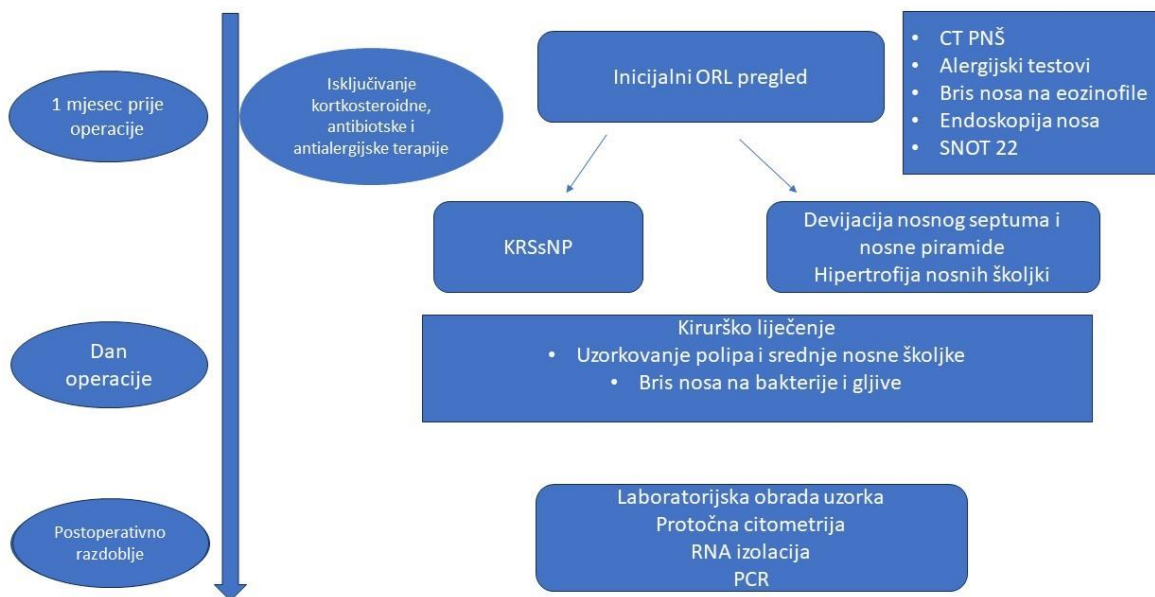
### 3.2.1. Laboratorijska obrada ispitanika i uzoraka

Unutar dijagnostičke obrade svih bolesnika uključenih u istraživanje učinjena je analiza visoko osjetljivog C- reaktivnog proteina (hsCRP, od *engl. high-sensitivity C reactive protein*), alergološka obrada (ukupni IgE, probir na nutritivne i inhalacijske alergene, obrisak nosa na eozinofile), endoskopski pregled, radiološka obrada (CT glave i paranazalnih šupljina). Stupanj proširenosti bolesti određen je na temelju endoskopskog pregleda (Slika 6) (Malm klasifikacija) i nalaza CT glave i PNSŠ (Lund Mackey). Osim toga, svi bolesnici ispunili su upitnik sinonazalnog ishoda 22 (od *engl. Sino-nasal Outcome Test 22, SNOT-22*), koji ispituje kvalitetu života bolesnika. Svi bolesnici ispunili su zdravstveni upitnik na kojem su se, osim komorbiditeta, zabilježili i demografski te opći podaci, uključujući spol, dob, alergije na lijekove i pušenje.



**Slika 6.** Endoskopija nosa – nosna polipoza u nosnom kavumu. Vlastiti izvor.

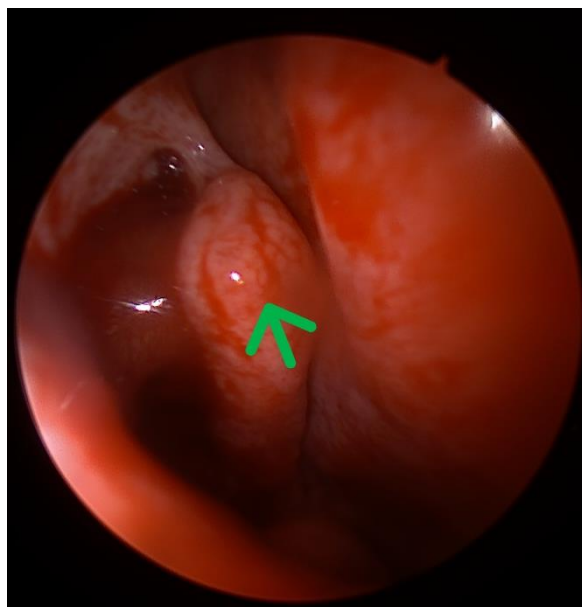
Bolesnicima su dodijeljeni kodirani identifikacijski brojevi koji su se koristili tijekom prikupljanja i analize bioloških uzoraka te interpretacije rezultata. Svi primijenjeni postupci probira bolesnika i obrade uzoraka odobreni su odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Osijek (Broj: R2-7990/2021) te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (UR. BROJ: 2158-61-07-21-155). Cijeli postupak obrade bolesnika i uzoraka prikazan je na Slici 7.



**Slika 7.** Shematski prikaz odabira i pripreme bolesnika za istraživanje. Vlastiti izvor.

### 3.2.2. Uzorkovanje tkiva sinonazalne sluznice i nosnog polipa

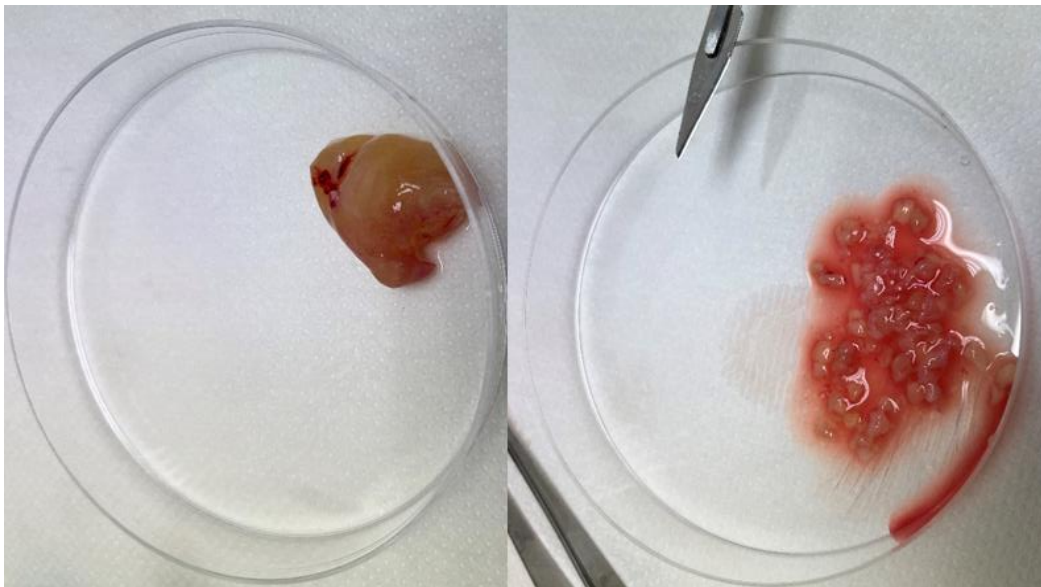
Ispitanicima uključenima u studiju, uzorkovao se polip i sluznica srednje nosne školjke tijekom operativnog zahvata (Slika 8). Kontrolnoj se skupini tijekom drugih rinoloških operacija (npr. septoplastika, rinoseptoplastika, dekompresija orbite) uzorkovala sluznica srednje nosne školjke. Nakon uzorkovanja, preparati su se pohranili u plastične bočice ispunjene transportnim medijem (DMEM sa stabilnim glutaminom, 10% FBS, 10 mM HEPES, 1% penicilin/Streptavidin, 1mM Na-piruvat, 1 x neesencijalne aminokiseline) i u roku od 1h transportirani su u Laboratorij za analizu DNA Medicinskog fakulteta Osijek, gdje se provela njihova daljnja obrada i analiza. Dio uzoraka poslan je na rutinsku analizu PHD.



**Slika 8.** Tijekom operativnog zahvata FESS - zelena strelica označava mjesto uzorkovanja srednje nosne školjke. Vlastiti izvor.

### 3.2.3. Izolacija i kriokonzervacija mononuklearnih stanica iz tkiva

Svježi uzorci bioptata usitnili su se maceracijom tkiva (Slika 9) u transportnom mediju i zatim inkubirali na rotatoru (LabRoller™ H5100), 30 minuta na 37 °C pri brzini od 50 rpm/min. Suspenzija usitnjenog tkiva u nastavku dodatno se homogenizirala s pomoću uređaja gentleMACS Dissociator (Milteny Biotec, Auburn, SAD) i profiltrirala preko filtera promjera 70 µm kako bi se oslobođen stanice odvojile od ostataka tkiva.



**Slika 9.** Uzorak polipa i maceracija tkiva u transportnom mediju. Vlastiti izvor.

Populacija tkivnih mononuklearnih stanica izdvojila se od eritrocita i granulocita postupkom centrifugiranja (800 g, 25 min, 25 °C) u gradijentu gustoće Lymphoprep medija (Axis Shield, Oslo, Norveška) (Slika 10). Lymphoprep™ sterilni je gradacijski medij, gustoće 1,077 g/mL, koji se koristi za razdvajanje polimorfonuklearnih i mononuklearnih krvnih populacija na temelju razlike u gustoći.

U praznu epruvetu volumena 15 mL pipetirano je 5 mL medija Lymphoprep. Prethodno pripremljen macerirani uzorak tkiva s transportnim medijem pažljivo je nanesen na površinu medija Lymphoprep pazeći da se dvije otopine ne pomiješaju. Pripremljeni uzorci centrifugirani su na sobnoj temperaturi 25 minuta brzinom od 800 g, uz veličinu ubrzanja 5 i isključene kočnice. Po završetku centrifugiranja bjeličasti sloj PBMC stanica, smješten između plazme i medija Lymphoprep, pažljivo je skupljen i prebačen u novu epruvetu od 15 mL, bez dodirivanja taloženih eritrocita i granulocita. Prikupljeni volumen PBMC stanica nadopunjen je fosfatnim



puferom (engl. *Phosphate-buffered saline*, *PBS*) pH 7,5, do ukupnog volumena od 13 mL. Pripremljeni uzorci potom su centrifugirani na 25 °C, 10 minuta, brzinom od 800 g, uz najveće moguće vrijednosti ubrzanja i kočenja. Nastali je supernatant odbačen, a taložene stanice resuspendirane su u 2 mL pufera PBS. Brojnost vijabilnih mononukleara u konačnom izolatu utvrdila se brojenjem pomoću automatskog brojača stanica Luna.



**Slika 10.** Odvajanje mononuklearnih stanica od eritrocita postupkom centrifugiranja. Vlastiti izvor.

Za potrebe brojenja, 50  $\mu$ l suspenzije PBMC stanica pomiješano je s 100  $\mu$ l tripan plavila. Pripremljena suspenzija nanescna je na komoricu te su izbrojane vijabilne (nebojene) stanice. Ovisno o brojnosti izoliranih stanica, pripremljeni su alikvoti za protočnu citometriju i alikvoti za izolaciju RNA (ribonukleinska kiselina, engl. *Ribonucleic acid*, RNA), pri čemu je za RNA izolaciju odvojeno najmanje 50 000 stanica u 100  $\mu$ l TRIzol reagensa, a ostatak stanične suspenzije iskorišten je za protočnu citometriju.

### 3.2.4. Imunofenotipizacija $\gamma\delta$ T-limfocita metodom protočne citometrije

Zastupljenost ukupnih  $\gamma\delta$  T-limfocita i njihovih subpopulacija ( $V\delta 1+V\delta 2^-$ ,  $V\delta 1-V\delta 2^+$ ,  $V\delta 1-V\delta 2^-$ ) u ukupnim izoliranim mononuklearnim stanicama sluznice srednje nosne školjke i nosnog polipa određena je metodom protočne citometrije. Za pripremu uzoraka i bojanje površnih staničnih antigena za protočnu citometriju korišteni su standardni protokoli dostupni na [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

Protočna citometrija (*eng. flow cytometry, flow cytofluorometry ili flow microfluorometry*) analitička je multiparametrijska metoda koja se najčešće koristi za kvantitativnu i kvalitativnu analizu stanica te za sortiranje stanica unaprijed određenih karakteristika iz ispitivanog uzorka. Od kvalitativnih podataka omogućava nam analizu unaprijed definiranih željenih fizikalnih (veličina stanice, unutarstanična struktura i stupanj granuliranosti) i kemijskih osobina stanica (prisutnost ili odsutnost površinskih i/ili unutarstaničnih i/ili nuklearnih proteina; deoksiribonukleinske kiseline (*eng. Deoxyribonucleic acid*, DNA), količine kalcija).

Uređaj se sastoji od tri dijela: (a) sustava za protok stanica (*eng. fluidics*), (b) optičkog sustava (lasera, leća i fotodetektora) te (c) elektroničkog sustava. Prije analize stanica na uređaju potrebno je pripremiti suspenziju stanica te postići tok pojedinačnih stanica tijekom same analize. Postoji nekoliko mehanizama kojima se postiže takav usmjereni tok pojedinačnih stanica, a najčešći je hidrodinamičko usmjeravanje (*eng. hydrodynamic focusing*). Ispitivane stanice protiču pojedinačno sustavom protoka stanica pri čemu budu obasjane laserskim zrakama određenih valnih duljina. Pri tome dolazi do disperzije svjetlosti ovisno o fizikalnim karakteristikama stanica te u slučaju prethodnog vezanja specifičnih protutijela obilježenih fluorokromima i do emisije fluorescencije određene valne duljine. S površine pojedinih stanica reflektira se polikromatska svjetlost, koja se sustavom filtera i dihotomnih stakalaca usmjerava na fotodetektore. Fotodetektori bilježe fotone te ih pretvaraju u elektroničke signale, odnosno pulseve napona. Analogni se podaci u suvremenim uređajima pretvaraju u digitalne podatke koji nam omogućavaju analizu dobivenih rezultata. Razlikuju se tri vrste fotodetektora: FSC-detektor (od *eng. Forward scatter*) koji nam daje podatke o veličini stanice, SSC-detektor (od *eng. Side scatter*) koji daje podatke o kompleksnosti stanične citoplazme poput granuliranosti stanica te FL (od *eng. fluorescence*) – detektori koji “hvataju” fluorescentni signal određene valne duljine, a koji potječe od fluorokroma kojim su obilježena određena protutijela za analizu kemijskih sastavnica stanice. Ovisno o odabiru dobivenih podataka zabilježenih fotodetektorima (veličine stanica, stupnja granuliranosti, kemijskog sastava) odabiremo željenu populaciju stanica za analizu. Rezultati mogu biti prikazani numerički ili grafički (histogram fluorescencije ili točkasti prikaz (*eng. dotplot*)).

#### 3.2.4.1. Izrada kompenzacijske matrice

Najčešće korišteni fluorokromi u protočnoj citometriji emitiraju polikromatsku svjetlost širokog raspona valnih duljina. Najveći se dio tog spektra filtrira i usmjerava na odgovarajući

detektor FL no zbog širokog raspona valnih duljina pojedinih fluorokroma, mali dio te svjetlosti odlazi i u susjedne detektore FL. Prije početka pokusa neophodno je s pomoću jednobojnih kontrola (SS, od *engl. single stain control*) napraviti kompenzacijsku matricu, koja nam omogućava odgovarajuću analizu podataka. Kompenzacija predstavlja udio signala u susjednom detektoru koji se oduzima stanicama koje odašilju primarni signal za dotični fluorokrom. Kompenzacije su specifične za kombinaciju napona u detektorima koje se koriste pri pojedinim mjerenjima.

#### 3.2.4.2. Isključivanje nevijabilnih stanica iz analize

Nevijabilne (mrtve) stanice bile su isključene s pomoću komercijalnog kita za određivanje vijabilnosti stanica (*LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD)*) prema uputama proizvođača. LIVE/DEAD komercijalni kit izdvaja mrtve stanice na načelu razlike u intenzitetu fluorescencije koja je veća od 50 puta između mrvih i živih stanica. Boja ima afinitet prema slobodnim aminima na površini i unutrašnjosti stanice. S obzirom na povećanu permeabilnost stanične membrane u oštećenih i mrtvih stanica, boja u te stanice ulazi olakšano te se veže za slobodne amine u unutrašnjosti stanice i na površini stanice, dok se kod živih, vijabilnih stanica kovalentno veže samo s aminima stanične membrane, zbog čega oštećene i mrtve stanice pokazuju višestruko jače fluorescentno obojenje.

#### 3.2.4.3. Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela i imunofenotipizacija PBMC stanica specifičnim fluorescentno obilježenim protutijelima od interesa i protočna citometrija

Imunološke stanice, poput B-limfocita i fagocita (monociti i graulociti), na svojoj površini izražavaju receptore za Fc segment imunoglobulina (FcR), koji im omogućava prepoznavanje opsoniziranih mikroorganizama. Tijekom obilježavanja stanica specifičnim protutijelima u svrhu analize na protočnom citometru stoga dolazi do nespecifičnog vezanja protutijela za Fc receptore i stvaranja lažno pozitivnih rezultata.

POSTUPAK: Nespecifično bojenje posredovano vezanjem protutijela za Fc receptore (FcR) blokirano je dodavanjem 5 uL reagensa Human TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon 8 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorcima je dodana smjesa specifičnih fluorescentno obilježenih protutijela, kako slijedi: CD3εFITC (klon UCHT1

gamma, donacija prof. Peter Balogh, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu), TCR $\gamma\delta$  PE-Cy7 (1:100, klon B1, BioLegend), TCRV $\delta$ 1 APC (1:100, clone TS8.2, eBiosciences) i TCRV $\delta$ 2 PerCP/CY5.5 (1:200, clone B6, BioLegend). U svim se koracima koristio fosfatni pufer (PBS) s dodatkom 0,5-1% goveđeg serumskog albumina (BSA) i 0.1% natrijevog azida (NaN<sub>3</sub>) prilagođene pH vrijednosti (pH ~7,4). Kompenzacijska matrica izračunata je s pomoću komercijalno dostupnih kompenzacijskih kuglica BD™™ CompBeads mišji Ig $\kappa$ /negativne kontrol (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i jednobojnih kontrola.

Mjerenja uzoraka provedena su na BD FACSLyric™™ protočnom citometru (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) opremljenim s trima laserima (plavi Argon 488 nm, crveni HeNe 633 nm i ljubičasti 403 nm). Podaci su se analizirali i vizualizirali pomoću programa FlowLogic (v 11,0; Inivai Technologies; Mentone; Australija).

### **3.2.5. Izolacija i mjerenje koncentracije ukupne RNA iz tkivnih mononuklearnih stanica**

Ukupna RNA izolirana je iz mononuklearnih stanica nosne sluznice pomoću komercijalno dostupnog kompleta Direct-zol™™ RNA Microprep (Zymo Research, Irvine, CA, SAD), validiranog za izolaciju RNA iz malog broja stanica ( $\leq 10^5$ ). Koncentracija izoliranih RNA uzoraka izmjerena je fluorimetrijskom metodom na uređaju Qubit 3.0., primjenom Qubit™™ RNA HS fluorescentne boje prema uputama proizvođača.

U svrhu izolacije RNA, u suspenziju razvrstanih stanica najprije je dodano 300  $\mu$ l reagensa TRIzol, a potom i jednaka količina 100 %-tnog etanola. Uzorci su dobro promiješani na miješalici vortex, postavljeni u kolonu, a zatim centrifugirani na sobnoj temperaturi, 30 sekundi pri brzini od 15 000 g. Pripremljena suspenzija propuštena je kroz filtersku kolonu, a vezani RNA materijal pročišćen je nizom susljednih ispiranja, najprije sa 400  $\mu$ l otopine 1 PreWash, a zatim sa 700  $\mu$ l otopine 2 Wash. Prije završnoga centrifugiranja na filterske kolonice dodano je 7  $\mu$ l vode DNase/RNase-Free.

U svrhu mjerenja koncentracije RNA pripremljeno je 60 uzoraka i 2 standarda u Qubit™™ Assay tubicama. Pripremljena je radna otopina razrjeđenja 1:200 od Qubit™™ RNA HS reagensa i Qubit™™ RNA HS pufera. U svaku od 60 tubica dodano je 1  $\mu$ l RNA uzorka i 199  $\mu$ l radne otopine nakon čega se otopina vorteksirala i inkubirala na sobnoj temperaturi. Za pripremu standarda 1 i 2 pomiješano je 190  $\mu$ l radne otopine s 10  $\mu$ l otopine Qubit™™ RNA HS Standarda 1, odnosno 10  $\mu$ l otopine Qubit™™ RNA HS Standarda 2. Na Qubitu (uređaj za mjerenje

koncentracije RNA) prvo su izmjerene vrijednosti fluorescencije oba standarda radi dobivanja standardne krivulje kalibracije, a nakon toga su određene i vrijednosti koncentracije RNA u uzorcima. Rezultati su izraženi u ng/ $\mu$ l. Nakon mjerenja koncentracije RNA, uzorci s koncentracijom RNA manjoj od 1.66 ng/ $\mu$ l isključeni su iz analize PCR.

### **3.2.6. Kvantitativna analiza transkriptoma mononuklearnih stanica izoliranih iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa primjenom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR)**

Analiza izražaja odabranih genskih prijepisa u mononuklearnim stanicama polipoidne sluznice i sluznice SNŠ oboljelih i zdravih ispitanika učinjena je u Laboratoriju za analizu DNA Medicinskog fakulteta u Osijeku, primjenom metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR, od *engl. quantitative real-time polymerase chain reaction*). RT-qPCR precizna je i pouzdana metoda za kvantifikaciju DNA isječaka od interesa mjerenjem fluorescentnog signala koji emitiraju ekscitirani, fluorescentno obilježeni DNA produkti nastali kao rezultat vezanja fluorescentnih boja (nespecifična detekcija) ili fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba (specifična detekcija). Fluorescentni signal raste proporcionalno količini novonastale DNA, a promjene fluorescencije moguće je pratiti u obliku amplifikacijske krivulje.

Razina fluorescencije na početku PCR reakcije (okvirno 0-18 ciklusa) ne nadmašuje pozadinsku fluorescenciju. Najbrži rast fluorescentnog signala vidljiv je pak u eksponencijalnoj fazi, kada se broj DNA kopija udvostručuje u svakom PCR ciklusu, pri čemu se vrijednost ciklusa u kojem fluorescencijski signal nadmašuje pozadinsku fluorescenciju definira kao vrijednost graničnog ciklusa ili Ct vrijednost (*engl. threshold cycle; Ct / Cq quantification cycle*). U linearnoj fazi, amplifikacija usporava zbog iskorištenja jedne ili više sastavnica reakcijske smjese te u konačnici prestaje rasti u plato fazi. Usporedbom izmjerenih vrijednosti Ct između uzoraka moguće je kvantificirati razlike u broju kopija ispitivanih genskih prijepisa. Ključni preduvjet smislene usporedbe ostvarenih RT-qPCR mjerenja jest podjednaka učinkovitost PCR amplifikacije ciljnih i kućepaziteljskih gena. Značajne razlike u učinkovitosti PCR amplifikacije između odabranih genskih meta, mogu neutralizirati, uvećati ili umanjiti postojanje stvarnih bioloških razlika između ispitivanih transkripata. Učinkovitost PCR amplifikacije stoga je potrebno utvrditi pripremom standardnih krivulja (dijagrami izmjerenih vrijednosti Ct u odnosu na logaritamske vrijednosti koncentracije serijskih razrjeđenja

standarda), amplifikacijom ciljnih i referentnih gena u najmanje 5 serijskih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije. Jednadžba pravca  $y=ax+b$ , opisuje karakter linearnog odnosa između koncentracije i  $C_t$  vrijednosti u standardnim uzorcima. U reakciji 100 % učinkovitosti očekujemo linearan porast fluorescencije u odnosu na koncentraciju, pa je stoga učinkovitost PCR reakcije moguće odrediti iz vrijednosti nagiba pravca standardne krivulje prema jednadžbi:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{nagib}}\right)} - 1$$

Nagib pravca standardne krivulje moguće je pak odrediti usporedbom omjera  $C_t$  vrijednosti i koncentracije cDNA izmjerenih u prvoj i krajnjoj točki standardne krivulje prema jednadžbi:

$$y - y_1 = \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)}(x - x_1)$$

Prisutnost ili izostanak značajne razlike u učinkovitosti amplifikacije, uvjetuje izbor matematičkih modela za procjenu veličine razlike genskog izražaja (FD, od *engl. fold difference ili fold change*), pri čemu se najčešće slijede smjernice autora Pfaffl i suradnika ili Livak i suradnika (Pfaffl, 2001; Livak KJ, 2001). Dodatni analitički preduvjeti podrazumijevaju odabir apsolutne ili relativne kvantifikacije, pri čemu prvi izbor podrazumijeva usporedbu izmjerenih  $C_t$  vrijednosti ciljnih prijepisa u uzorcima poznate i nepoznate cDNA koncentracije, a drugi pak normalizaciju zabilježenih  $C_t$  vrijednosti ciljnih gena, u odnosu na  $C_t$  vrijednosti kućepaziteljskih gena ili tzv. referentnih gena.

### 3.2.6.1. Sinteza komplementarne cDNA

Sinteza cDNA (od *engl. complementary DNA*) podrazumijeva prepisivanje mRNA u komplementarne cDNA molekule primjenom oligo dT i/ili nasumičnih heksamernih oligonukleotidnih početnica, i enzima reverzne transkriptaze (RT). U tu svrhu korišten je komercijalni komplet PrimeScript™ RT Reagent Kit-a (Takara Bio, SAD). Odabrani RNA uzorci koncentracije  $\geq 1,66 \mu\text{l}$  međusobno su najprije ujednačeni razrjeđenjem na radnu koncentraciju od  $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , i zatim u volumenu od  $10 \mu\text{l}$  združeni s komponentama RT smjese.

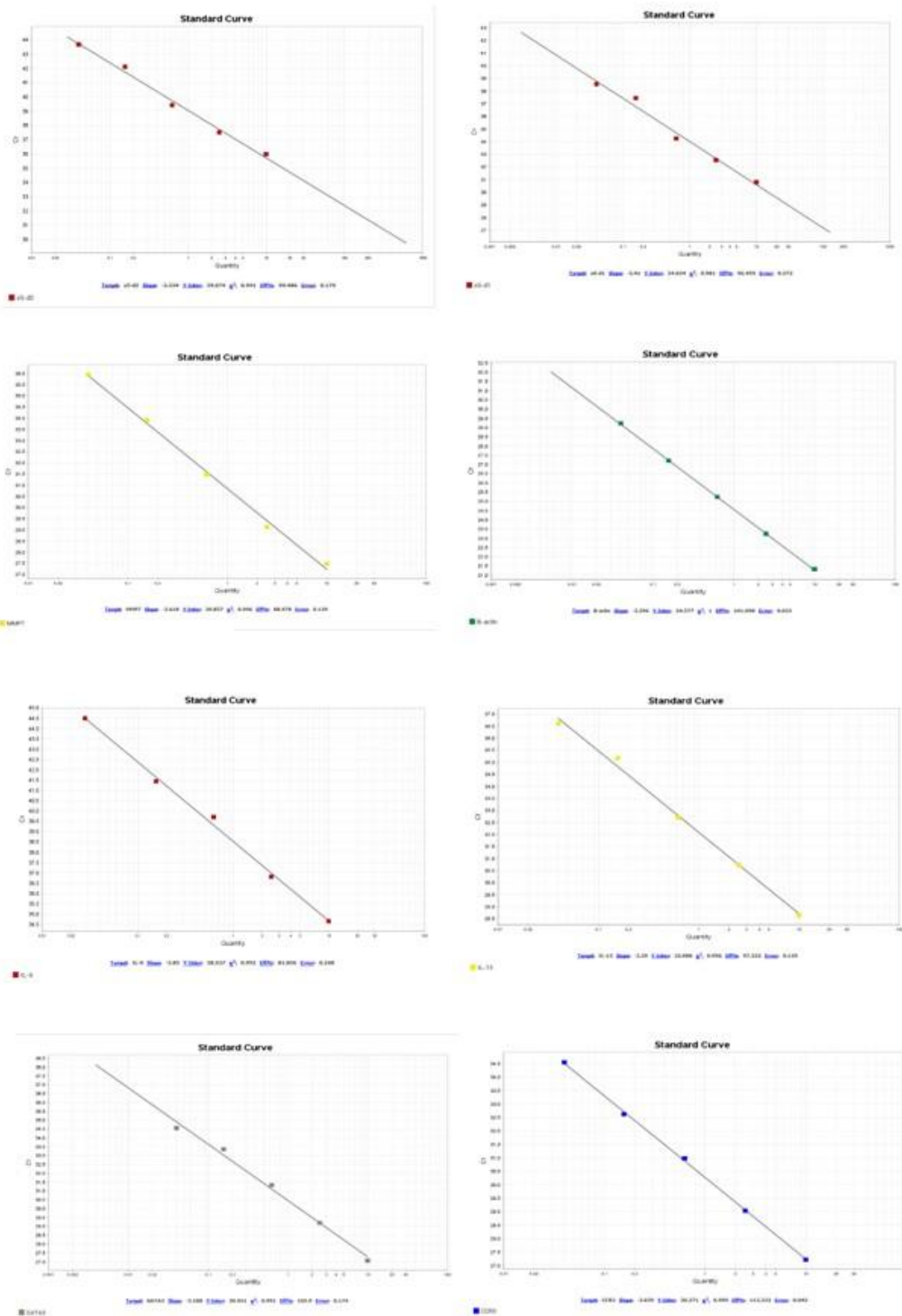
Reakcijska smjesa ukupnoga volumena  $20 \mu\text{l}$  sadržavala je  $4 \mu\text{l}$  pufera PrimeScript™,  $3 \mu\text{l}$  vode slobodne od nukleaza,  $1 \mu\text{l}$  oligo-dT početnica,  $1 \mu\text{l}$  nasumičnih heksamernih oligonukleotida ( $5 \mu\text{M}$ ),  $1 \mu\text{l}$  enzimske smjese PrimeScript™ RT te  $10 \mu\text{l}$  ukupne RNA radne koncentracije  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Nakon pripreme reakcijske smjese uzorci su inkubirani 30 minuta na  $37^\circ\text{C}$ , nakon čega je reakcija reverzne transkripcije zaustavljena zagrijavanjem  $5 \text{ s}$  na  $85^\circ\text{C}$ .

Dobivenu cDNA razrijedili smo 5 puta na ukupni volumen od 100  $\mu$ l. Uzorci su alikvotirani, i do trenutka upotrebe pohranjeni na -20  $^{\circ}$ C. Standardne krivulje ciljnih i referentnih gena pripremljene su analizom RT-qPCR 5 serijskih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije cDNA. Sva mjerenja provedena su na uređaju QuantStudio 5 real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, SAD), a podaci su se analizirali računalnim programom QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1.

### 3.2.6.2. Priprema standardnih krivulja

Standardne krivulje ciljnih i referentnih gena (Slika 11) pripremljene su RT-qPCR amplifikacijom ciljnih (TRDV1, TRDV2, TRDV3, IL4, IL13, GATA3, CCR3, MMP7) i referentnog gena (ACTB) gena u 5 serijskih razrjeđenja standardnog uzorka A, nastalog udruženjem više cDNA uzoraka, a u svrhu sinteze koncentriranog bazena svih vrsta prisutnih prijepisa, čijim se serijskim razrjeđenjem dobiva široki koncentracijski raspon za testiranje učinkovitosti PCR amplifikacije i visoko i nisko eksprimiranih genskih meta (Slika ). Pripremljeni standardi korišteni su najprije za analizu učinkovitosti amplifikacije ciljnih prijepisa, i validaciju uspješne amplifikacije u testnim cDNA uzorcima radne RNA konc. 1 ng/ $\mu$ l. Svi ispitivani TaqMan kompleti početnica i proba, osim TRDV3, pokazali su podjednako visoku učinkovitost amplifikacije cDNA kalupa, u rasponu od 81.9 – 113.3% (Slika 11). Preciznost qPCR mjerenja određena je linearnim korelacijskim koeficijentom ( $R^2$ ), koji je varirao u rasponu od 0.98-1. Sva mjerenja provedena su na uređaju QuantStudio 5 real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, SAD) u duplikatu, a podaci su analizirani računalnim programom QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1.

Za pripremu standardne krivulje, odabrano je 6 uzoraka RNA (4 iz polipoidne i 2 iz sinonazalne sluznice) koncentracijskog raspona od 6 - 22 ng/ $\mu$ l (ukupno 459,3 ng), te je za svaki uzorak učinjena reverzna transkripcija u ukupnom volumenu od 12  $\mu$ l, dodatkom 2.4  $\mu$ l pufera PrimeScript<sup>TM</sup>, 1.8  $\mu$ l vode slobodne od nukleaza, 0.6  $\mu$ l oligo-dT početnica, 0.6  $\mu$ l nasumičnih heksamernih oligonukleotida (5  $\mu$ M), 0.6  $\mu$ l enzimske smjese PrimeScript<sup>TM</sup> RT te 6  $\mu$ l ukupne RNA. Dobivena cDNA 6 uzoraka udružena je u jedan uzorak volumena 72  $\mu$ l koji je potom razrijeđen 3 puta dodatkom 216  $\mu$ l RNase free H<sub>2</sub>O na ukupni volumen od 288  $\mu$ l. U sljedećem koraku pripremljeno je 5 serijskih razrjeđenja, pri čemu je svaki uzorak razrijeđen 4 puta u odnosu na prethodni. Pripremljeni standardi su alikvotirani i do trenutka upotrebe pohranjeni na -20  $^{\circ}$ C.



Slika 11. Prikaz standardnih krivulja ispitivanih gena



### 3.2.6.3. Analiza ekspresije genskih prijepisa primjenom TaqMan komercijalnih kompleta

Razina izražaja ciljnih (TRDV1, TRDV2, TRDV3, IL-4, IL-13, GATA3) i referentnih mRNA (ACTB1) određena je metodom RT-qPCR primjenom gotovih (IL4, IL13, GATA3, CCR3, MMP7) i na zahtjev dizajniranih (TRDV1, TRDV2, TRDV3) TaqMan oligonukleotidnih proba i komercijalnog kompleta TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, Kalifornija, SAD). Tijekom qPCR reakcije, TaqMan proba specifično veže komplementarne sljedove ciljnih prijepisa, pri čemu fluorescentno zračenje reporter boje s 5' kraja TaqMan probe apsorbira molekularni prigušivač (*engl. Q-quencher*) na 3' kraju. Pri sintezi novog DNA lanca, djelovanjem enzima Taq polimeraze, dolazi do cijepanja TaqMan probe, posljedičnog razdvajanja fluorofora i prigušivača te emisije i detekcije fluorescentnog zračenja na kraju svakog ciklusa PCR. Temperaturni uvjeti i raspored pipetiranja uzoraka i standarda dizajnirani su u računalnom programu QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1., a sva mjerenja fluorescentnih signala izmjerena su na QuantStudio 5 PCR uređaju, u duplikatu.

Za pripremu reakcijske smjese ukupnog volumena 10 µl, korišteno je 5 µl komercijalnog kompleta TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), 0,5 µl odgovarajuće probe TaqMan Expression i 4,5 µl cDNA. Pripremljena reakcijska smjesa pažljivo je pipetirana u mikrotitarske jažice ploče PCR koja je zatim prelijepljena prozirnom plastičnom folijom i centrifugirana 1 minutu pri brzini od 3 000 rpm na 24 °C. Amplifikacija ciljnih i referentnih gena u svim uzorcima učinjena je u duplikatu prema unaprijed definiranom temperaturnom protokolu (Tablica 5). Standardi su bili dijelom svih pokusa qPCR i mjereni su u duplikatu.

**Tablica 4.** Program za RT-qPCR.

		Temperatura	Vrijeme
Inkubacija		95°C	10 minuta
Ciklusi (45 ciklusa)	Denaturacija	95°C	15 sekundi
	Vežanje početnica i elongacija	60°C	1 minuta
"Hold"		4°C	∞

**3.2.6.4. Relativna kvantifikacija genske ekspresije metodom 2- $\Delta\Delta C_t$** 

Relativna kvantifikacija genske ekspresije određena je u programu Microsoft Excel primjenom metode 2- $\Delta\Delta C_t$  (Livak KJ, 2001). Mjerenja ciljnih i referentnih gena izvedena u duplikatu, najprije su korištena za izračun srednjih  $C_t$  vrijednosti. Srednje  $C_t$  vrijednosti ciljnih gena izmjerene u uzorcima polipa i srednje nosne školjke (SNŠ) normalizirane su u odnosu na srednje  $C_t$  vrijednosti referentnog ACTB gena, primjenom sljedećih formula:

$$\Delta C_t \text{ eKRS (polip)} = C_t \text{ ciljni gen} - C_t \text{ kontrolni gen}$$

$$\Delta C_t \text{ eKRS (SNŠ)} = C_t \text{ ciljni gen} - C_t \text{ kontrolni gen}$$

$$\Delta C_t \text{ kontrola (SNŠ)} = C_t \text{ ciljni gen} - C_t \text{ kontrolni gen}$$

Za izračun  $\Delta\Delta C_t$  vrijednosti, od normaliziranih  $\Delta C_t$  vrijednosti oduzeta je  $\Delta C_t$  vrijednost kalibratora primjenom formule:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ (uzorak)} - \Delta C_t \text{ (kalibrator)}$$

Vrijednost kalibratora  $\Delta C_t$  dobivena je iz srednje vrijednosti  $\Delta C_t$  svih kontrolnih uzoraka.

U konačnici, veličina razlike (*engl. Fold difference*) normaliziranih razina genske ekspresije u uzorcima PV i CTRL određena je formulom:  $F_c = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

### **3.2.7. Uzorkovanje obrisaka sluznice sinusa i nosne šupljine za mikrobiološku analizu**

U našem istraživanju, uzorkovao se bris nosa i sinusa za bakteriološku analizu i identifikaciju. U slučaju bolesnika sa KRSsNP, brisevi su uzimani intraoperativno iz etmoidnog sinusa, dok se u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika bris nosa uzrokovao preoperativno. Pod kontrolom endoskopa, brisevi sinusa uvijek su se uzorkovali iz područja prednjeg etmoidnog sinusa. Koristili su se štapići kako bi se obuhvatilo što je više moguće bakterija. Da bi se izbjegla nehotična kontaminacija, svaki bris koji je došao u kontakt s nosnim vestibulumom tijekom uzorkovanja odbacio se. Među bolesnicima koji sudjeluju u studiji nije bilo onih s purulentnom sekrecijom. Uzorci su analizirani u mikrobiološkom laboratoriju Zavod za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, KBC Osijek.

### **3.2.8. Patohistološka analiza na prisutnost eozinofila u uzorcima sluznice srednje nosne školjke i nosnog polipa**

Dijagnoza eozinofilnog kroničnog rinosinuitisa (eKRS) temelji se na zastupljenosti  $\geq 10\%$  eozinofila u ukupnom leukocitnom infiltratu tkiva polipa. U svrhu potvrde alergijskoga (eozinofilnog) KRSsNP pripremili su se preparati sluznice srednje nosne školjke i polipa fiksirani u 5% formalinu, potom uklopljeni u parafin te bojani hematoksilin-eozinom (HE), odnosno po Gomoriju. Preparati su se pripremili u Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek. Udio eozinofila odredio se prebrojavanjem ukupnih i eozinofilnih leukocita u vidnom polju pri povećanju od 400x, u najmanje pet vidnih polja bogatijih eozinofilima na pet nasumično odabranih rezova (preparata).

### **3.2.9. Statističke metode**

Kategorički podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona (robustne mjere središnjice i raspršenja) ili aritmetičkom sredinom s 95% intervalom pouzdanosti, ovisno o distribuciji. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U-testom. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom. Tablice kontingencije analizirane su Fisher egzaktnim testom.

Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$ . Sve su  $P$  vrijednosti dvostrane, uz  $P < 0,05$  (ako nije drugačije naznačeno). Sva obrada učinjena je u R4.3.1 sučelju (<https://www.R-project.org>).

### 3.2.9.1. Generalizirani linearni model

Generalni linearni mješoviti model (GLMM) je fleksibilna parametrijska metoda koja omogućuje multifaktorijalni, hijerarhijski tretman fiksnih, slučajnih i ugniježđenih prediktora. Prikladna je za simultano modeliranje ovisnosti varijable odziva ( $Y_i$ ) o kategoričkim i omjernim prediktorima, a višerazinski modeli osobito su pogodni za istraživanja u kojima su podatci za ispitanike organizirani na više razina (ugniježđeni podatci).

Generalni linearni model počiva na približno eksponencijalnoj distribuciji varijabli (tipična Gaussova distribucija je član eksponencijalne obitelji) i homogenosti reziduala. Reziduali su definirani kao međusobno neovisne i normalno distribuirane slučajne varijable s jednakim varijancama ( $\varepsilon \sim N(0, \sigma)$ ).

S obzirom na veličinu uzorka, u osnovnom modelu testirani su poglavito učinci prvog reda, tj. glavni učinci prediktora, sa slobodnim članom (odsječkom) koji varira od ispitanika do ispitanika ( $ID_i$ ):

$$Y_i \leftarrow dob_i + spol_i^{M,F} + sijelo_i^{c,s,p^j} + (1|ID_i)$$

Za omjerne kovarijate (vari = IgE, SNOT), korišten je model:

$$Y_i \leftarrow var_i + dob_i + spol_i^{M,F} + sijelo_i^{c,s,p^j} + (1|ID_i)$$

Za modeliranje odnosa između genskog izražaja i staničnih frekvencija korišten je model:

$$gene_i \leftarrow freq_i + dob_i + spol_i^{M,F} + (1|ID_i)$$

Za modeliranje i procjenu parametara korištena je *lme4* i *lmerTest* knjižnica u R programu (*lmer* rutina). Svi prikazani modeli uspješno su konvergirali. Globalni značaj modela procijenjen je F-testom (analiza varijance, suma kvadrata III tipa, Satterthwaiteova metoda, *lmerModLmerTest*) i robustnim parametrijskim bootstrap testom (*pbkrtest* knjižnica, *PBmodcomp* funkcija, Kenward-Roger aproksimacija broja stupnjeva slobode, 1000 iteracija).

Za višerazinske faktore (spol, sijelo), post-hoc korekcija P-vrijednosti za broj parnih usporedbi (kontrast) u omnibus testu provedena je Tukey metodom (*emmeans* knjižnica).

Za vizualizaciju marginalnih učinaka korišteni su *sjPlot*, *marginaleffects*, *effects*, *jtools* i *RColorBrewer* knjižnice. Dijagnostika modela uključuje procjenu multikolinearnosti (inflacija varijance), inspekciju kvantilnih (q-q) krivulja, inspekciju linearnosti, normalnost i homogenosti reziduala (uključujući Levenov test). Za statistički manje iskusne čitatelje, očekivana svojstva pojedinih procjenitelja kratko su opisana u grafičkom sažetku dijagnostike (*performance* knjižnica).

### 3.2.9.2. Redukcija podataka

Za potrebe GLM, citometrijski podatci analizirani su u izvornom obliku. U genskom izražaju, za redukciju podataka korišteno je prokušano rješenje iz GTEx projekta i cjelogenomskih asocijacijskih studija, inverzna normalna transformacija rangova (INRT, *rankNormal* funkcija, *RNOmni* paket, Bloom offset 3/8).

Za serumski IgE, korišten je dekadski logaritam,  $\log(\text{IgE})$ .

### 3.2.9.3. Analiza kovarijance (ANCOVA)

Za faktorske kovarijate poput proširenosti bolesti i prisustva eozinofila u obrisku nosa, učinak staničnih obilježja i genski izražaj modeliran je zasebno za svako sijelo sluznice nosne šupljine. U tu svrhu, prethodni generalizirani linearni model razdijeljen je na dva sijela (zasebno, polip (P) vs kontrola (C), sluznica SNŠ (S) vs (C), čime je GLM sveden na analizu kovarijance.

Oboljeli ispitanici su razdijeljeni u 2 skupine prema objektivnoj proširenosti bolesti, koristeći medijan Lund-Mackey (LM) zbroja ( $\leq 14$ , blaga bolest=D1, vs.  $> 14$ , proširena bolest=D2):

$$Y_i^{p,s} \leftarrow \text{const} + \text{dob}_i + \text{spol}_i^{M,F} + \text{LM}_i^{C,D1,D2}$$

gdje je LM ordinalna varijabla s 3 moguće razine za i-tog ispitanika:

- C zdrava sluznica, kontrolni ispitanici
- D1 oboljela sluznica,  $\text{LM} \leq 14$ , blaga bolest
- D2 oboljela sluznica,  $\text{LM} > 14$ , proširena bolest

Za eozinofile u obrisku nosa, koristimo:

$$Y_i^{p,s} \leftarrow const + dob_i + spol_i^{M,F} + eo_i^{pos,neg}$$

Radi preglednosti i čitljivosti, negativni rezultati su izostavljeni.

#### 3.2.9.4. Testovi povezanosti (ICC i Bayesova metoda)

Za procjenu sličnosti rezultata u parnim uzorcima iz dvije lokacije (srednja nosna školjka (S)+ polip (P)) istog ispitanika, korišten je ICC2 (*engl. intraclass correlation coefficient, psych* knjižnica, Shrout and Fleiss nomenklatura) i Bayesov formalizam. Za razliku od ICC2, Bayesov model omogućava ocjenu povezanosti u realnijem okruženju, unutar nesigurnosti procjene u konačnim uzorcima, kada je stvarna distribucija podataka nepoznata, odnosno u prisustvu mjerne greške. U tu svrhu korištene su uniforme (Spearmanov koeficijent korelacije rangova,  $\rho \sim U[-1,1]$ ) i neinformativne *apriori* distribucije vjerojatnosti s velikom disperzijom. Za generiranje slučajnih uzoraka iz bivarijatne t-distribucije korištena su tri Monte Carlo Markovljeva lanca s 1000 koraka zagrijavanja (burn-in) i 4000 koraka nakon toga. Broj stupnjeva slobode ( $\nu$ ) definiran je kao eksponencijalna distribucija s parametrom (1/29), a elementi matrice varijanci i kovarijanci konstruirani su kako je drugdje opisano (Baez-Ortega, 2018) ([https://github.com/rasmusab/bayesian\\_first\\_aid/blob/master/R/bayes\\_cor\\_test.R](https://github.com/rasmusab/bayesian_first_aid/blob/master/R/bayes_cor_test.R)).

*Aposteriori* distribucija parametra  $\rho$  s procijenjenom gustoćom prikazana je grafički (*engl. density plot*), uz pridruženi histogram marginalne *a posteriori* distribucije, 50% i 95% interval vjerodostojnosti (HDI, *engl. highest density interval*), i mjeru centralne tendencije (medijan). R kodovi potrebni za replikaciju rezultata i slika dostupni su na razuman zahtjev.

#### 3.2.9.5. Sekvenciranje jednostanične RNA (scRNASeq)

Javno dostupni podatci sekvenciranja jednostanične RNA (scRNA-Seq) preuzeti su iz GEO (*Gene Expression Omnibus*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)), Single Cell Portal (SCP, Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, SAD) i Zenodo repozitorija ([zenodo.org](http://zenodo.org)) kao procesirani i anotirani Seurat objekti.

1. Podaci za *The integrated Human Lung Cell Atlas* (Sikkema, 2023) dostupni su u interaktivnom obliku kroz CZ CELLxGENE projekt ([cellxgene.cziscience.com](http://cellxgene.cziscience.com)).

2. Podatci za Nasal Lifespan kohortu dostupni su unutar UCSC Cell Browser sučelja (<http://cells.ucsc.edu>) (Speir, 2021).

Analiza razlikovno izraženih gena u pojedinim staničnim subpopulacijama provedena je Wilcoxonovim testom (FindAllMarkers funkcija, Benjamini-Hochberg  $P < 0,05$ , Seurat v5.0.0 program, [satijalab.org/seurat](https://satijalab.org/seurat)). Za vizualizaciju podataka korištene su DimPlot i FeaturePlot funkcije Seurat alata u UMAP reprezentaciji (Uniform Manifold Approximation Projection), odnosno Nebulosa, EnhancedVolcano, viridisLite i scpubr knjižnica.

Za genska imena korišteni su HGNC (The HUGO Gene Nomenclature Committee) simboli.

## 4. REZULTATI

---

### 4.1. DESKRIPTIVNA ANALIZA

Istraživanje je provedeno na ukupno 84 bolesnika od kojih je 59 (70 %) muškaraca i 25 (30 %) žena. Bolesnicima sa eKRSsNP izuzeti su uzorci tkiva nosnog polipa i srednje nosne školjke (SNŠ) pa su rezultati analize relativnih frekvencija gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T-limfocita u sluznici SNŠ i nosnom polipu grupirani prema porijeklu uzoraka. Na jednak način grupirani su i rezultati kvantitativne RT-qPCR analize transkriptoma mononuklearnih stanica izoliranih sluznice SNŠ i nosnog polipa. Uzorci koji su na protočnoj citometriji imali manje od 500 ciljanih stanica isključeni su iz daljnjih analiza. U završnu statističku obradu uključeno je stoga 10 kontrolnih ispitanika i 21 bolesnik. U kontrolnoj skupini analizirani su uzorci srednje nosne školjke (SNŠ). U 14 bolesnika izuzeti su parni uzorci tkiva nosnog polipa i srednje nosne školjke (SNŠ). Za 5 bolesnika preostao je samo uzorak polipa, a za 2 uzorak sluznice SNŠ.

Obje su skupine (bolesnici i kontrole) podjednake dobi u rasponu 25-67 godina (min-max), bez značajnih razlika u SNOT indeksu, serumskoj razini IgE, hsCRP i koncentraciji RNA. U većine kontrolnih ispitanika nisu pronađeni eozinofili u obrisku nosa, za razliku od bolesnika. Test na inhalacijske i nutritivne alergene bio je negativan u podjednakoj većini ispitanika obje skupine. Većina bolesnika pripadala je Malm klasifikaciji 2 i 3. U usporedbi s kontrolnim ispitanicima, u skupini oboljelih bilo je značajno više muškaraca nego žena. Pritom, srednja dob žena značajno je premašila dob muškaraca [49 (39-54) vs. 40 (27-43) g,  $P = 0,015$ , Mann-Whitney test]. Nisu pronađene druge razlike ili poveznice među demografskim i kliničkim varijablama. Usporedba demografskih i kliničkih obilježja uključenih ispitanika prikazana je u Tablici 6.



**Tablica 6.** Obilježja ispitanika za protočnu citometriju (medijan s interkvartilnim rasponom)

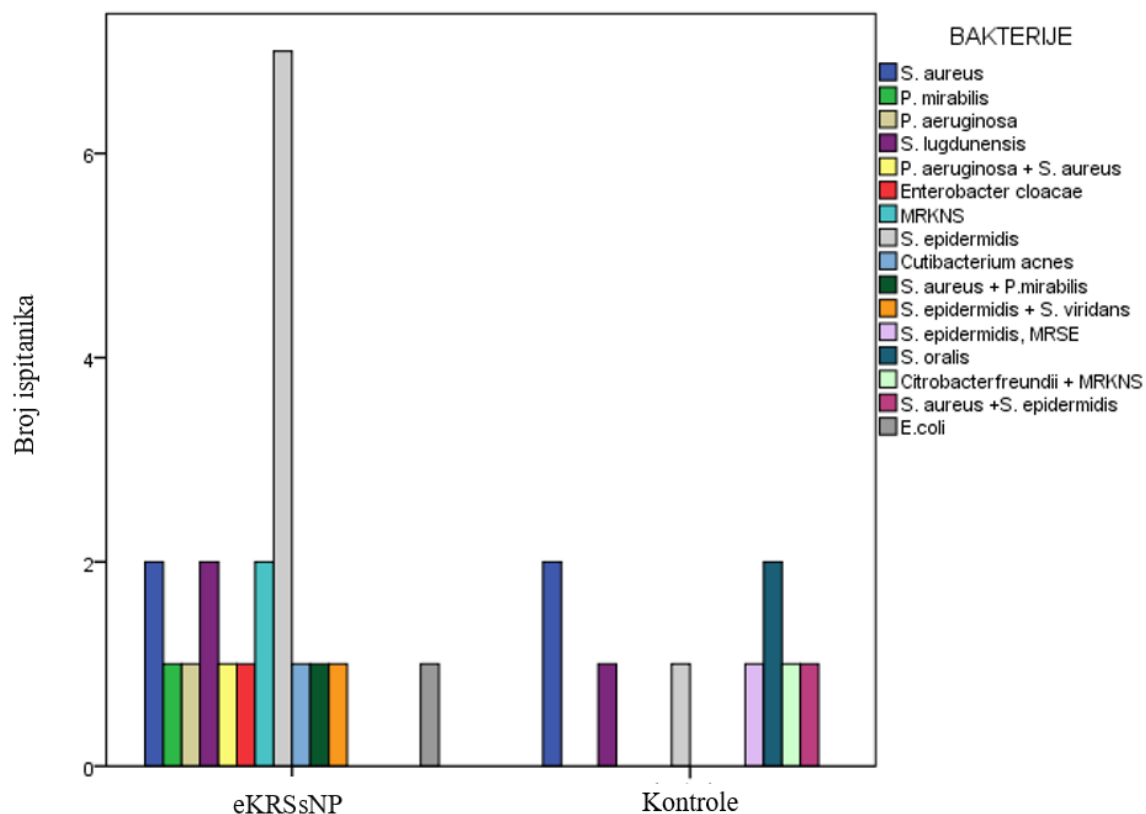
<b>Obilježje</b>	<b>Kontrole (n=10)</b>	<b>Bolesnici, eKRSsNP (n=21)</b>	<b>P*</b>
Spol (M/Ž)	3/7	17/4	<b>0,013**</b>
Dob (godine)	42 (27-49)	47 (38-54)	0,139*
SNOT	29 (13-45)	45 (27-51)	0,254*
LM	-	14 (11-18)	-
		(6-24, min-max)	
IgE, serum	63 (23-119)	103 (55-293)	0,228*
hsCRP, serum (mg/dL)	1,3 (0,6-2,1)	1,6 (1,1-2,7)	0,341*
	max 10	max 5,3	
Eozinofili u obrisku nosa (%)	0 (0-38)	20 (0-65)	<b>0,022*</b>
Eozinofili u obrisku nosa (neg/poz), N	8/2	9/12	0,068**
Inhalacijski alergeni (neg/poz, N)	6/4	15/6	0,69**
Nutritivni alergeni (neg/poz, N)	10/0	18/3	0,53**
Malm (0/1/2/3, N)	10/0/0/0	0/3/9/9	-

\*Mann-Whitney test, \*\* Fisher egzaktni test

SNOT (*engl. Sinonasal outcome test*) – upitnik samoprocjene kvalitete života bolesnika sa bolestima nosa, LM – Lund-Mackey sustav, IgE – Imunoglobulin E, hsCRP – *engl. High sensitive C-reactive protein*

Analizirani su podaci mikrobiološke analize kod 21 bolesnika s eKRSsNP i 10 kontrolnih ispitanika. Svi bolesnici s eKRSsNP imali su pozitivan bakterijski obrisak, dok je u kontrolnoj skupini zabilježen samo jedan negativan bris na bakterije.

Značajne razlike u broju pozitivnih obrisa na pojedine bakterije iz nosne šupljine bolesnika s eKRSsNP i kontrolne skupine, nisu zabilježene (Hi-kvadrat test,  $p = 0,26$ ). *Staphylococcus epidermidis* bila je najčešće primjećena u sluznici eKRSsNP oboljelih, a *Streptococcus oralis* i *Staphylococcus aureus* u nosnoj sluznici zdravih ispitanika (Slika 12).

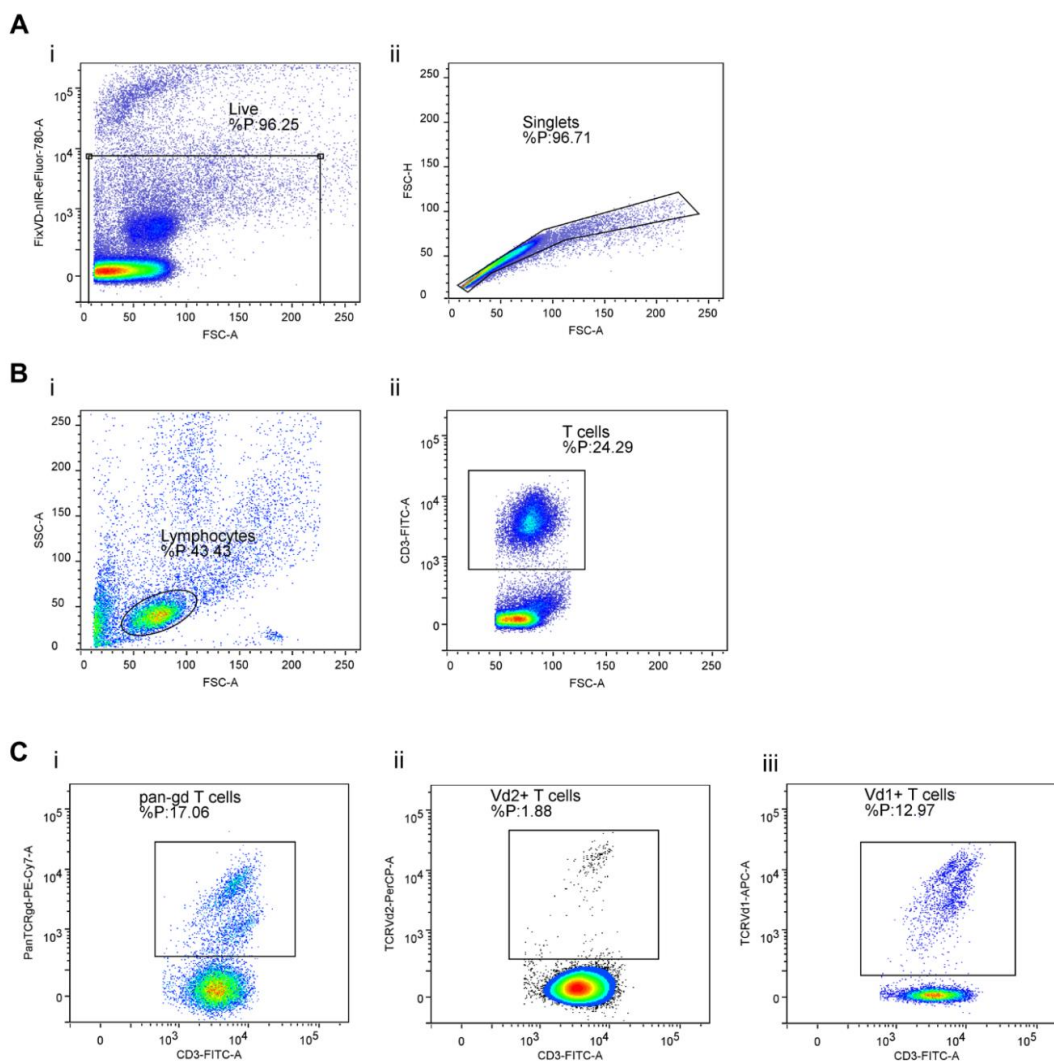


Slika 12. Razlika u broju pozitivnih uzoraka na pojedine bakterije između bolesnika eKRSsNP i kontrolne skupine (Hi-kvadrat test,  $p = 0,26$ )

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*, *P. mirabilis* – *Pseudomonas mirabilis*, *P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*, *S. lugdunensis* – *Staphylococcus lugdunensis*, MRKNS – Meticilin rezistentni koagulaza negativni *Staphylococcus*, *S. epidermidis* – *Staphylococcus epidermidis*, *S. viridans* – *Streptococcus viridans*, MRSE- Meticilin rezistentni *S. epidermidis*, *S. oralis* – *Streptococcus oralis*, *E. coli* – *Escherichia coli*

#### 4.2. ZASTUPLJENOST SUBPOPULACIJA GAMMA DELTA ( $\Gamma\Delta$ ) T-LIMFOCITA U NOSNIM POLIPIMA EKRSsNP BOLESNIKA TE SLUZNICI SREDNJE NOSNE ŠKOLJKE (SNŠ) EKRSsNP I KONTROLNIH ISPITANIKA

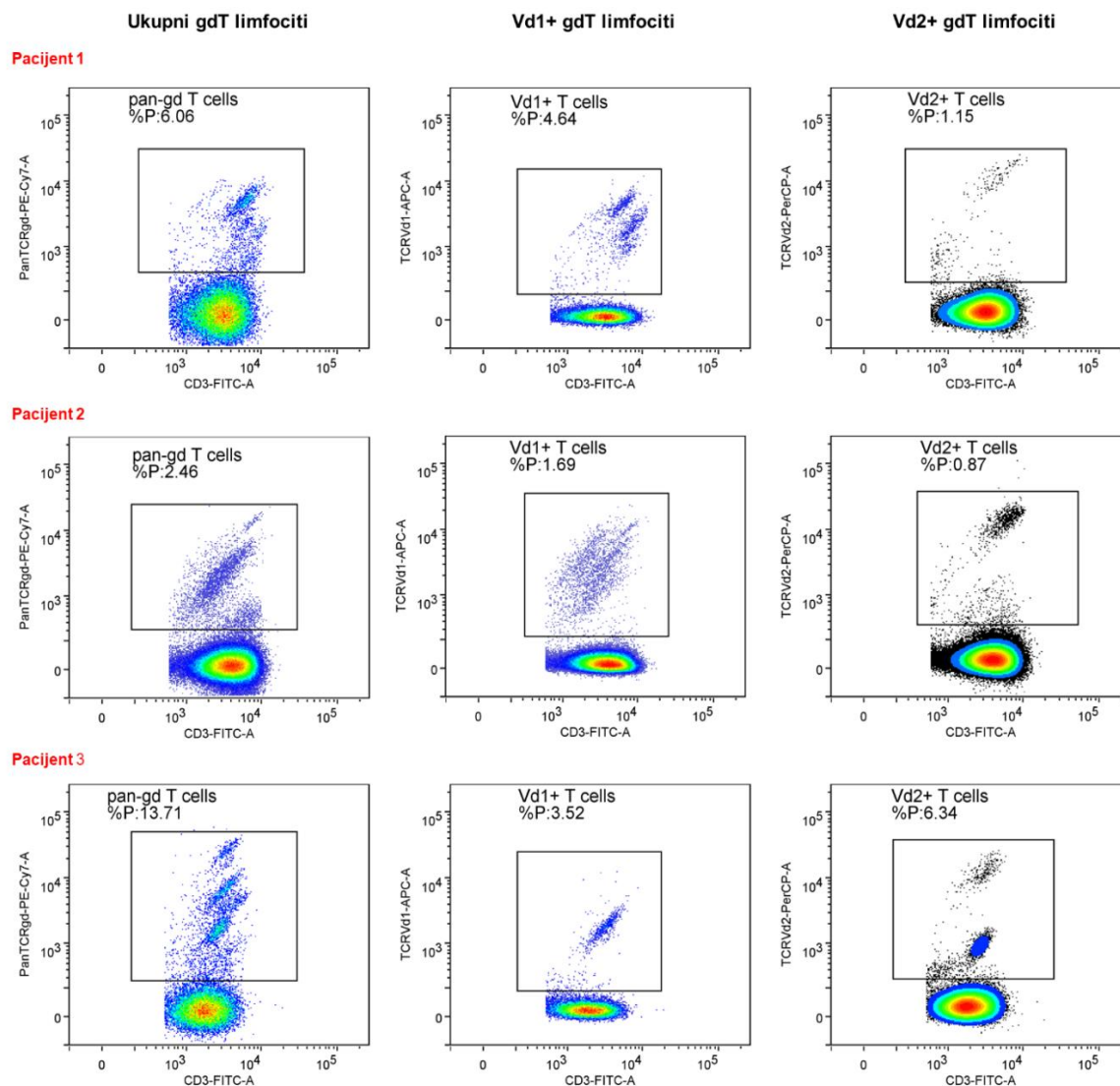
Zastupljenost  $\gamma\delta$  T-limfocita i njihovih subpopulacija pri analizi izražena je kao njihov udio (%) tj. relativna frekvencija u populaciji ukupnih živih mononuklearnih stanica (koja obuhvaća T-limfocite, B-limfocite, NK i ILC stanice, monocite) te kao njihov udio u roditeljskoj populaciji CD3 pozitivnih T-limfocita ili ukupnih  $\gamma\delta$  T-limfocita (pozitivnih za pany $\delta$  marker – Slike 13 i 14).



**Slika 13.** Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija gamma delta T-limfocita

Prvotno su izdvojene žive stanice (FVD negativna populacija) (**Ai**) te potom jednostruke stanice (tzv. singlets) na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrnog raspršenja svjetlosti (*forward scatter area* (FSC-A) i *forward scatter height* (FSC-H)) (**Aii**). U sljedećem koraku definirana je populacija limfocita na temelju pravocrnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (*forward scatter area* (FSC-A) i *side scatter area* (SSC-A)) koje daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica (**Bi**). Na temelju prisutnosti glikoproteina CD3 definirana je populacija T-limfocita (**Bii**). Nadalje su na temelju izražaja pan-gd TCR markera, Vd1 TCR lanca i Vd2 TCR lanca određene frekvencije ukupnih (Ci), odnosno odgovarajućig subpopulacija delta 1 (**Cii**) i delta 2 (**Ciii**)  $\gamma\delta$  T-limfocita. FVD - fiksabilna boja za vijabilnost (od *engl. fixable viability dye*); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (*engl. fluorescein*

isothiocyanate); PE-Cy7 - od engl. *phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7)*; PerCP - od engl. *peridinin chlorophyll protein*.



**Slika 14.** Prikaz individualnih razlika u distribuciji i zastupljenosti populacija gamma delta T-limfocita.

Usporedbom analiza subpopulacija gama delta T-limfocita dobivenih iz uzoraka nosnih polipa od različitih bolesnika, zamijećene su značajne individualne razlike u broju i distribuciji subpopulacija gama delta T-limfocita. U ovom trenutku nisu poznate biološke i funkcionalne razlike pojedinih subpopulacija, a ni njihova uloga u (pato)fiziološkim procesima. FVD - fiksabilna boja za vijabilnost (od engl. *fixable viability dye*); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*); PE-Cy7 - od engl. *phycoerythrin coupled with cyanine dye*

(Cy7); PerCP - od engl. *peridinin chlorophyll protein*. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom programa Flow Logic.

Ova potonja analiza predstavlja pouzdaniji parametar s obzirom na to da je u tom slučaju izuzet utjecaj interindividualnih razlika u zastupljenosti subpopulacija T/B/NK/ILC limfocita na konačni rezultat, dok razlike dobivene usporedbom udjela  $\gamma\delta$  T-limfocita u ukupnoj populaciji T-limfocita govore u prilog veličine učinka. Tako dobivene vrijednosti  $\gamma\delta$  T-limfocita i njihovih subpopulacija (V $\delta$ 1+, V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+, V $\delta$ 1-V $\delta$ 2-) raščlanjene su prema sijelu (sluznica srednje nosne školjke (s) i polipa (p) u oboljelih ispitanika + zdrave kontrole (c) ) i sažeto prikazane u Tablici 7.

**Tablica 7.** Stanične frekvencije (%), protočna citometrija (medijan s interkvartilnim rasponom)

Populacija stanica	c (n = 10)	p (n = 19)	s (n = 16)
ly (%)	42 (32-53)	40 (33-54)	35 (22-48)
T (% ly)	39 (34-55)	55 (32-69)	43 (31-67)
$\gamma\delta$ (% T)	3,7 (2,8-8,9)	6.5 (5-8,6)	6.8 (4,2-10,3)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ (% $\gamma\delta$ )	8,8 (3,4-14,6)	11 (7-20)	14 (6-31)
V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	71 (45-78)	35 (19-60)	48 (24-54)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	18 (13-30)	42 (24-58)	31 (22-45)
V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (%T)	5,1 (1,8-8,6)	3 (2.3-4,1)	3,4 (2,7-6,2)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ (%T)	1,5 (0,8-3,1)	3,3 (2,4-4,3)	2,8 (2,4-6,4)

ly – ukupni limfociti, T – T-limfociti,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti, V $\delta$ 1 V $\delta$ 2 – subpopulacije  $\gamma\delta$  T-limfocita, c- sluznica SNS kontrola, s- sluznica SNS bolesnika, p – sluznica polipa bolesnika

Budući da isti ispitanici čine glavninu p i s skupine, demografski i klinički parametri za svako pojedino sijelo vrlo su slični robustnim procjeniteljima iz Tablice 6.

U prisustvu dobnih razlika među skupinama ispitanika, naivni procjenitelji nisu posebno korisni niti informativni. Iz toga razloga, marginalni učinci, odnosno nepristrana (izolirana) očekivanja pojedinih varijabli nakon fiksiranja učinaka ostalih kovarijata (Tablica 8 i Tablica 9), procijenjena su regresijskim modeliranjem (GLMM).

**Tablica 8.** Stanične frekvencije (%), marginalni učinci prema sijelu

Populacija stanica	Aritmetička sredina s 95% intervalom pouzdanosti		
	c	p	s
Iy (%)	40 (27-50)	44 (37-50)	36 (29-44)
T (% Iy)	40 (26-55)	52 (43-62)	47 (37-57)
$\gamma\delta$ (% T)	5 (1,8-5,2)	7,8 (5,7-9,9)	7,9 (5,8-10)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ (% $\gamma\delta$ )	14 (2-26)	16 (9-24)	18 (10-26)
V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	68 (53-83)	35 (25-44)	42 (32-52)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	16 (4-29)	47 (39-54)	35 (27-43)
V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (%T)	5,8 (3,5-8,2)	3,5 (1,9-5,1)	4,9 (3,2-6,6)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ (%T)	1,7 (0-3,7)	4,3 (3,5-6)	4,2 (2,9-5,6)

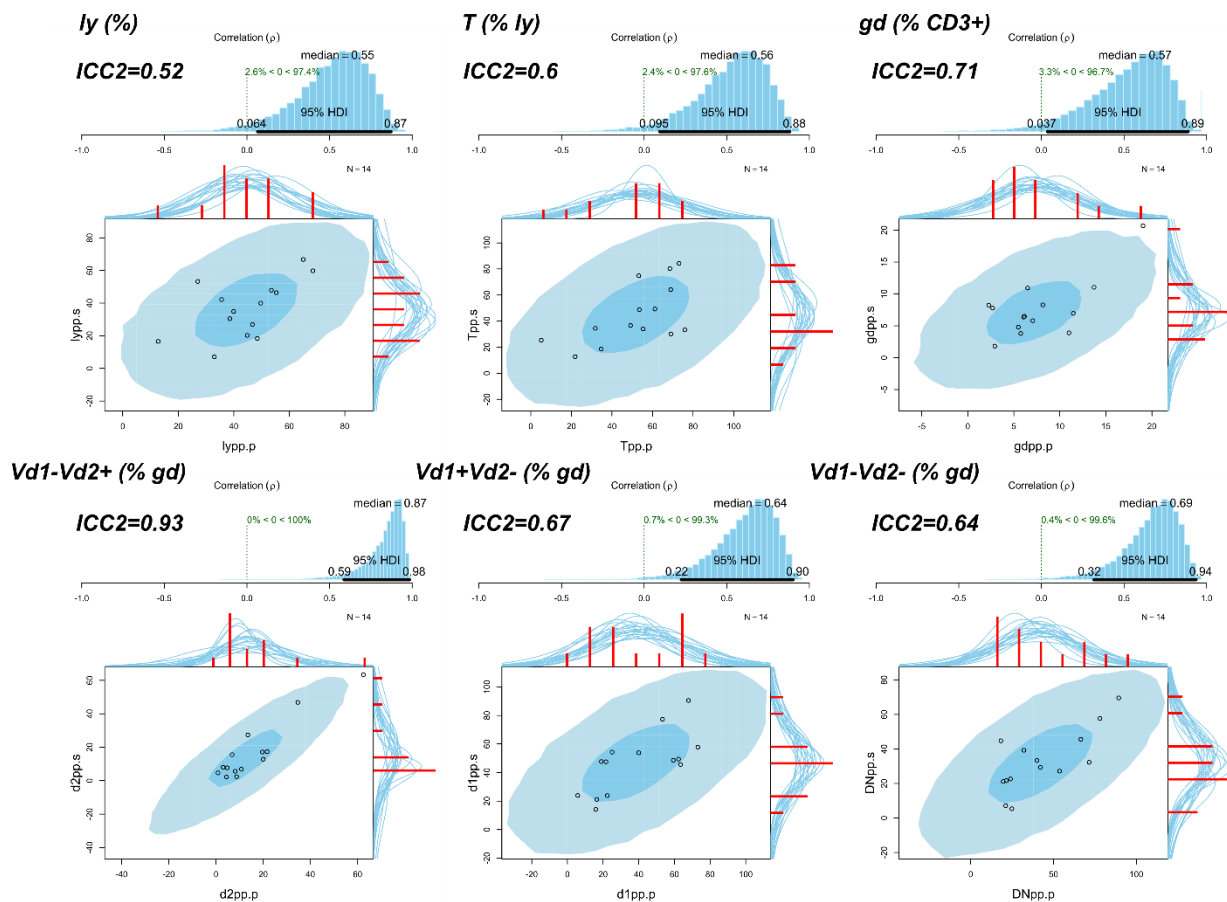
Iy – ukupni limfociti, T – T-limfociti,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti, V $\delta$ 1 V $\delta$ 2 – subpopulacije  $\gamma\delta$  T-limfocita, c- sluznica SNŠ kontrola, s- sluznica SNŠ bolesnika, p – sluznica polipa bolesnika

**Tablica 9.** Stanične frekvencije (%), marginalni učinci po spolu

Populacija stanica	Aritmetička sredina s 95% intervalom pouzdanosti	
	Ž/F	M/M
Iy (%)	43 (33-53)	39 (33-45)
T (% Iy)	45 (32-59)	49 (40-58)
$\gamma\delta$ (% T)	8 (5-11)	7 (5-9)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ (% $\gamma\delta$ )	18 (6-31)	16 (8-24)
V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	30 (15-44)	52 (42-61)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	49 (38-61)	30 (22-37)
V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (%T)	3,5 (1,5-5,5)	5 (3,7-6,3)
V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ (%T)	3,9 (1,9-5,9)	3,6 (2,3-4,9)

Iy – ukupni limfociti, T – T-limfociti,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti, V $\delta$ 1 V $\delta$ 2 – subpopulacije  $\gamma\delta$  T-limfocita, c- sluznica SNŠ kontrola, s- sluznica SNŠ bolesnika, p – sluznica polipa bolesnika, M/M – muški spol, Ž/F – ženski spol

U oboljelih, dominira visok stupanj sličnosti (podudarnosti) u sastavu staničnih populacija tkiva polipa (p) i srednje nosne školjke (s) istog ispitanika (Slika 15). Visok stupanj zrcaljenja između dva sijela zapažen je u udjelu T-limfocita u ukupnom limfocitnom infiltratu, u udjelu  $\gamma\delta$  stanica u CD3+ frakciji i relativnom sastavu  $\gamma\delta$  T populacije, barem u pogledu membranskog izražaja TCR V $\delta$ 1 i V $\delta$ 2 lanaca (Slika 15). Takav rezultat sugerira da sluznica polipa zadržava stanične sličnosti s ishodišnom sluznicom SNS, barem u ovdje analiziranim obilježjima upalnog infiltrata.



**Slika 15.** Analiza sličnosti staničnih frekvencija za parna sijela (*engl. intraclass correlation coefficient tip 2 – ICC2*) s Bayesovim modeliranjem Spearmanovih koeficijenata (aposteriori distribucije). Svjetliji i tamniji ovali predstavljaju 95 % i 50 % interval vjerodostojnosti. ly – ukupni limfociti, T – T-limfociti, gd –  $\gamma\delta$  T-limfociti, Vd1 Vd2 – V $\delta$ 1V $\delta$ 2 subpopulacije  $\gamma\delta$  T-limfocita ovisno o zastupljenosti  $\delta$  (d) lanca , s- sluznica SNS bolesnika, p – sluznica polipa bolesnika

### 4.3 UČINCI TKIVNOG SIJELA, SPOLA I DOBI NA PROMJENE FREKVENCije ISPITIVANIH STANIČNIH POPULACIJA ZDRAVIH I OBOLJELIH ISPITANIKA (GLMM, OSNOVNI MODEL)

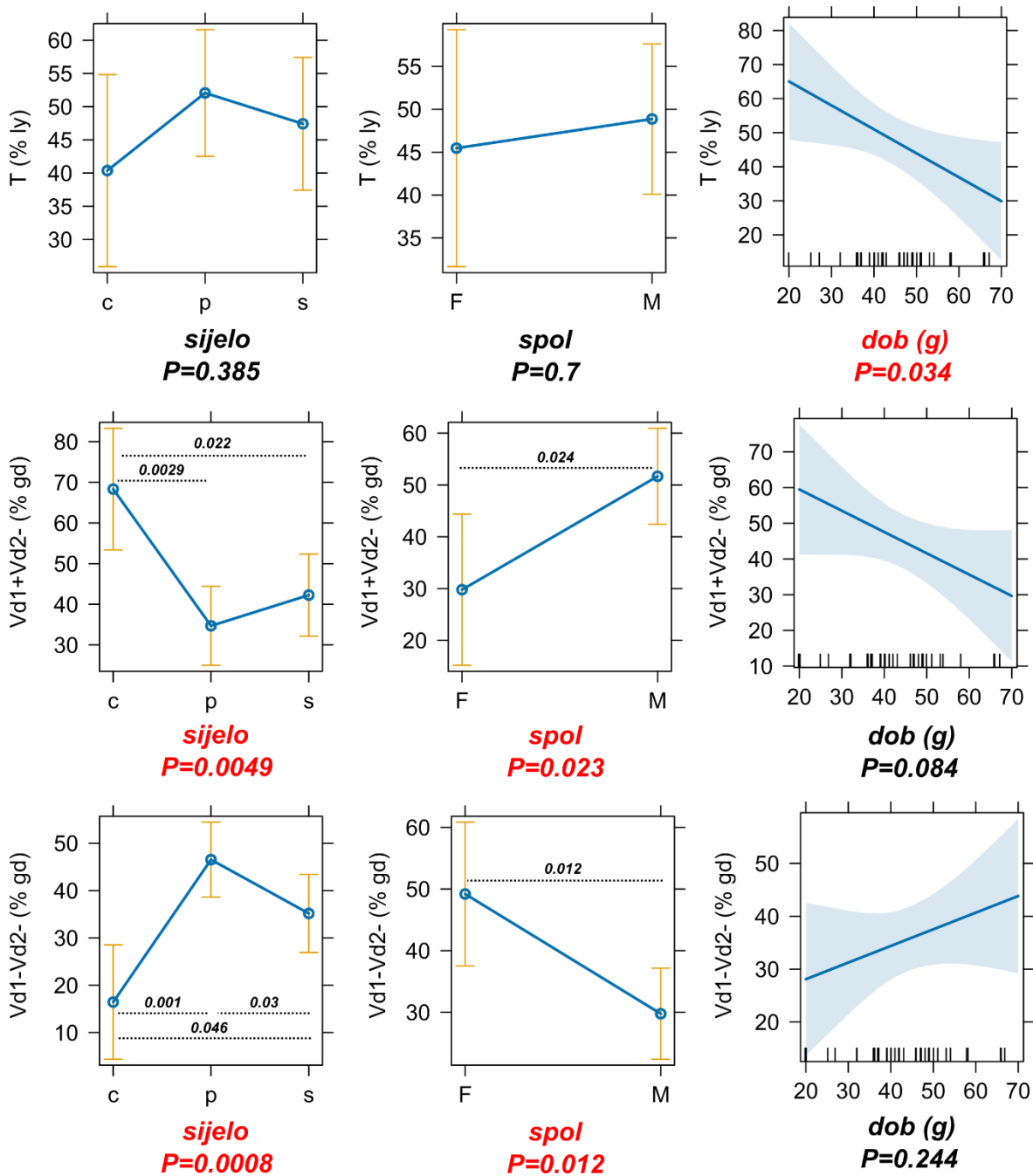
Nakon korekcije za ovu internu strukturu (ugniježđenost i međuovisnost parnih uzoraka unutar iste osobe), zapažena je značajna inverzna relacija između dobi i udjela T-limfocita među sluzničkim limfocitima. Viša dob obilježena je prorjeđivanjem T-limfocita među ukupnim limfocitima u sluznici SNŠ starijih ispitanika ( $p = 0,034$ ; GLMM) neovisno o sijelu i spolu (Tablica 13, Slika 16, gornji red).

**Tablica 13.** Učinci sijela, spola i dobi na promjene udjela T stanica među ukupnim limfocitima, GLMM.

Prediktori	Procjene	T (% ly)	
		Interval vjerodostojnosti - CI	<i>P</i>
Const	69,29	42,53 – 96,06	<b>&lt;0,001</b>
sijelo [p]	11,69	-6,56 – 29,93	0,202
sijelo [s]	7,04	-11,15 – 25,23	0,438
spol [M]	3,4	-14,03 – 20,83	0,695
Dob	-0,7	-1,34 – -0,07	<b>0,03</b>

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Ly- ukupni limfociti, p-sluznica polipa, s- sluznica SNŠ, M – muški spol





**Slika 16.** Marginalni efekti sijela, spola i dobi na promjene udjela T-limfocita među ukupnim limfocitima (% ly) i V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- i V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- stanicama u  $\gamma\delta$ TCR+ frakciji (%  $\gamma\delta$ ), GLMM. Centralne točke mjerenja po sijelu i spolu prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite linije 95% interval pouzdaosti. Pojedinačna opažanja u trećem stupcu slike prikazana su duž apscise ("|"). Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. ly – ukupni limfociti, Vd1Vd2 -subpopulacije V $\delta$ 1V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-limfocita, gd –  $\gamma\delta$  T-limfociti, F- ženski spol, M-muški spol, c – sluznica SNŠ kontrola, p – sluznica polipa bolesnika, s – sluznica SNŠ bolesnika

Nadalje, vidljivo je značajno smanjenje udjela V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- stanica među  $\gamma\delta$ TCR+ T limfocitima u sluznici SNŠ, i osobito polipoidnoj sluznici oboljelih u usporedbi sa kontrolnim ispitanicima ( $p = 0,0049$ ; GLMM) (Slika 16, srednji red). Istodobno, zabilježene su i spolne razlike u udjelu V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- stanica među  $\gamma\delta$  T-limfocitima: u muških ispitanika ovaj je udio značajno viši nego u žena ( $p = 0,023$ ; GLMM) (Tablica 14, Slika 16, srednji red). Oba zapažena učinka neovisna su o dobi.

**Tablica 14.** Učinci sijela, spola i dobi na promjene udjela V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- stanica u  $\gamma\delta$ TCR+ frakciji (%  $\gamma\delta$ ), GLMM

Prediktori	Procjene	V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	
		Interval vjerodostojnosti - CI	$p$
Const	79,77	51,59 – 107,95	<b>&lt;0,001</b>
sijelo [p]	-33,64	-52,43 – -14,84	<b>0,001</b>
sijelo [s]	-26,08	-44,83 – -7,32	<b>0,008</b>
spol [M]	21,89	3,49 – 40,29	<b>0,021</b>
dob	-0,6	-1,27 – 0,08	0,08

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti, p-sluznica polipa, s-sluznica SNŠ, M-muški spol

Udio V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (*engl. Double negative, DN*) stanica u  $\gamma\delta$  T-limfocitima obrnuto zrcali smjer V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- stanica: udio V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- stanica među  $\gamma\delta$  T-limfocitima u polipoidnoj, i nešto manje izraženo, sluznici SNŠ oboljelih značajno je viši nego uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika ( $p = 0,001$ ; GLMM). Slično, muškarci imaju značajno niži udio V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- stanica u sluzničkim  $\gamma\delta$  T-limfocitima nego žene ( $p = 0,012$ ; GLMM), i to neovisno o dobi (Tablica 15, Slika 16, donji red).

**Tablica 15.** Učinci sijela, spola i dobi na promjene udjela V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- stanica u  $\gamma\delta$ TCR+ frakciji (%  $\gamma\delta$ ), GLMM

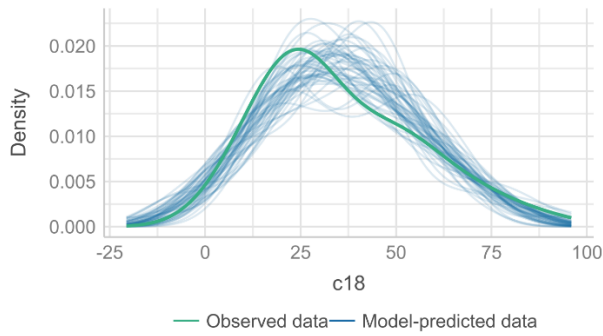
Prediktori	Procjene	V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )	
		Interval vjerodostojnosti - CI	<i>P</i>
Const	15,84	-6,68 – 38,36	0,163
sijelo [p]	30,08	14,88 – 45,28	<b>&lt;0,001</b>
sijelo [s]	18,72	3,56 – 33,88	<b>0,017</b>
spol [M]	-19,43	-34,11 – -4,74	<b>0,011</b>
dob	0,31	-0,22 – 0,85	0,241

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti, p-sluznica polipa, s-sluznica SNŠ, M-muški spol

Dijagnostika modela prikazana je u Slici 17. U preostalim staničnim populacijama, nije bilo značajnih razlika prema sijelu, spolu ili dobi.

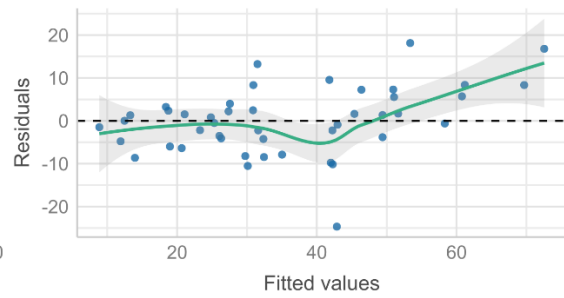
### Posterior Predictive Check

Model-predicted lines should resemble observed data line



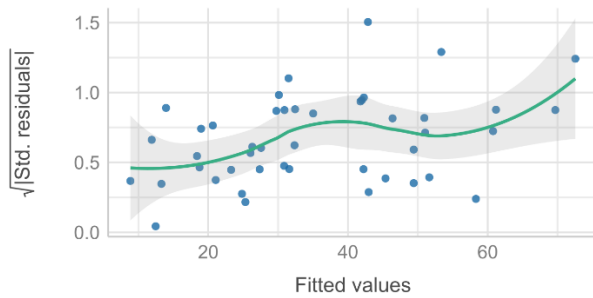
### Linearity

Reference line should be flat and horizontal



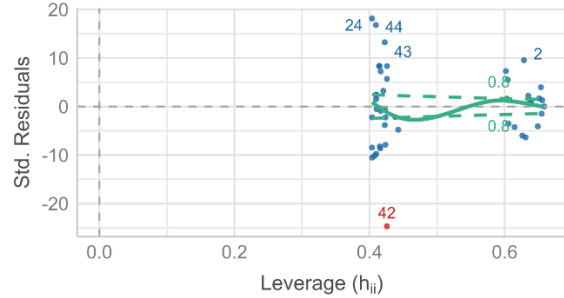
### Homogeneity of Variance

Reference line should be flat and horizontal



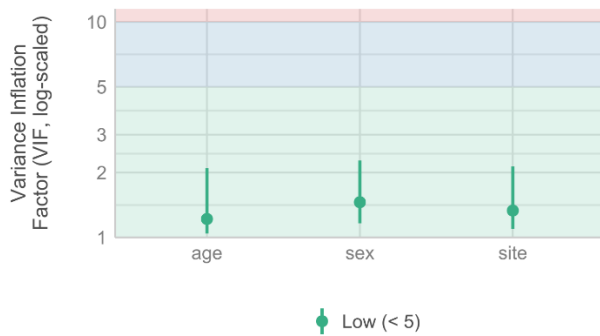
### Influential Observations

Points should be inside the contour lines



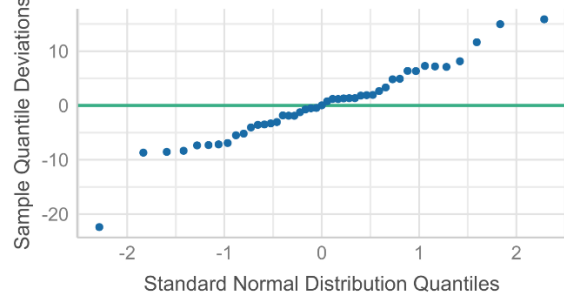
### Collinearity

High collinearity (VIF) may inflate parameter uncertainty



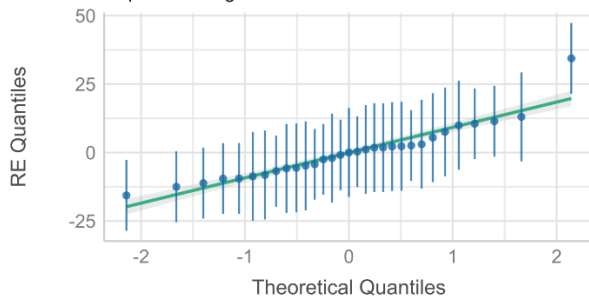
### Normality of Residuals

Dots should fall along the line



### Normality of Random Effects (subject)

Dots should be plotted along the line



**Slika 17.** Reprezentativni primjer dijagnostike GLMM (V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (%  $\gamma\delta$ )).

## 4.4 UČINCI SERUMSKE RAZINE IGE PROTUTIJELA I SUBJEKTIVNIH (SNOT) MJERA TEŽINE BOLESTI NA STANIČNI SASTAV POLIPOIDNE SLUZNICE I SLUZNICE SNŠ U OBOLJELIH I ZDRAVIH ISPITANIKA (GLMM, OSNOVNI MODEL)

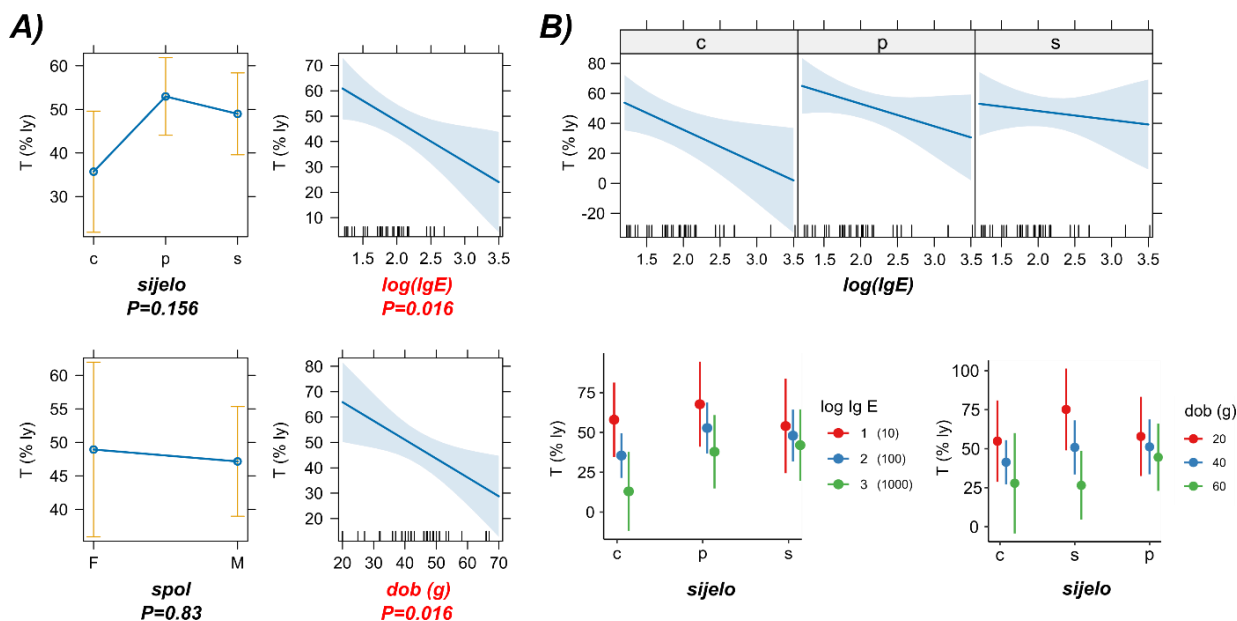
### 4.4.1. Povezanost serumske razine IgE protutijela s promjenama staničnog sastava

U sljedećem koraku, modeliran je učinak IgE i SNOT njihovim uključenjem u bazični GLMM. Za udio T-limfocita među sluzničkim limfocitima zapažen je pad njihovog broja s rastom serumske razine IgE ( $p = 0,016$ ; GLMM), uz već ranije opisani pad udjela s rastućom dobi ( $p = 0,016$ ; GLMM) (Tablica 16, Slika 18, panel A). Raščlambom interakcija između sijela i razine IgE (čime su dopuštene varijacije učinka u različitim sijelima), ovaj je učinak poglavito zapažen u sluznici kontrolnih ispitanika, ali ne i oboljelih (Slika 18, panel B).

**Tablica 16.** Učinci serumske razine IgE protutijela na promjene udjela T stanica među ukupnim limfocitima.

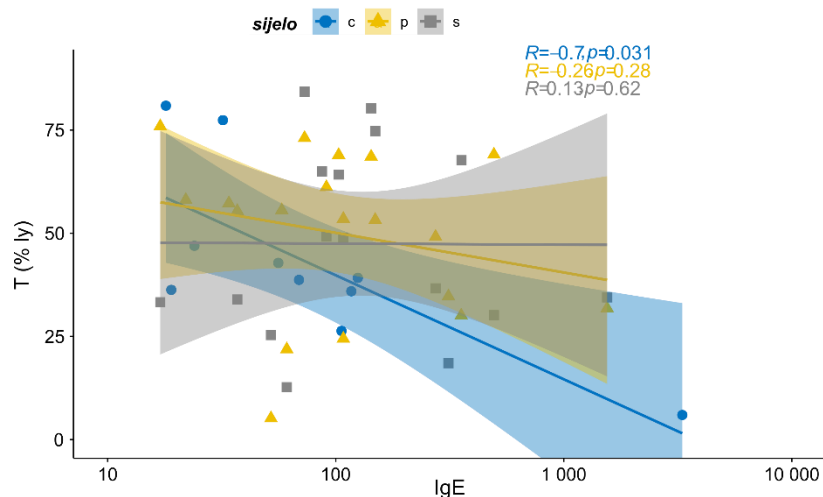
Prediktori	Procjene	T (% ly)	
		Interval vjerodostojnosti - CI	P
Const	102,43	66,56 – 138,30	<b>&lt;0,001</b>
sijelo [p]	17,27	-0,25 – 34,79	0,053
sijelo [s]	13,27	-4,29 – 30,84	0,134
spol [M]	-1,77	-18,36 – 14,81	0,83
log (IgE)	-16,05	-28,73 – -3,37	<b>0,015</b>
dob	-0,74	-1,32 – -0,16	<b>0,014</b>

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, ly – ukupni limfociti, T – T-limfociti, p-sluznica polipa bolesnika, s-sluznica SNŠ bolesnika, M-muški spol, IgE – imunoglobulin E



**Slika 18.** Marginalni učinci dobi i serumske razine IgE protutijela na promjene udjela T-limfocita među ukupnim limfocitima (% ly). Centralne točke mjerenja po sijelu i spolu prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite linije 95% interval pouzdaosti. Pojedinačna opažanja prikazana su duž apscise ("|"). Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. ly – ukupni limfociti, T – T-limfociti, IgE – imunoglobulin E, c – sluznica SNŠ kontrola, p – sluznica polipa bolesnika, s – sluznica SNŠ bolesnika

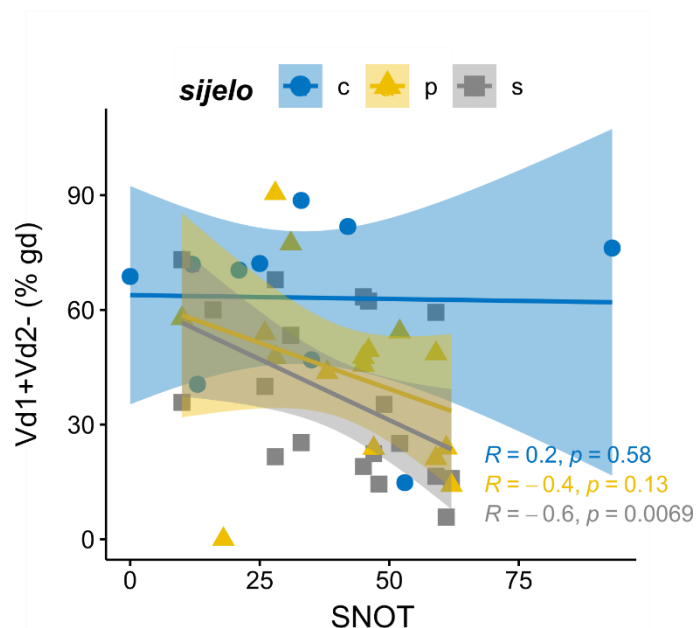
Jednak učinak vidljiv je već u bivarijantnoj analizi (Slika 19), i perzistira u GLMM. Za razliku od IgE, učinak dobi uglavnom je homogen za sva sijela i skupine ispitanika (Slika 18, panel B).



**Slika 19.** Korelacija rangova, IgE vs. T-limfociti (% ly), zasebno za svako sijelo/skupinu. Regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata, s 95 % intervalom pouzdanosti).  $R$  = Spearman rho. Apscisa je pseudo-logaritamska os. Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. ly- ukupni limfociti, T- T-limfociti, IgE – imunoglobulin E

#### 4.4.2. Povezanost subjektivnih mjera težine bolesti (SNOT) s promjenama staničnog sastava

Nije zabilježena značajna, robustna ili konzistentna razlika u staničnim frakcijama prema SNOT indeksu. U bivarijantnoj, korelacijskoj analizi po sijelu, vidljiva je potencijalna negativna korelacija SNOT i udjela  $V\delta 1+V\delta 2$ - stanica u  $\gamma\delta$  T-limfocitima ( $\rho = -0,6$ ;  $p = 0,007$ ), prvenstveno u sluznici SNŠ oboljelih, ali ne i polipoidnoj sluznici oboljelih i kontrolnim uzorcima (Slika 20). U GLMM nema rezidualnih, značajnih poveznica SNOT s bilo kojim analiziranim staničnim odjeljkom (podaci nisu prikazani).



**Slika 20.** Korelacija rangova, SNOT vs.  $V\delta_1+V\delta_2-$  stanice (%  $\gamma\delta$ ), zasebno za svako sijelo/skupinu. Regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata, s 95 % intervalom pouzdanosti).  $R$  = Spearman rho. Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. gd –  $\gamma\delta$  T-limfociti,  $V\delta_1+V\delta_2-$  – subpopulacija  $\gamma\delta$  T-limfocita, SNOT (*engl. Sinonasal outcome test*) - upitnik samoprocjene kvalitete života bolesnika sa bolestima nosa

#### 4.5. UČINAK OBJEKTIVNIH MJERA TEŽINE BOLESTI NA STANIČNI SASTAV POLIPOIDNE I SLUZNICE SNŠ U OBOLJELIH I ZDRAVIH ISPITANIKAMA (GLM-ANCOVA)

U trećem ciklusu analize, ispitana je ovisnost učinka o težini bolesti i prisustvu eozinofila u brisu nosa. Za dopunske višerazinske, faktorske varijable poput Lund-Mackey indeksa (LMI) i eozinofilnog indeksa (EOI), koristimo prethodni rezultat za informiranu reparametrizaciju modela.

U tu svrhu, analizu nastavljamo zasebno za svako sijelo koristeći neovisna opažanja (p+c, s+c), čime je izvorni GLMM učinkovito sveden na analizu kovarijance. Ovu odluku temeljimo na opaženoj sličnosti rezultata u parnim uzorcima oba sijela, koju ovdje prenamjenjujemo u dijagnostički kriterij, zahtijevajući istovjetnost rezultata ANCOVE u oba sijela (u smjeru i



veličini učinka faktorske varijable) za značajnost. Prednost je ovakvog (zasebnog) pristupa višestruka: 1) jednostavniji model donosi veću statističku snagu, 2) eliminacija zasićenog modela, s prekomjernim brojem slobodnih parametara za veličinu uzorka. Ostali nominalno značajni rezultati su prikazani, poglavito eksploracijske naravi, za potrebe usporedbe s literaturom i generiranja budućih hipoteza.

#### 4.5.1. Povezanost Lund-Mackey indeksa s promjenama staničnog sastava

Za razliku od subjektivnih mjera (SNOT), objektivna mjera proširenosti bolesti (LMI) značajno je i konzistentno povezana sa staničnim sastavom sluznice, barem u analiziranim populacijama. Zapažen je značajan, progresivan pad udjela  $V\delta_1+V\delta_2$ - stanica među  $\gamma\delta$  T-limfocitima, najizraženije u proširenoj bolesti (za SNŠ,  $p = 0,022$ ; za polip,  $p = 0,028$ ; GLMM) (Slika 21, Tablica 17).

**Tablica 17.** Sažetak analize varijance za  $V\delta_1+V\delta_2$ - (%  $\gamma\delta$ ) staničnu populaciju u dva sijela s obzirom na stupanj proširenosti bolesti

Prediktori	$V\delta_1+V\delta_2$ - (% $\gamma\delta$ )					
	SNŠ			Polip		
	Procjene	Interval vjerodostojnosti		Procjene	Interval vjerodostojnosti	
		- CI	<i>P</i>		- CI	<i>P</i>
Const.	84,87	54,07 – 115,68	<b>&lt;0,001</b>	76,17	44,55 – 107,79	<b>&lt;0,001</b>
LM [D1]	-20,57	-44,47 – 3,33	0,092	-31,6	-56,48 – -6,73	<b>0,013</b>
LM [D2]	-28,94	-48,43 – -9,45	<b>0,004</b>	-29,85	-51,01 – -8,70	<b>0,006</b>
spol [M]	22,44	1,97 – 42,91	<b>0,032</b>	16,43	-5,51 – 38,37	0,142
Dob	-0,73	-1,48 – 0,01	0,055	-0,46	-1,22 – 0,30	0,236

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, LM – Lund-Mackey indeks, D1 -  $\leq 14$  LMI, D2 -  $> 14$  LMI, M-muški spol,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti

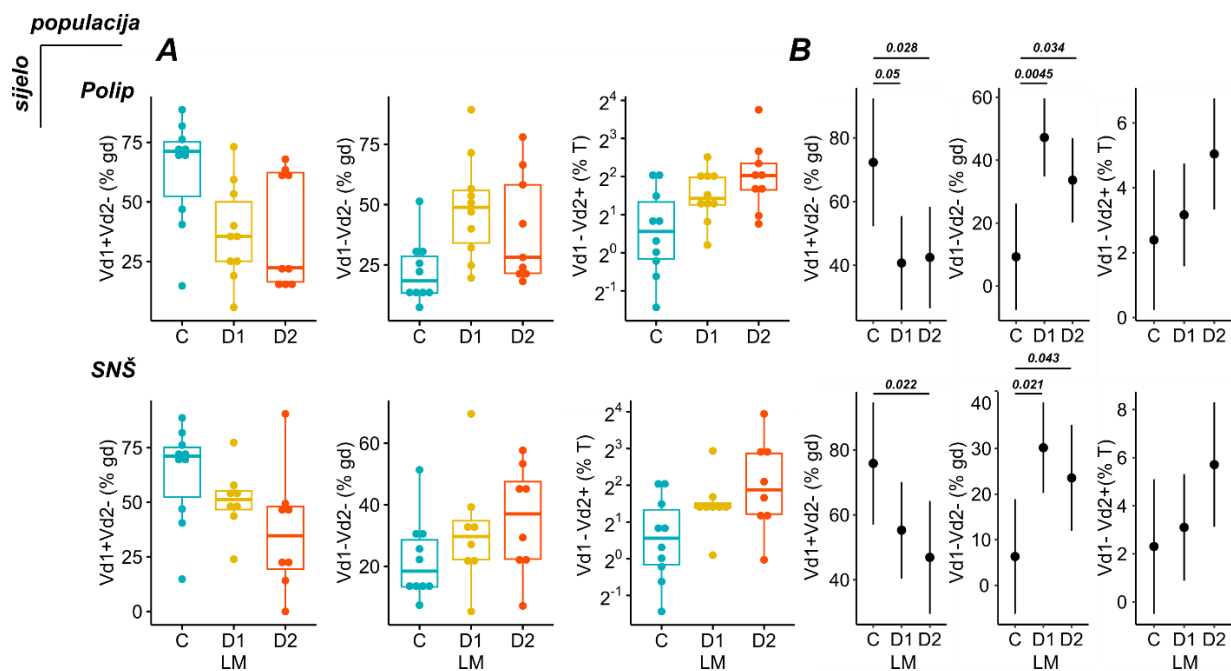
Vidljiv je istodobno i značajan porast udjela  $V\delta_1-V\delta_2$ - stanica među sluzničkim  $\gamma\delta$  T-limfocitima u blagoj (za SNŠ,  $p = 0,021$ ; za polip,  $p = 0,005$ ; GLMM) i proširenoj bolesti (za

SNŠ,  $p = 0,043$ ; za polip,  $p = 0,034$ ; GLMM), uz već ranije opisani sniženi udio u muškaraca (Tablica 18). Neto-rezultat posljednje dvije promjene je značajan, stupnjeviti, progresivni porast udjela V $\delta$ 1-V $\delta$ 2+ stanica među sluzničkim T-limfocitima u blagoj i osobito proširenoj bolesti u usporedbi s kontrolama.

**Tablica 18.** Sažetak analize varijance za V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (%  $\gamma\delta$ ) staničnu populaciju u dva sijela s obzirom na stupanj proširenosti bolesti

Prediktori	V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )					
	SNŠ			Polip		
	Procjene	Interval vjerodostojnosti - CI		Procjene	Interval vjerodostojnosti - CI	
		<i>P</i>			<i>P</i>	
Const	22,09	1,49 – 42,70	<b>0,036</b>	21,37	-5,25 – 47,99	0,116
LM [D1]	23,87	7,89 – 39,86	<b>0,003</b>	37,93	16,99 – 58,86	<b>&lt;0,001</b>
LM [D2]	17,24	4,21 – 30,27	<b>0,01</b>	24,36	6,55 – 42,16	<b>0,007</b>
spol [M]	-23,83	-37,52 – -10,14	<b>0,001</b>	-19,77	-38,24 – -1,30	<b>0,036</b>
Dob	0,19	-0,31 – 0,69	0,462	0,17	-0,47 – 0,82	0,594

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, LM – Lund-Mackey indeks, D1 -  $\leq 14$  LMI, D2 -  $> 14$  LMI, M-muški spol,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti



**Slika 21.** Izvorna mjerenja (A) i marginalni učinci (B) za odabrane stanične populacije u dva sijela (GLM), s obzirom na stupanj proširenosti bolesti. Kutijasti dijagram: horizontalne linije predstavljaju prvu kvartilnu (Q1, donja), medijan (srednja), i treću kvartilnu (Q3, gornja) liniju. Okomita linija = 1.5xIQR (interkvartilni raspon, Q3-Q1). Točke predstavljaju pojedinačna mjerenja. P-vrijednosti, Tukey post hoc test. Prikazane su samo značajne razlike. gd –  $\gamma\delta$  T-limfociti, T- T-limfociti, Vd1Vd2 – V $\delta$ 1V $\delta$ 2 subpopulacija  $\gamma\delta$  T-limfocita, LM- Lund-Mackey, C – sluznica SNŠ kontrola, D1 -  $\leq 14$  LMI, D2 -  $> 14$  LMI



**Tablica 19.** Sažetak analize varijance za V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (%  $\gamma\delta$ ) staničnu populaciju u dva sijela s obzirom na prisustvo eozinofila u obrisku nosa

V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )						
Prediktori	<i>SNŠ</i>			<i>Polip</i>		
	Procjena	Interval vjerodostojnosti CI	<i>p</i>	Procjena	Interval vjerodostojnosti CI	<i>p</i>
Const	91,22	58,47 – 123,98	<b>&lt;0,001</b>	80,93	48,14 – 113,71	<b>&lt;0,001</b>
Eoindex [pos]	-20,43	-36,89 – -3,96	<b>0,015</b>	-18,33	-35,28 – -1,38	<b>0,034</b>
spol [M]	12,77	-5,27 – 30,81	0,165	-0,68	-20,51 – 19,16	0,947
Dob	-0,89	-1,64 – -0,13	<b>0,022</b>	-0,59	-1,36 – 0,19	0,137

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, Eoindex – eozinofilni indeks, M-muški spol,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti

**Tablica 20.** Sažetak analize varijance za V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (%  $\gamma\delta$ ) staničnu populaciju u dva sijela s obzirom na prisustvo eozinofila u obrisku nosa

V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- (% $\gamma\delta$ )						
Prediktori	<i>SNŠ</i>			<i>Polip</i>		
	Procjena	Interval vjerodostojnosti CI	<i>p</i>	Procjena	Interval vjerodostojnosti CI	<i>p</i>
Const	11,69	-8,51 – 31,89	0,257	10,26	-17,91 – 38,43	0,475
Eoindex [pos]	18,59	8,44 – 28,74	<b>&lt;0,001</b>	19,74	5,18 – 34,30	<b>0,008</b>
spol [M]	-11,74	-22,86 – -0,62	<b>0,039</b>	-0,57	-17,62 – 16,47	0,947
Dob	0,36	-0,11 – 0,83	0,129	0,41	-0,25 – 1,07	0,227

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, Eoindex – eozinofilni indeks, M-muški spol,  $\gamma\delta$  –  $\gamma\delta$  T-limfociti

Za sve prikaze, simultana eksploracija cijelog parametarskog prostora bila je ograničena veličinom uzorka, što ove rezultate čini tentativnima.

## 4.6. USPOREDBA IZRAŽAJA GENA IZMEĐU SKUPINA

Za analizu genskog izražaja korišteni su uzorci 14 kontrolnih i 34 oboljela ispitanika. Među posljednjima, parni uzorci iz oba sijela bili su dostupni za 12 ispitanika. Po sijelu, analizirano je ukupno 16 uzoraka srednje nosne školjke oboljelih i 30 uzoraka polipa. Zbog ograničene količine tkivnog materijala i etičkih razloga koji priječe opsežno, nekritičko uzorkovanje sluznice, u oba eksperimenta (FACS i RT-qPCR) sudjelovalo je ukupno 22 ispitanika.

Genski izražaj TRDV3 nije zabilježen u niti jednom ispitivanom uzorku te je izostavljen iz daljnjih rezultata.

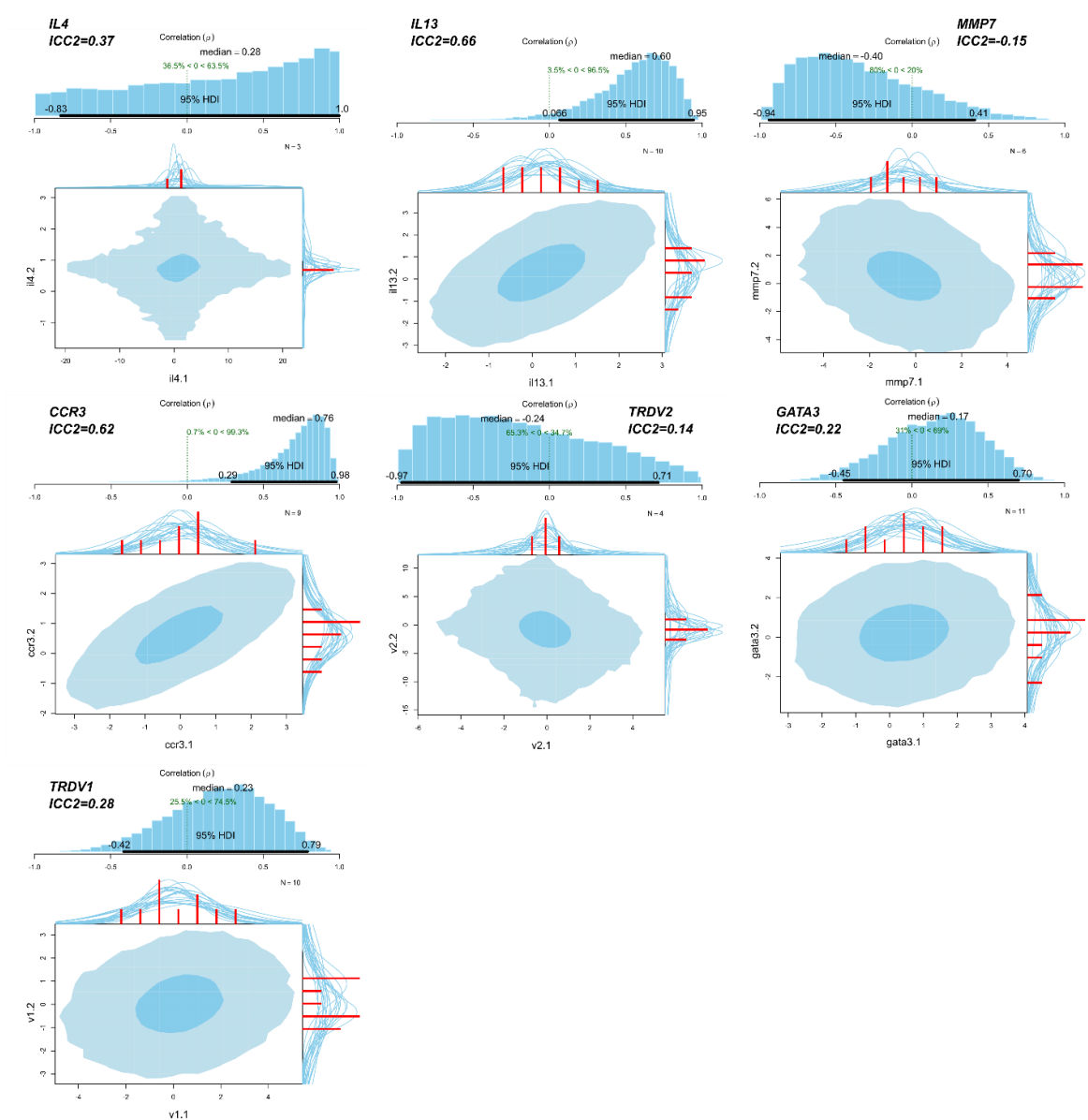
Demografska obilježja ispitanika prikazana su u Tablici 21. U ovoj kohorti, zabilježene su dobne razlike, sa značajno starijim oboljelim ispitanicima, bez razlika u zastupljenosti spolova.

**Tablica 21.** Obilježja ispitanika, kvantifikacija genskog izražaja (medijan s interkvartilnim rasponom)

Obilježje	Kontrole (n=14)	eKRSsNP (n=34)	P*
Spol (M/Ž)	10/4	29/5	0,416**
Dob (g)	38 (24-47)	49 (37-53)	0,007*
SNOT	22 (9-29)	45 (26-54)	0,001*
LM	-	13 (10-18)	-
IgE, serum	57 (26-81)	97 (49-81)	0,018*
hsCRP, serum (mg/dL)	1,3 (0,5-1,8)	1,5 (0,8-2,9)	0,224*
Eozinofili u obrisku nosa (%)	0 (0-22)	8 (0-53)	0,151*
Eozinofili u obrisku nosa (neg/poz)	9/5	17/17	0,525**
Inhalacijski alergeni (neg/poz)	10/4	24/10	1**
Nutritivni alergeni (neg/poz)	14/0	30/4	0,307**
Malm (0/1/2/3)	14/0/0/0	0/5/18/11	-

\*Mann-Whitney test, \*\* Fisher egzaktni test. SNOT (*engl. sinonasal outcome test*) – upitnik samoprocjene kvalitete života bolesnika sa bolestima nosa, hsCRP (*engl. High sensitive C-reactive protein*), IgE – imunoglobulin E

Za razliku od staničnih populacija, genski izražaj u različitim sijelima iste osobe pokazuje znatno veću varijabilnost. Posljedično, sličnost izražaja u dva parna sijela iste osobe varira od gena do gena (Slika 23).



**Slika 23.** Analiza sličnosti genskog izražaja za parna sijela (*engl. intraclass correlation coefficient* tip 2, ICC2) s Bayesovim modeliranjem Spearmanovih koeficijenata (*aposteriori* distribucije). Svjetli i tamniji ovali predstavljaju 95 % i 50 % interval vjerodostojnosti.

Izvorni rezultati kvantifikacije po sijelu su sažeti u Tablici 22, a transformirane vrijednosti (INRT) na kojima se temelji GLMM u Tablici 23.

**Tablica 22.** Genski izražaj (medijan s interkvartilnim rasponom) po sijelima, izvorne vrijednosti.

Gen	c	p	s
<i>GATA3</i>	1 (0,73-1,22)	1,3 (0,9-1,95)	1,59 (0,78-1,99)
<i>IL-13</i>	0,51 (0,36-9,3)	14,14 (7,74-22,75)	14,85 (4,96-34,81)
<i>TRDV2</i>	1,6 (0,3-1,92)	0,63 (0,23-1,63)	1,39 (0,05-4,2)
<i>TRDV1</i>	1,18 (0,48-2,5)	1,15 (0,54-2,64)	1,23 (0,59-2,75)
<i>IL-4</i>	1 (0,44-3)	1,97 (0,77-5)	3 (2,14-5,09)
<i>CCR3</i>	1,14 (0,48-2,52)	2,88 (1,78-5,33)	4,22 (2,08-6,53)
<i>MMP7</i>	1,15 (0,48-1,89)	0,5 (0,29-1,04)	0,72 (0,5-2,09)

c – sluznica SNS kontrola, s – sluznica SNS bolesnika, p-sluznica polipa bolesnika

**Tablica 23.** Genski izražaj (medijan s interkvartilnim rasponom) po sijelima, INRT.

Gen	c	p	s
<i>GATA3</i>	-0,36 (-0,98-0)	0,08 (-0,59-0,8)	0,38 (-0,85-0,75)
<i>IL-13</i>	-1,7 [-2,11- (-0,46)]	0,08 (-0,51-0,7)	0,19 (-0,79-1,02)
<i>TRDV2</i>	0,36 (-0,44-0,62)	-0,2 (-0,72-0,46)	0,24 (-1,35-1,28)
<i>TRDV1</i>	0 (-0,75-0,66)	-0,03 (-0,77-0,66)	0,08 (-0,58-0,72)
<i>IL-4</i>	-0,62 (-1,28-0,18)	-0,16 (-0,9-0,81)	0,37 (0-0,8)
<i>CCR3</i>	-1,06 [-1,78- (-0,13)]	-0,02 (-0,61-0,64)	0,38 (-0,33-0,87)
<i>MMP7</i>	0,56 (-0,32-1)	-0,26 (-0,95 -0,52)	0,19 (-0,24-1,1)

c – sluznica SNS kontrola, s – sluznica SNS bolesnika, p-sluznica polipa bolesnika

Marginalni učinci iz osnovnog GLMM sažeti su u Tablici 24 i Tablici 25.



**Tablica 24.** Genski izražaj, marginalni učinci prema sijelu (GLMM, aritmetička sredina s 95 % intervalom pouzdanosti).

Gen	c	p	s
<i>GATA3</i>	-0,32 (-0,89-0,25)	0,11 (-0,26-0,48)	0 (-0,5-0,5)
<i>IL-13</i>	-1,39 [-2,26- (-0,52)]	0,1 (-0,21-0,42)	0,13 (-0,29-0,55)
<i>TRDV2</i>	-0,02 (-0,96-0,92)	0,03 (-0,5-0,56)	-0,05 (-0,77-0,68)
<i>TRDVI</i>	-0,23 (-0,83-0,37)	0,05 (-0,31-0,42)	0,07 (-0,46-0,6)
<i>IL-4</i>	-0,53 (-1,54-0,47)	-0,05 (-0,44-0,35)	0,22 (-0,4-0,85)
<i>CCR3</i>	-0,94 [-1,72- (-0,16)]	-0,05 (-0,39-0,28)	0,43 (0,03-0,84)
<i>MMP7</i>	0,25 (-0,54-1,04)	-0,21 (-0,57-0,14)	0,38 (-0,16-0,93)

c – sluznica SNS kontrola, s – sluznica SNS bolesnika, p-sluznica polipa bolesnika

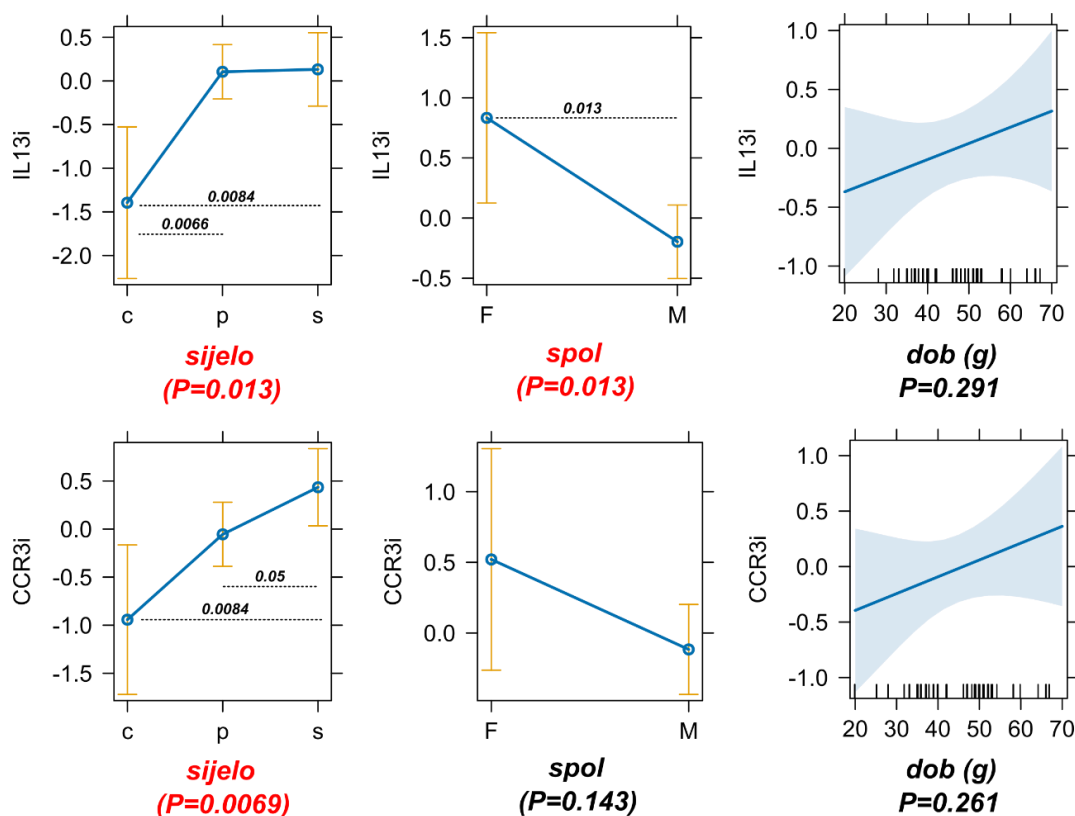
**Tablica 25.** Genski izražaj, marginalni učinci po spolu (GLMM, aritmetička sredina s 95 % intervalom pouzdanosti)

Gen	Ž/F	M/M
<i>GATA3</i>	-0,1 (-0,78-0,59)	0 (-0,3-0,3)
<i>IL-13</i>	0,83 (0,12-1,54)	-0,2 (-0,5-0,11)
<i>TRDV2</i>	-0,58 (-1,46-0,3)	0,16 (-0,26-0,59)
<i>TRDVI</i>	-0,04 (-0,7-0,62)	0,01 (-0,3-0,32)
<i>IL-4</i>	0,19 (-0,64-1,01)	-0,09 (-0,47-0,28)
<i>CCR3</i>	0,52 (-0,26-1,3)	-0,12 (-0,44-0,2)
<i>MMP7</i>	-0,51 (-1,3-0,28)	0,08 (-0,22-0,38)

Ž/F – ženski spol, M/M – muški spol

#### 4.7. UČINCI TKIVNOG SIJELA, SPOLA I DOBI NA PROMJENE GENSKOG IZRAŽAJA U POLIPOIDNOJ I SLUZNICI SNŠ OBOLJELIH I ZDRAVIH ISPITANIKA (GLMM, OSNOVNI MODEL)

Nakon korekcije za internu strukturu (ugniježđenost i međuovisnost parnih uzoraka unutar iste osobe), značajna razlika u genskom izražaju zapažena je za IL-13 ( $p = 0,013$ ; GLMM) (Tablica 26) i CCR3 ( $p = 0,007$ ; GLMM) (Tablica 27) prijevise, ali ne i za ostale analizirane gene (Slika 24). U oba slučaja, značajno viši izražaj pronađen je u mononuklearnim stanicama sluznice polipa i sluznice SNŠ oboljelih u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Tablica 26 i 27), bez razlike u izravnoj usporedbi između ova dva sijela (polipoidna sluznica i sluznica SNŠ). U slučaju IL-13, zapažena je i značajna, neovisna spolna razlika u izražaju među spolovima ( $p = 0,013$ ; GLMM), sa značajno nižim vrijednostima mjerenja u muških ispitanika u usporedbi sa ženama (Slika 24, Tablica 26).



**Slika 24.** Marginalni učinci (GLMM) sijela, spoli i dobi za pojedine gene. Centralne točke mjerenja po sijelu i spolu prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite linije 95% interval pouzdanosti. Pojedinačna opažanja prikazana su duž apscise ("|"). Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. P-

vrijednosti, Tukey *post hoc* test. Prikazane su samo značajne razlike. c- sluznica SNŠ kontrola, s – sluznica SNŠ bolesnika, p – sluznica polipa bolesnika, F – ženski spol, M – muški spol.

**Tablica 26.** GLMM, sažetak analize varijance (IL-13i, i=INRT)

<b>IL-13i</b>			
Prediktori	Procjene	Interval pouzdanosti - CI	<i>p</i>
Const	-1,17	-2,44 – 0,10	0,071
sijelo [p]	1,5	0,57 – 2,43	<b>0,002</b>
sijelo [s]	1,53	0,56 – 2,50	<b>0,003</b>
spol [M]	-1,03	-1,82 – -0,24	<b>0,012</b>
dob	0,01	-0,01 – 0,04	0,29

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, p – sluznica polipa bolesnika, s – sluznica SNŠ bolesnika, M – muški spol

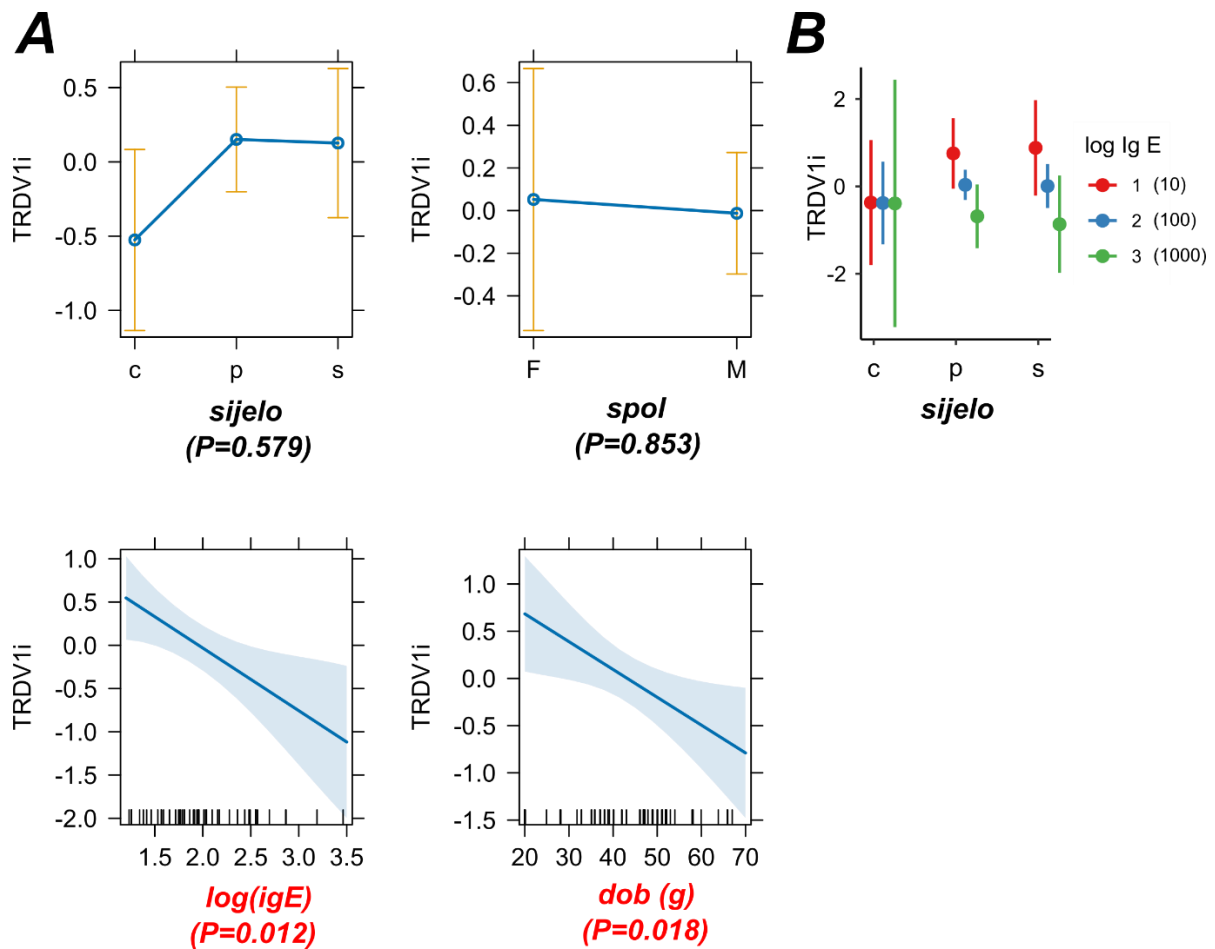
**Tablica 27.** GLMM, sažetak analize varijance (CCR3, i=INRT)

<b>CCR 3i</b>			
Prediktori	Procjene	Interval pouzdanosti - CI	<i>p</i>
Const	-1,09	-2,44 – 0,26	0,11
sijelo [p]	0,89	0,04 – 1,74	<b>0,041</b>
sijelo [s]	1,38	0,50 – 2,26	<b>0,003</b>
spol [M]	-0,64	-1,50 – 0,22	0,142
dob	0,02	-0,01 – 0,04	0,259

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, p – sluznica polipa bolesnika, s – sluznica SNŠ bolesnika, M – muški spol.

#### 4.7.1 Povezanost serumske razine IgE s promjenama genskog izražaja u polipoidnoj i sluznici SNŠ

Za TRDV1, zabilježen je značajan pad izražaja s porastom razine serumskog IgE ( $p = 0,012$ ; GLMM) (Slika 25, Tablica 28), i to prvenstveno u sluznici polipa i sluznici SNŠ oboljelih (Slika 25, panel B). Povrh toga, rastuća dob povezana je s progresivnim smanjenjem izražaja TRDV1 ( $p = 0,018$ ; GLMM) (Slika 25, panel A, donji red).



**Slika 25.** Marginalni učinci, GLMM, za *TRDV1* transkript (IgE model, INRT). Centralne točke mjerenja po sijelu i spolu prikazuju aritmetičku sredinu, a okomite linije 95% interval pouzdanosti. Pojedinačna opažanja prikazana su duž apscise ("|"). Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. c – sluznica SNŠ kontrola, s – sluznica SNŠ bolesnika, p – sluznica polipa bolesnika, F – ženski spol, M – muški spol, IgE – imunoglobulin E. INRT - inverzna normalna transformacija rangova

**Tablica 28.** Sažetak analize varijance genskog izražaja za izabrane stanične populacije u dva sijela s obzirom na razinu serumskog IgE (i=INRT)

<b>TRDV 1i</b>			
Prediktori	Procjene	Interval pouzdanosti -	
		CI	<i>P</i>
Const	2,22	0,74 – 3,70	<b>0,004</b>
sijelo [p]	0,68	-0,06 – 1,42	0,072
sijelo [s]	0,65	-0,16 – 1,46	0,112
spol [M]	-0,06	-0,76 – 0,63	0,853
log (IgE)	-0,72	-1,27 – -0,18	<b>0,011</b>
dob	-0,03	-0,05 – -0,01	<b>0,018</b>

GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, p – sluznica polipa bolesnika, s – sluznica SNŠ bolesnika, M – muški spol, IgE – imunoglobulin E

Dodatak IgE u osnovni model nije sadržajno izmijenio rezultate za IL-13 i CCR3, za koje u cijelosti perzistira učinak sijela (CCR3, IL-13) i spola (IL-13).

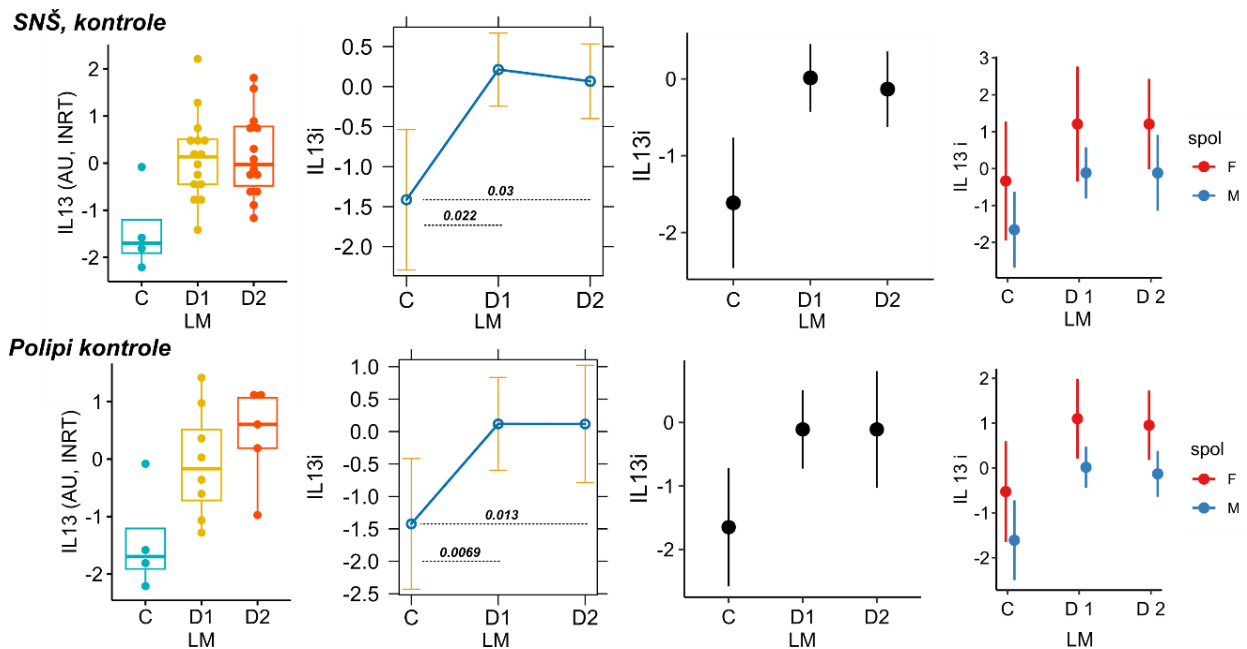
#### **4.7.2. Povezanost subjektivnih mjera težine bolesti (SNOT) s promjenama genskog izražaja u polipoidnoj sluznici i sluznici SNŠ**

Slično kao i za stanične frekvencije, ni genski izražaj nije konzistentno povezan sa subjektivnim mjerama težine bolesti. Štoviše, dodatak SNOT u osnovni model nije sadržajno izmijenio rezultate za IL-13 i CCR3, za koje u cijelosti perzistira učinak sijela (CCR3, IL-13) i spola (IL-13).

### 4.7.3. Povezanost Lund-Mackey indeksa s promjenama genskog izražaja u polipoidnoj sluznici i sluznici SNŠ

Među svim analiziranim transkriptima, samo je sluznički izražaj IL-13 konzistentno povezan s LMI nakon korekcije za spol i dob (Slika 26).

U usporedbi s kontrolama, u oba sijela je vidljiv značajan porast izražaja IL-13 u oboljelih, podjednako u ograničenoj (D1) ( SNŠ,  $p = 0,022$ ; polip,  $p = 0,007$ ; GLMM) i proširenoj bolesti (SNŠ,  $p = 0,03$ ; polip,  $p = 0,013$ ; GLMM) (D2, Tablica 29), s ranije opisanom spolnom razlikom ( $\check{Z} > M$ , Slika 26).



**Slika 26.** Izvorna mjerenja i marginalni učinci, GLM, za IL-13 transkript (INRT) prema stupnju proširenosti bolesti. Kutijasti dijagram: horizontalne linije predstavljaju prvu kvartil (Q1, donja), medijan (srednja), i treću kvartil (Q3, gornja linija). Okomita linija =  $1.5 \times IQR$  (interkvartilni raspon,  $Q3 - Q1$ ). Točke predstavljaju pojedinačna mjerenja. P-vrijednosti, Tukey post hoc test. Prikazane su samo značajne razlike. c- sluznica SNŠ kontrola, D1 $\leq$ 14 LMI, D2 $>$ 14 LMI, INRT - inverzna normalna transformacija rangova

**Tablica 29.** Sažetak analize varijance za izražaj IL-13 u dva sijela s obzirom na stupanj proširenosti bolesti (i=INRT)

SNŠ		IL13i	
Prediktori	Procjene	Interval pouzdanosti - CI	<i>p</i>
Const	-0,99	-3,01 – 1,04	0,341
LM [D1]	1,54	0,39 – 2,69	<b>0,009</b>
LM [D2]	1,54	0,31 – 2,77	<b>0,014</b>
spol [M]	-1,32	-2,65 – 0,01	0,051
dob	0,01	-0,04 – 0,07	0,586

Polipi		IL13i	
Prediktori	Procjene	Interval pouzdanosti - CI	<i>p</i>
Const	-1,03	-2,30 – 0,23	0,11
LM [D1]	1,63	0,67 – 2,59	<b>0,001</b>
LM [D2]	1,48	0,54 – 2,42	<b>0,002</b>
spol [M]	-1,08	-1,90 – -0,27	<b>0,009</b>
dob	0,01	-0,01 – 0,04	0,393

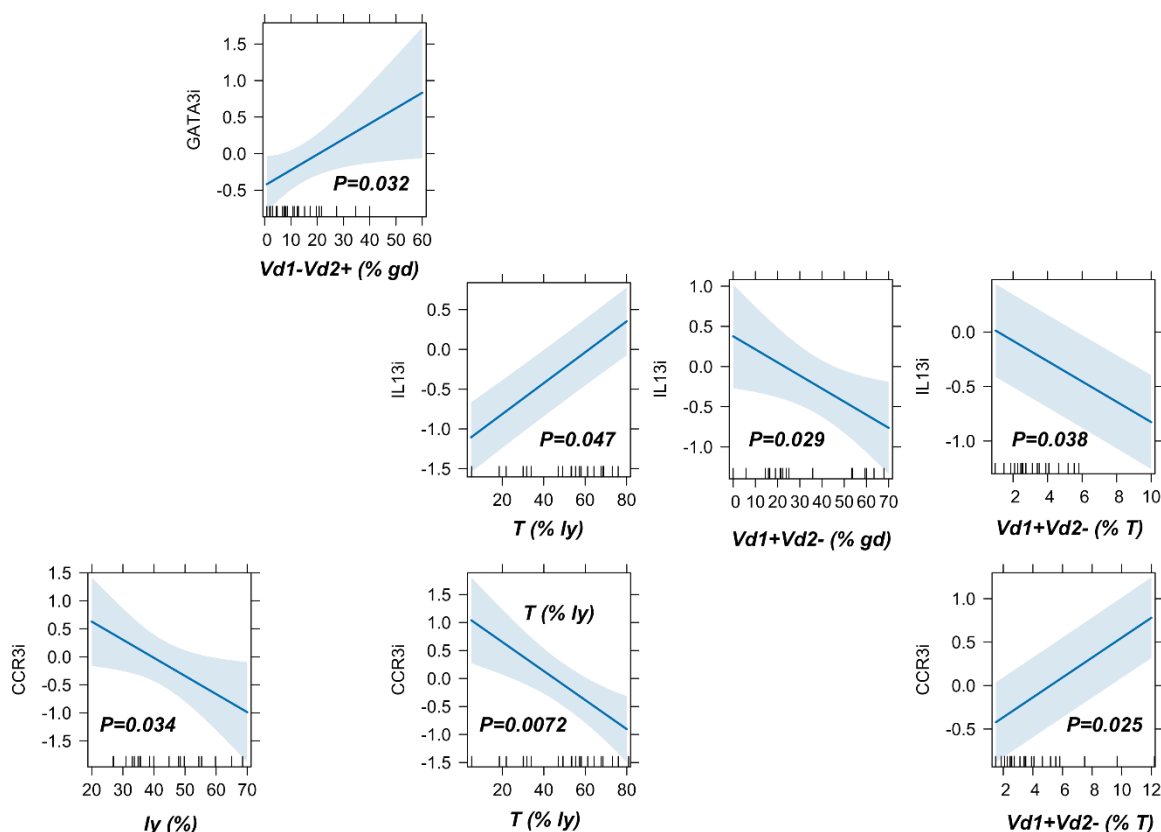
GLMM - linearni mješoviti model, suma kvadrata tipa III, Satterthwait t. Const – fiksni dio mješovitog modela, LM- Lund Mackey indeks, D1  $\leq$  14LMI, D2  $>$  14 LMI, M-muški spol

#### 4.7.4 Povezanost prisutnosti eozinofila u obrisku nosa s genskim izražajem u polipoidnoj i sluznici SNŠ

Nije zabilježena značajna, robustna ili konzistentna razlika u genskom izražaju prema prisustvu ili odsustvu eozinofila u brisu nosa.

### 4.8. POVEZANOST STANIČNOG SASTAVA S TRANSKRIPCijski SKIM PROFILOM ISPITIVANIH CITOKINA

Za 22 ispitanika s ukupno 25 mjerenja, podaci su bili dostupni i za genski izražaj i za protočnu citometriju. Time je omogućeno ispitivanje povezanosti staničnog sastava s citokinskim kontekstom bioptirane sluznice polipa i SNŠ (Slika 27).



**Slika 27.** Dijagonalna mapa povezanosti staničnih frekvencija u protočnoj citometriji s genskim izražajem u nosnoj sluznici (marginalni učinci, GLMM, dob+spol, i=INRT). Pojedinačna opažanja prikazana su duž apscise ("|"). Linearni regresijski pravac prikazan je linijom unutar zasjenjene regije koja označava 95 % interval pouzdanosti. ly – svi limfociti, T – T-limfociti, Vd1Vd2 – Vδ1Vδ2 subpopulacije γδ T-limfocita

Nakon prilagodbe za dob i spol, izražaj GATA3 gena raste s frakcijom Vδ2+ stanica u γδ populaciji ( $p = 0,032$ ; GLMM), u okvirnom skladu s opažanjima iz objavljenih scRNASeq studija γδ T-limfocita (sljedeće poglavlje).

Preostale genske korelacije ograničene su uglavnom na izražaj IL-13 i CCR3, koji slijedi zrcalni obrazac. Veća zastupljenost T-limfocita među sluzničkim limfocitima povezana je s višim izražajem IL-13 ( $p = 0,047$ ; GLMM) i nižim izražajem CCR3 prijepisa ( $p = 0,007$ ; GLMM). U skupini γδ T-limfocita, smanjenje udjela Vδ1+ γδ T stanica povezano je s porastom izražaja IL-13 ( $p = 0,029$ ; GLMM) (Slika 27).

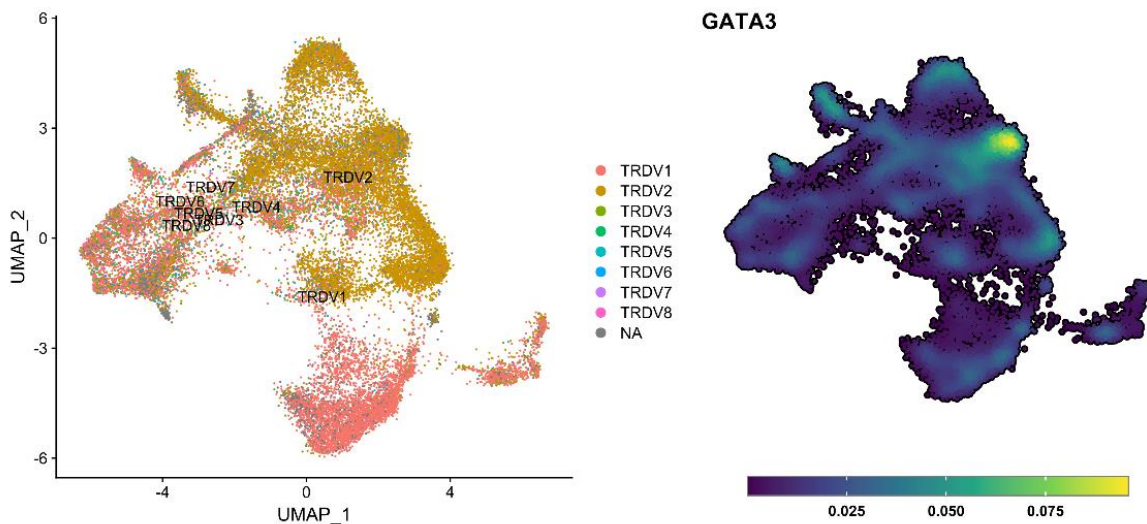
Napominjemo, navedeni rezultati nisu korigirani za broj parnih korelacija, što zahtijeva oprez u njihovom tumačenju, posebno imajući u vidu ograničeni broj ispitanika i složenu substrukturu uzoraka.



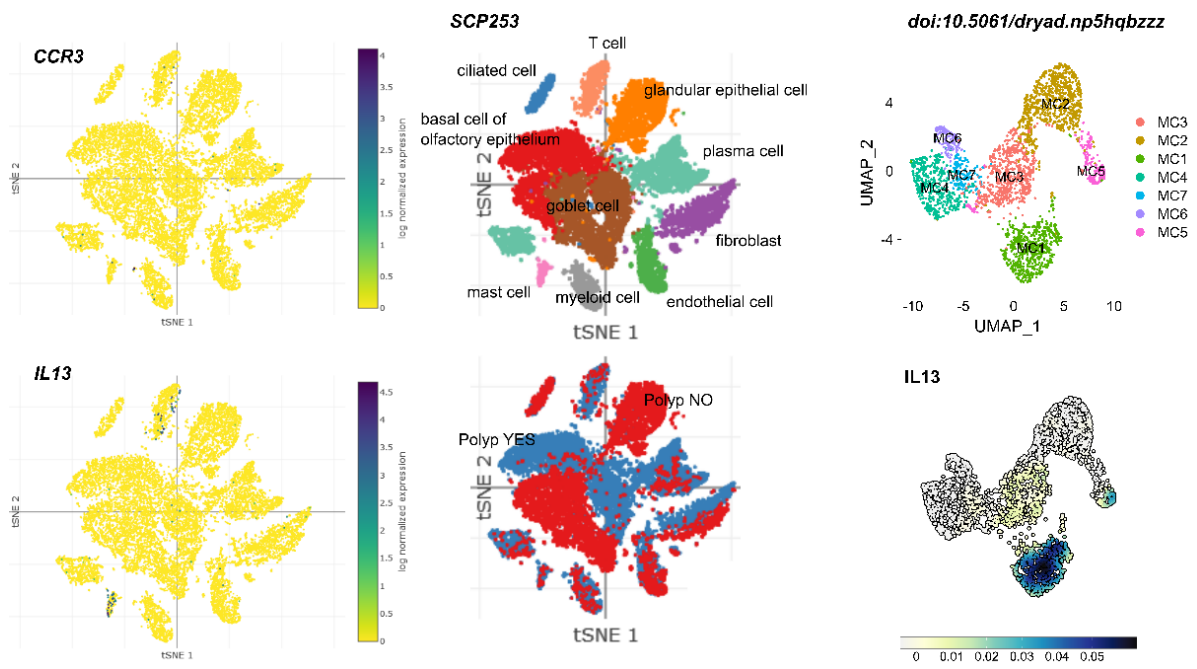
## 4.9. ANALIZA STANIČNOG IZVORA RAZLIKOVNO IZRAŽENIH PRIJEPISA PRIMJENOM JAVNO DOSTUPNIH PODATAKA SEKVENCIRANJA JEDNOSTANIČNE RNA

U ovom istraživanju, analizirana je RNA iz ukupnih mononuklearnih stanica bioptata sluznice, čime je limitiran precizniji uvid u stanični izvor razlikovno izraženih prijepisa (IL-13, CCR3). U tom razmatranju, koristili smo javno dostupne podatke sekvenciranja jednostanične RNA.

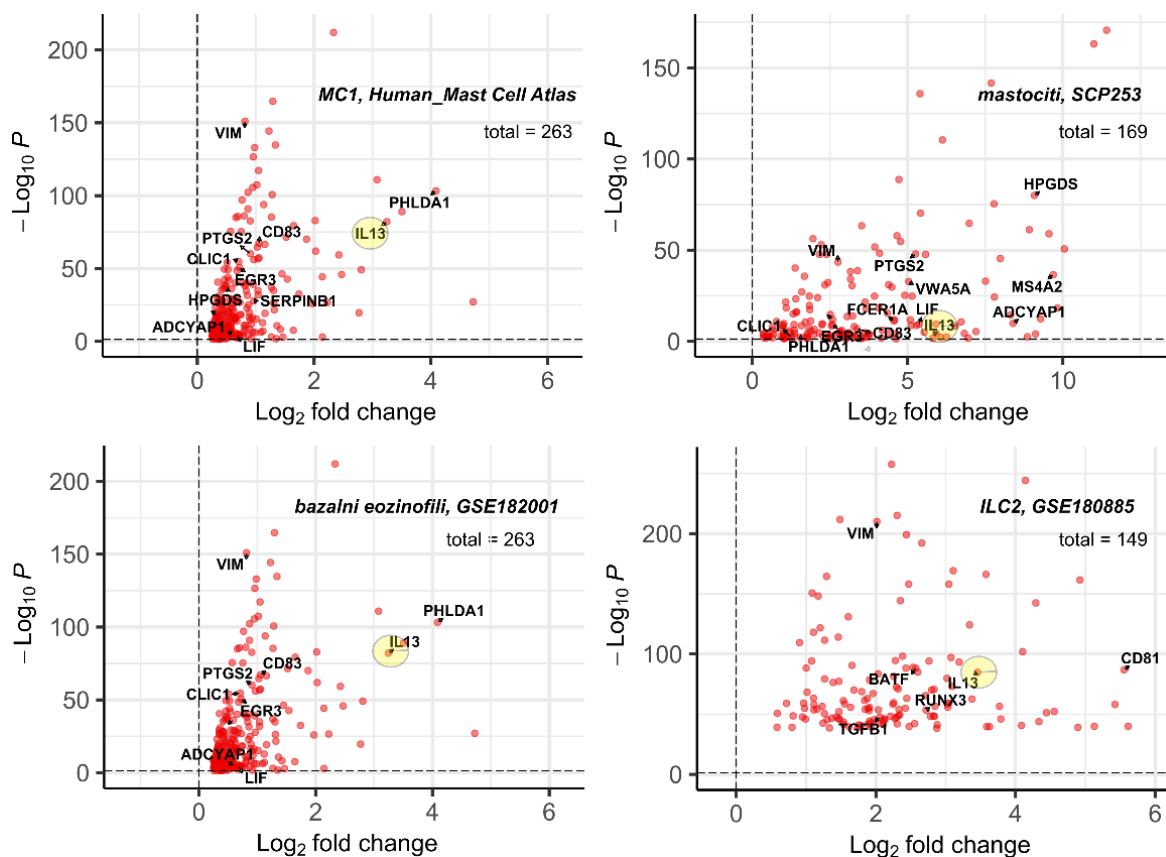
S izuzetkom GATA3 (Slika 28), u  $\gamma\delta$  T-limfocitima nije zabilježen izražaj IL-13 i CCR3 (Web izvor 1; Sanchez Sanchez G, 2022). Za razliku od  $\gamma\delta$  T-limfocita, izražaj IL-13 jasno je prisutan u dijelu (13 % stanica) mastocita polipoidne sluznice nosa (SCP253, Slika 29,  $\log_2FC=5.82$ ,  $P_{adj} = 0.02$ ), čija su obilježja slična Tauber-Basso MC1 (PHLDA1+PTGS2+) skupini mastocita (Tauber M, 2023) (Slika 29). Sporadičan izražaj IL-13 nađen je također u pojedinačnim  $\alpha\beta CD4+$  T limfocitima polipoidne sluznice nosa (Slika 29). Konačno, prirodene limfoidne stanice (*engl. innate lymphoid cells, ILC*), osobito ILC2 podtip (Alkon N, 2022), prominentan su izvor IL-13 (koža, respiratorna sluznica) (Kim, 2023) u atopijskim uvjetima (Slika 30).



**Slika 28.** Genski izražaj GATA3 u  $\gamma\delta$  T-limfocitima (scRNASeq, GSE149356). Web Izvor 1.

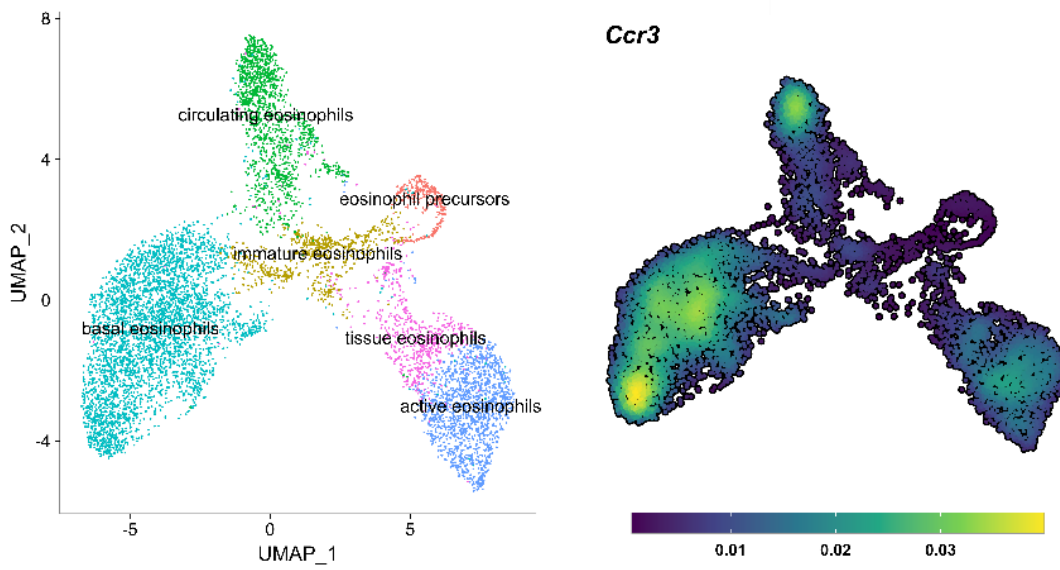


**Slika 29.** Genski izražaj IL-13 u stanicama nosne sluznice (lijevo) i humanim mastocitima (desno, scRNASeq). Web Izvor 2.



**Slika 30.** Razlikovno izražen geni u mastocitima, eozinofilima i ILC2 stanicama (scRNASeq). Žuti krug označava IL-13. Izvor: (Alkon N, 2022)

Eozinofili, koji očekivano nisu zastupljeni u ovim scRNASeq (niti su obuhvaćeni izolacijom RNA u ovom istraživanju), snažan su izvor IL-13 prijepisa (Alkon N, 2022) (Slika 30). Među njima, izražaj CCR3 osobito je intenzivan u bazalnoj grupi stanica (Slika 31), koja je malobrojna unutar krvi, ali je obilno zastupljena u slezeni i tkivnim sijelima (Gurtner A, 2023). CCR3 je također sporadično prisutan u dendritičkim stanicama, fagocitima i epitelnim, poglavito multicilijarnim stanicama dišnih puteva (Speir, 2021; Sikkema, 2023).



**Slika 31.** Genski izražaj CCR3 u eozinofilima (*Mus musculus*, scRNASeq). Izvor: (Sikkema, 2023).

## 5. RASPRAVA

---

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na potencijalno važne promjene u zastupljenosti subpopulacija  $\gamma\delta$  T-limfocita u nosnim polipima i srednjoj nosnoj školjci oboljelih od eKRSsNP. Promjene u staničnim udjelima  $\gamma\delta$  T-limfocitima koreliraju s kliničkim pokazateljima težine bolesti, kao i s udjelom eozinofila u nosu, te razinom genskog izražaja upalnih citokina IL-13 u mononuklearnim stanicama porijeklom iz polipa i srednje nosne školjke oboljelih. Povećani genski izražaj IL-13, karakterističnih biljega imunskog odgovora tipa 2, povezan je s kliničkim pokazateljima bolesti (Lund-Mackey klasifikacija) (Slika 26). S druge strane, genski izražaj TRDV1 negativno je korelirao s ukupnim vrijednostima IgE (Slika 25, Tablica 28). Izražaj GATA3 pozitivno je korelirao s porastom zastupljenosti  $\delta^2+$  u sluznici srednje nosne školjke bolesnika s eKRSsNP (Slika 27). Genski izražaj CCR3 značajno je više zastupljen u tkivu polipa i SNŠ bolesnika s eKRSsNP u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 24, Tablica 27).

U našem istraživanju značajno je više muškaraca u kategoriji s eKRSsNP, uz prisutan i veći udio eozinofila u nosu (Tablica 6). U nedavnom istraživanju autora Mihalj H. i suradnika bolesnici sa KRSsNP uglavnom su muškarci uz češće prisutnu alergijsku bolest u odnosu na kontrole, ali bez statistički značajne razlike (Mihalj, 2022). Sveukupno, ovo istraživanje donosi dosad neopisane kompozicijske promjene  $\gamma\delta$  T-limfocitnog sijela u nosnoj polipozi, a koje se zbivaju u ovisnosti o veličini eozinofilnog infiltrata i promjenama mononuklearnog transkriptoma u sinonazalnoj sluznici.

### **5.1. ZASTUPLJENOST SUBPOPULACIJA GAMMA DELTA T-LIMFOCITA U TKIVU POLIPA BOLESNIKA SA eKRSsNP I TKIVU SNŠ BOLESNIKA S eKRS TE KONTROLNIH ISPITANIKA ZNAČAJNO SE RAZLIKUJE**

U našem istraživanju muškarci su bili značajno više zastupljeni u eKRSsNP bolesnika u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Tablica 6), što je u skladu sa istraživanjima Raciborskog i suradnika koji su dokazali da je nosna polipoza značajno češća u muškaraca i to sa vrhuncem između 75. i 79. godine (Raciborski F, 2021). Stoga je omjer ispitanika u studiji odraz biološke

zastupljenosti spolova unutar populacije oboljelih. Nadalje, u spomenutom istraživanju pojavnost eKRSsNP je bila značajno češća u populaciji koja živi urbanim sredinama u odnosu na ruralno stanovništvo. U populaciji naših ispitanika zabilježeno je značajno smanjenje udjela ukupnih T-limfocita s porastom dobi bolesnika (Slika 16, Tablica 13). Lazuardi i suradnici zabilježili su povećan omjer CD4/CD8 u perifernim limfnim čvorovima kod starijih ljudi, a istovremeno apsolutne vrijednosti CD8+ T-limfocita smanjuju se s godinama (Lazuardi, 2005). Dokazano je i da se s porastom dobi značajno mijenja sastav odjeljka T-limfocita u perifernoj krvi, uključujući udjele retikuloendotelnih stanica (RTE), naivnih CD4+ T-limfocita i memorijskih stanica. Udio naivnih T-limfocita u perifernoj krvi i limfnom tkivu opada s godinama (Moro-García MA, 2013; Salam N, 2013). Također, dokazano opada i udio  $\gamma\delta$  T-limfocita s godinama, posebno na račun  $\delta 2+$  subpopulacije (Zheng R, 2014).

U skupini eKRSsNP pronađen je visok stupanj podudarnosti u sastavu staničnih populacija tkiva polipa i srednje nosne školjke istog ispitanika (Slika 15). Visok stupanj zrcaljenja između dva sijela zapažen je u udjelu T-limfocita u ukupnom limfocitnom infiltratu, u udjelu  $\gamma\delta$  stanica u CD3+ frakciji i relativnom sastavu  $\gamma\delta$  T populacije, barem u pogledu membranskog izražaja TCR V $\delta 1$  i V $\delta 2$  lanaca (Slika 15). Takav rezultat sugerira da sluznica polipa zadržava stanične sličnosti s ishodišnom sluznicom SNŠ te da njene karakteristike u tom pogledu stvaraju mikrookruženje za bujanje tkiva i razvoj nosne polipoze.

U ovoj studiji subpopulacija  $\delta 1$ - $\delta 2$ - gamma delta ( $\gamma\delta$ ) T-limfocita značajno je više zastupljena u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na tkivo SNŠ bolesnika s eKRSsNP i kontrolne ispitanike (Slika 16, Tablica 15). Dvostruko negativne stanice nisu do sada mjerene u uzorcima bolesnika s eKRSsNP, no ranija mjerenja V $\gamma 1+$ , V $\gamma 2+$ , V $\gamma 3+$  i V $\gamma 4+$  subpopulacija nisu bila značajno različita između skupine bolesnika koji boluju od KRSsNP, eKRSsNP i KRSbNP (Lee W. C., 2017). Dvostruko negativne stanice dijelom obuhvaćaju i  $\delta 3+$  limfocite koji su ranije u značajnom broju zabilježeni u upalnim bolestima crijeva (Falk MC, 1994) i u epitelu jetre, gdje se pojavljuju i  $\delta 5+$  stanice nepoznate uloge (Zhao, 2018). U studiji Tsurumotoa i suradnika, gdje su se uspoređivale razine  $\gamma\delta$  T-limfocita između uzorka nosnih polipa i donje nosne školjke, a i uzorak bolesnika s nosnim polipima s bolesnicima s dokazanim alergijama utvrđena je statistički značajno veća distribucija između dviju skupina. Zanimljiv je i nalaz relativno niskih razina  $\gamma\delta$  T-limfocita u bolesnika s dokazanim alergijama nosne sluznice, ali bez nosne polipoze (Tsurumoto, 1997). Također,  $\gamma\delta$  T-limfociti značajno su manje zastupljeni u perifernoj krvi bolesnica s endometrijalnim polipima u odnosu na zdrave ispitanice te je omjer V $\delta 1$ /V $\delta 2$

u istom uzorku povišen u bolesnica s izraženijim endometrijalnim polipima, predviđajući slabiji fertilni kapacitet u teže oboljelih bolesnica (Li X. H., 2021).

Subpopulacija  $V\delta 2^+$  zastupljenija je u tkivima polipa i SNŠ bolesnika s eKRSsNP u odnosu na uzorke SNŠ kontrolnih ispitanika te njihova zastupljenost raste s težinom bolesti, no bez statistički značajne razlike (Tablica 8). Od ranije je poznato da  $V\gamma 2V\delta 2$  stanice mogu producirati proinflamatorne citokine i kemokine, lučiti čimbenike rasta za epitelne stanice, ali i prepoznati i uništavati velik broj tumorskih stanica (Morita, 2007). Dokazana je i prisutnost  $\delta 2^+$  stanica u drugim upalnim bolestima poput psorijaze (Plužarić, 2020), koja zbog svoje povezanosti s atopijom i kronicitetom ima sličnosti s eKRS. No, u psorijazi su zabilježene i značajno manje količine  $V\gamma 9V\delta 2$  stanica u psorijatičnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (Fay, 2016). Ranije je dokazana značajno veća pojavnost  $\gamma\delta$  T-limfocita ( $V\gamma 9V\delta 2$ ) u perifernoj cirkulaciji djece s atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolne ispitanike (Cairo, 2005). Razlog statistički neznajne razlike u udjelu ovih subpopulacija u našoj studiji, mogao bi biti u relativno malom broju analiziranih uzoraka. Međutim, udjeli  $\delta 2^+$  stanica značajno koreliraju s izražajem GATA3, kanoničkog transkripcijskog čimbenika koji sudjeluje u diferencijaciji limfocita koji doprinose upali tipa 2 i sekreciji IL-4, IL-13.

Subpopulacija stanica s lancima  $\delta 1+\delta 2^-$  značajno je manje zastupljena u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na sluznicu SNŠ oboljelih i zdravih ispitanika (Slika 16, Tablica 14). Bolesnici s manjom frekvencijom roditeljskih  $\delta 1$  stanica uglavnom su pripadali uzorcima nosnih polipa bolesnika s eKRSsNP, što objašnjava negativnu korelaciju između opisanih stanica i naših ciljnih skupina bolesnika. Do sada nije istraživana uloga stanica  $\delta 1^+$  u eKRSsNP, no prema prikazanim rezultatima značajno su inhibirane te vjerojatno ne sudjeluju u patogenezi eKRSsNP. Dosadašnje studije opisuju protutumorske i antivirusne uloge  $\delta 1^+$  stanica, barem u kolorektalnom karcinomu gdje proizvodnjom IL-17 potiču upalu sluznice kolona (Wu P, 2014), a i jačaju imunološki odgovor u virusnim infekcijama poput hepatitisa (Agrati C D. G., 2001). Nadalje, prema dosadašnjim studijama u kojima je opisana zaštitna antitumorska uloga  $\delta 1^+$  subpopulacije, a s obzirom da su iste značajno više zastupljene u uzorcima kontrola u odnosu na bolesnike, moguća je zaštitna uloga ovih stanica i u nastanku nosne polipoze.

Subpopulacija  $\delta 1+\delta 2^-$  značajno je više zastupljena u muškaraca u ispitivanim uzorcima (Slika 16, Tablica 14). Naprotiv, subpopulacija  $\delta 1^- \delta 2^-$  značajno je više zastupljena u žena u odnosu na muškarce (Slika 16, Tablica 15). Do sada nisu rađene usporedbe udjela  $\gamma\delta$  T-limfocita između spolova u uzorcima polipa i SNŠ, no rađene su u perifernoj krvi, gdje je zabilježen značajno veći ukupan broj  $\gamma\delta$  T-limfocita u perifernoj krvi muškaraca i to zbog

značajno većeg udjela  $\delta 2+$  subpopulacije (Clark BL, 2020). U zdravih pojedinaca, istraživana je zastupljenost  $V\delta 1+$ ,  $V\delta 2+$  i  $V\gamma 9+$  subpopulacija u perifernoj krvi, no bez značajne razlike između oba spola (Fonseca S, 2020). Nasuprot tome, u studiji Caccamo i suradnika zabilježene su značajno veće razine  $V\gamma 9+V\delta 2+ \gamma\delta$  T-limfocita u odjeljku periferne krvi žena u odnosu na po dobi uparene muškarce (Caccamo N, 2006).

Naši rezultati pokazuju da za razliku od značajno manje zastupljenih  $\delta 1+$  stanica u tkivu polipa,  $\delta 1-$   $\delta 2-$  stanice moguće imaju patogenu ulogu u razvoju eKRSsNP, gdje djeluju poput okidača ili pojačivača Th2 upale, i stoga se ističu kao meta za buduća istraživanja staničnih medijatora upale tipa 2 u nosnoj polipozi. Obzirom na nedostupnost monoklonalnih protutijela za obilježavanje šireg panela  $\gamma\delta$  T subpopulacija, imunosni fenotip ovih potencijalno važnih limfocita ostaje nepoznat i čini važan cilj za daljnja istraživanja patogeneze KRSsNP.

## **5.2. POVEZANOST KLINIČKIH I UPALNIH BILJEGA SA SUBPOPULACIJOM GAMMA DELTA T-LIMFOCITA**

U kontrolnih ispitanika, zabilježena je negativna i značajna korelacija između količine T-limfocita u sluznici SNŠ i vrijednosti IgE u perifernoj krvi (Slika 18, Tablica 16). Slični rezultati su prisutni i u tkivu polipa i SNŠ kod bolesnika s eKRSsNP (Slika 18b), međutim isti se nisu pokazali statistički značajni. Također nije pronađena značajna povezanost vrijednosti serumske IgE sa zabilježenim promjenama u sastavu  $\gamma\delta$  T-limfocita u sinonazalnoj sluznici eKRSsNP i kontrolnih ispitanika. Dosadašnja istraživanja su pokazala prisutnost povišenih razina poliklonskih IgE u tkivu nosa kod pacijenata s i bez alergije. Sluznički IgE potječe iz mnogo različitih klonova B-stanica te ima proupalne učinke u tkivu. Smatra se da proizvodnja poliklonalnih IgE nastaje kao odgovor na enterotoksine *Staphylococcus aureus* koji djeluju kao superantigeni, aktivirajući B-stanice i T-stanice te pokrećući otpuštanje medijatora upale. U nekih pacijenata, izloženost kanoničnim antigenima dovodi do stvaranja visokih razina antigen-specifičnog IgE, koji posreduje u unakrsnom povezivanju IgE receptora visokog afiniteta na mastocitima i bazofilima, uzrokujući oslobađanje upalnih medijatora te u dijela istih i proliferaciju tkiva uz formiranje nosnih polipa (Bachert C. M., 2021). U dosadašnjim istraživanjima opisana je IgE supresivna funkcija koja se pripisuje  $\gamma\delta$  T-limfocitima koje eksprimiraju CD8, često zajedno s  $V\gamma 4$  te proizvode interferon gamma ( $IFN-\gamma$ ), citokin koji suzbija upalni odgovor tip 2 i proizvodnju IgE (Huang Y, 2009). U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u serumskoj razini ukupnog IgE, međutim te vrijednosti



ne moraju odražavati razine IgE u sinonazalnoj sluznici (Ota, 2016; De Schryver E, 2015), niti pratiti promjene u sastavu  $\gamma\delta$  T-limfocita u sinonazalnoj sluznici.

U ovoj studiji rezultati SNOT22 upitnika za procjenu težine bolesti negativno koreliraju s distribucijom subpopulacije  $\delta 1+\delta 2-$   $\gamma\delta$  T-limfocita u sluznici srednje nosne školjke bolesnika s eKRSsNP (Slika 20), dok slične povezanosti nisu pronađene u tkivu nosnih polipa i sluznice SNŠ kontrola. Obzirom na značajno nižu frekvenciju  $\delta 1+\delta 2-$  u sluznici SNŠ i polipa u odnosu na kontrole, povezanost između SNOT 22 i opisane subpopulacije zaslužuje dodatnu pozornost, no potreban je oprez u tumačenju ovih rezultata. Prema rezultatima SNOT 22 upitnika kvaliteta života KRSsNP bolesnika značajno je lošija u odnosu na bolesnike s drugim bolestima nosa (Mozzanica, 2016). Nedvojbeno je da SNOT22 ima veliku važnost u praćenju operiranih bolesnika zbog nosne polipoze i njihovih tegoba (Soler, 2018), međutim obzirom na to da se radi isključivo o subjektivnoj samoprocjeni različitih profila ispitanika, potrebna su daljnja mjerenja i istraživanja prije jasnijih zaključaka o povezanosti SNOT22 upitnika i udjela  $\gamma\delta$  T subpopulacija u sinonazalnoj sluznici. Nedostatak robusnih i konzistentnih razlika u staničnim frakcijama prema SNOT indeksu vjerojatno odražava činjenicu da se radi o subjektivnoj samoprocjeni težine bolesti, na koju mogu utjecati interindividualne razlike u osobinama ličnosti i osjetljivosti na bol, kongestiju te druge tegobe koje se vežu uz eKRSsNP.

Prema dosadašnjim istraživanjima uloga eozinofila u nastanku KRSsNP je kemotaksija imunskih stanica, citotoksično djelovanje te imunoregulatorno djelovanje (Vanderhaegen, 2021). U rutinskom radu, za objektivnu procjenu uloge alergijske bolesti u etiologiji klinički evidentnog rinosinuitisa primjenjuje se citološka analiza obriska nosa. Veći udio eozinofila u brisu nosa pokazuje umjerenu osjetljivost i visoku specifičnost za asimptomatske bolesnike s alergijskim rinitisom (AR) (Nurkic J, 2016). Također, prema Usha i suradnicima, izmjerena količina eozinofila u brisu nosa  $> 0,2/HPF$  dozvoljava postavljanje dijagnoze AR-a u odraslih (Usha, 2022). Štoviše, smanjenje broja eozinofila u nosnoj sluznici oboljelih od eKRSsNP tijekom liječenja dupilumabom govori u prilog ovisnosti udjela eozinofila i težine eKRSsNP oboljenja (Danisman, 2023).

U okviru ove studije, opažen je značajno veći udio eozinofila u obrisku nosa u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na kontrolne ispitanike (Tablica 6). Također, pronađena je značajna pozitivna korelacija između subpopulacije  $\delta 1-\delta 2-$   $\gamma\delta$  T-limfocita i udjela eozinofila u obrisku nosa (Tablica 20), dok frekvencije subpopulacije  $\delta 1+\delta 2-$  značajno negativno korelira s udjelom istih (Slika 22, Tablica 19). Time su zabilježeni dodatni potencijalni učinci eozinofilnog infiltrata na promjenu broja ukupnih  $\gamma\delta$  T i  $V\delta 1+$  limfocita u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP.

Također, ovi podaci indirektno pokazuju povezanost promjena u staničnim populacijama i težine bolesti. Ranije studije pokazale su povećan udio eozinofila u sluznici alergijskih bolesnika, kao i važnu ulogu  $\gamma\delta$  T-limfocita u alergijskim bolestima (Zheng R, 2014), ali bez usporedbi određenih subpopulacija  $\gamma\delta$  T-limfocita i udjela eozinofila u sluznici nosa.

Vrijednost sustava Lund-Mackey (LM), kao objektivnog radiološkog bodovnog sustava za procjenu zahvaćenosti sinusa upalom, pozitivno su korelirale s udjelom  $\gamma\delta$  T-limfocita u tkivu polipa. Naime, zastupljenost  $\delta 1$ - $\delta 2$ - subpopulacija u sluznici SNŠ i polipa značajno pozitivno korelira s vrijednostima LM (Tablica 18), dok udjeli  $\delta 1+\delta 2$ - negativno koreliraju s LM bodovanjem (Slika 21, Tablica 17). Sustav LM je priznat, dobro opisani alat za procjenu težine kroničnog rinosinuitisa koji u obzir uzima broj sinusa opstruiranih i zahvaćenih polipozom ili upalom, a dokazano je i da korelira sa subjektivnim tegobama pacijenta (Okushi, 2013). Pozitivna korelacija LM vrijednosti i udjela subpopulacija  $\delta 1$ - $\delta 2$ - i  $\delta 1$ - $\delta 2+$   $\gamma\delta$  T-limfocita u tom kontekstu, potvrđuje značajnu ulogu  $\gamma\delta$  T-limfocita u razvoju i težini kliničke slike eKRSsNP, a osim toga povezuje zastupljenost  $\gamma\delta$  T-limfocita u sinonazalnoj sluznici s kvalitetom života oboljelih (Schalek, 2022).

Beta aktin (ACTB1) je gen koji je u našoj studiji korišten kao kućepaziteljski ili referentni gen u svrhu normalizacije relativne kvantifikacije razina mRNA ciljnih gena (Li Z. Y., 2010). U ranijim studijama kroničnog rinosinuitisa, ACTB1 je pokazao visoku stabilnost u uzorcima eKRSsNP, ali i neozinofilnog kroničnog rinosinuitisa s nosnom polipozom (neKRSsNP) (Nakayama, 2018).

### **5.3. IL-13 I IL-4 IZRAŽAJ I POVEZANOST S $\gamma\delta$ T-LIMFOCITIMA TE KLINIČKIM I UPALNIM PARAMETRIMA**

Genski izražaj IL-13 bio je statistički značajno veći u mononuklearnim stanicama izoliranim iz tkiva polipa u odnosu na stanice iz SNŠ oboljelih i zdravih ispitanika (Slika 24, Tablica 26). Izražaj IL-4 je pratio iste trendove (Tablica 22), međutim opažene razlike nisu dosegle statističku značajnost. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima autora Babe i suradnika koji su izmjerili značajno niže razine GATA3 i RORc mRNA, kao i niske razine mRNA citokina povezanih s Treg-om uz povišene razine Th2 citokina u nosnim polipima eKRSsNP pacijenata u usporedbi s kontrolama (Baba, 2015). Kako je njihovo istraživanje uključivalo tkivo polipa, a naše izolirane mononuklearne stanice, ovi rezultati sugeriraju da je predominantni izvor IL-4 citokina u drugim nemononuklearnim stanicama. Slični rezultati su

dobiveni i u uzorcima nosne sluznice drugih atopijskih bolesti poput alergijske astme (Antczak, 2016). Uloga upale tipa Th2, a time i uloga karakterističnih linijskih citokina IL-13 i IL-4 ranije je prepoznata u KRSsNP (Schleimer RP, 2017), ali je očito značajna i u podskupini alergijskog KRSsNP. Tkivo nosnog polipa u bolesnika s eKRSsNP moguće se mijenja pod utjecajem učinaka Th2 i Th17 upale, i pripadajućih citokina. IL-4 i IL-13 štoviše inhibiraju izražaj Th17 povezanih citokina, dok Th-17 citokini (IL-17 i TGF- $\beta$ ) posredno povećavaju razine Th2 citokina. Iako se rezultati ove studije ne dotiču regulatornih mehanizama Th2 i Th17 imunskog odgovora, pretpostavka je da Th2 upalu u eKRSsNP potpomaže i stimulacija Th17 (Ryu G, 2020). Wang i suradnici su pomoću RT-qPCR analize pokazali da mRNA razine IL-4 i IL-13 snažno induciraju genski i proteinski izražaj Sonic Hedgehog signalnog puta, koji pak značajno doprinosi razvoju Th2 imunskog odgovora i posljedičnoj metaplaziji i hipersekreciji sinonazalne sluznice epitela dišnih puteva (Wang X, 2020). Važnu ulogu ovih citokina u eKRSsNP potvrđuju i izvrsni rezultati liječenja primjenom anti-IL4 i anti-IL13 bioloških pripravaka poput dupilumaba sa značajnim smanjenjem recidiva (Bachert C. H., 2019).

Dodatni nalaz ove studije je značajno manji genski izražaj IL-13 u muškaraca u odnosu na žene (Slika 26). Rezultati sličnih usporedbi nisu dostupni iz humanih studija, ali je jednaka korelacija pronađena u mišjih modela. Jedan od uzroka spolne razlike u izražaju IL-13 može biti u suprotnoj ulozi IL-13 i estrogena u regulaciji funkcije makrofaga (dok ih IL-13 potiče na stvaranje, estrogen ih inhibira) (Sinha S, 2008).

Genski izražaj IL-13 pozitivno i značajno korelira s vrijednostima Lund-Mackey klasifikacije, podjednako u ograničenoj (D1) i proširenoj bolesti (D2, Tablica 29, Slika 26) što upućuje na povezanost izražaja ovog gena i težine kliničke slike u bolesnika s eKRSsNP. Prema ranijoj studiji Hopkinsa i suradnika, LM klasifikacija značajno je povezana s drugim čimbenicima težine kliničke slike eKRSsNP, poput SNOT22. Također, povišena LM vrijednost indicira opsežniji operativni zahvat i povećava rizik za recidiv nosne polipoze (Hopkins C, 2007). U dosadašnjim studijama IL-13 se pokazao kao dobar marker u procjeni statusa alergijske bolesti. Primjerice, Champion JC i suradnici su pokazali da nazalna proizvodnja IL-13 identificira pacijente s kasnom fazom alergijskih odgovora tijekom testa provokacije na pelud breze (Champion, 2023). Nadalje, recentna studija Yu BA SE i suradnika je pokazala da povišene razine IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , CCL2 i CXCL-8 koreliraju s višim rezultatima SNOT-22 u bolesnika s kroničnim rinosinuitisom (Yu S. E., 2024). Ovi rezultati su dodatno potvrđeni istraživanjima na izražaju jednostanične RNA, koja su pokazala da remodeliranje epitela povezano s IL-13 korelira s kliničkom težinom nosne polipoze (Kotas, 2023).

Genski izražaj IL-13 u našem istraživanju pozitivno i značajno korelira s udjelima ukupnih T-limfocita (Slika 27) u sinonazalnoj sluznici i nosnim polipima. S druge strane, unatoč značajno višim razinama IL-13 mRNA u tkivu bolesnika u odnosu na kontrole, nisu pronađene značajne pozitivne korelacije s udjelom limfocitnih populacija unutar  $\gamma\delta$  T-limfocitnog odjeljka dok je daljnom analizom unutar subpopulacija  $\gamma\delta$  T-limfocita uočena značajna negativna korelacija između udjela  $V\delta 1+$   $\gamma\delta$  T i izražaja IL-13 (Slika 27). Dobiveni rezultati sugeriraju da izvor IL-13 nisu  $\gamma\delta$  T-limfociti, a tome u prilog idu i rezultati analize jednostanične RNA (Slika 29). Isti ukazuju na to da IL-13 većinom potječe iz mastocita u sluznici nosa, koji su također značajno prisutni u nosnoj polipozi (Takabayashi T K. A., 2012). Suprotno ovim rezultatima, patološka uloga  $\delta 1+$   $\gamma\delta$  T-limfocita ranije je opisana na drugim mjestima dišnog sustava, poput pluća, gdje  $\delta 1+$   $\gamma\delta$  T-limfociti izražavaju CD30 i IL-4 čime pogoršavaju alergijske simptome (Kang I. K., 2023). Zbog biološke raznolikosti  $\gamma\delta$  T-staničnih receptora potrebne su međutim, dodatne studije za razjašnjenje uloge fenotipski nedefiniranih  $\gamma\delta$  T-limfocita u eKRSsNP.

#### **5.4. GATA3 GENSKI IZRAŽAJ I POVEZANOST SA $\gamma\delta$ T-LIMFOCITIMA TE KLINIČKIM I UPALNIM PARAMETRIMA**

Genski izražaj GATA3 neznajčajno je veći u uzorcima polipa i SNŠ u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na kontrole te nije povezan s kliničkim pokazateljima težine bolesti (Tablica 22). Ovi su rezultati u skladu s rezultatima Lalu i suradnici, koji nisu zabilježili značajnu korelaciju između izražaja GATA3 i tkivne eozinofilije (Lal D. W.-H., 2019), dok su Babe i suradnici utvrdili značajno niži genski izražaj GATA3 u alergijskom KRSsNP. Ove razlike potencijalno odražavaju razlike u izboru biološkog materijala, pri čemu je genska analiza u okviru ove studije provedene u tkivnim mononuklearima, a ne tkivu polipa ili sinonazalne sluznice. U uzorcima SNŠ bolesnika s eKRSsNP izražaj GATA3 pozitivno i značajno korelira s  $\delta 2+$  subpopulacijom (Slika 27), što odražava moguću ulogu GATA3 u diferencijaciji tipa 2  $\gamma\delta$  T-limfocita (Hsu, 2023). U studiji Soklića i suradnika zabilježen je značajno veći izražaj GATA3 u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na bolesnike s KRSbNP, što ukazuje na važnu ulogu izražaja toga gena u patogenezi nastanka nosne polipoze (Soklic TK, 2019). S obzirom na to da GATA3 ima poznatu ulogu promotora i biljega Th2 upale (Breiteneder, 2020), ali i dokazano pojačani izražaj u nosnoj polipozi u tkivu polipa (Mjösberg, 2012), korelacijom u našoj studiji, pretpostavlja se i važna uloga  $\delta 2+$  subpopulacije patofiziologiji nosne polipoze. Uloga GATA3 u mononuklearnim stanicama nosne sluznice do

sada nije istražena, no pozitivna korelacija s GATA3 i V $\delta$ 2+ stanica ukazuje na potencijalno važnu ulogu u patofiziologiji upale u eKRSsNP.

## **5.5. GENSKI IZRAŽAJ TRDV1, TRDV2 I TRDV3 TE POVEZANOST SA $\gamma\delta$ T-LIMFOCITIMA TE KLINIČKIM I UPALNIM PARAMETRIMA**

Tijekom razvoja i diferencijacije T-limfocita, delta ( $\delta$ ) se lanac sintetizira rekombinacijom TRDD i TRDJ sastavnica, i potom udružuje s jednom od brojnih genskih varijanti TRDV gena (Satyanarayana, 1988). Zabilježena je negativna korelacija između izražaja fuzijskih transkripata TRDV1 i serumske razine IgE u tkivu polipa (Slika 25, Tablica 28). Zanimljivo, Settipane i suradnici ranije su utvrdili veću razinu tkivnog IgE u nosnom polipu u odnosu na serumske i tkivne razine u tonzilama eKRSsNP oboljelih (Settipane G, 1996). Ranije je također dokazana povezanost serumske razine IgE s težinom lokalne upale u nosnoj polipozi i tkivnom razinom IgE (Bachert C. G., 2001). U našem istraživanju negativna korelacija između TRDV1 i IgE u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP upućuje na suprotnu, potencijalno protektivnu ulogu  $\delta$ 1+ subpopulacije u održavanju razine IgE protutijela u sinonazalnoj sluznici. U budućim istraživanjima potrebno je analizirati ukupni repertoar  $\gamma\delta$  T staničnih receptora u potrazi za rizičnim  $\gamma\delta$  T subpopulacijama u pozadini eKRSsNP.

Genski izražaj TRDV2 nije pokazao značajne razlike između ispitivanih skupina, dok genski izražaj TRDV3 nije zabilježen u niti jednom uzorku. Značajno veći genski izražaj TRDV3 zabilježen je u intraepitelnim stanicama crijeva oboljelih od celijakije, kronične upalne bolesti uzrokovane izlaganju glutenom (Eggesbø, 2020). Naši neobjavljeni podaci RNASeq analize TRD repertoara iz krvi oboljelih od psorijaze pokazuju bogat izražaj TRDV3 prijepisa u pojedinih ispitanika, što potvrđuje nerijetku pojavu ovih stanica u krvi, koje mogu migrirati na upalna područja. Moguće da je izražaj TRDV3 gena izostao zbog suboptimalne kombinacije na zahtjev dizajniranih kompleta TaqMan proba i početnica.

## **5.6 GENSKI IZRAŽAJ CCR3 I MMP7 TE POVEZANOST SA $\gamma\delta$ T-LIMFOCITIMA TE KLINIČKIM I UPALNIM PARAMETRIMA**

U ovoj studiji nije bilo značajne razlike između ispitivanih skupina u izražaju MMP7 (Tablica 22). Iako je od ranije poznata značajna prisutnost MMP7 u tkivu polipa u bolesnika s eKRSsNP (Schleimer RP, 2017), nedostatak značajnih rezultata u našoj studiji moguće odražava veličinu uzorka. Za razliku od MMP7, CCR3 mRNA značajno je izraženiji u sluznici SNŠ i polipa oboljelih u odnosu na sluznicu SNŠ kontrola (Slika 24, Tablica 27). U studiji Fundove i suradnika, pokazan je značajno veći udio CCR3 i CCR1 pozitivnih stanica u bolesnika s nosnom polipozom u odnosu na ispitanike sa zdravom sluznicom (Fundová P, 2012), što je u skladu s našim rezultatima i potvrđuje važnu ulogu kemotaksije eozinofila posredovano CCR3 receptorima. CCR3 veže tri eotaksinske obitelji proteina (eotaxin-1/CCL11, eotaxin-2/CCL24, eotaxin-3/CCL26) koji djeluju kemotaksijski na eozinofile (Saito, 2016), a sve tri eotaksinske obitelji značajno su povećane u tkivu polipa u odnosu na kontrolne ispitanike (Olze, 2006).

## **5.7. OGRANIČENJE ISTRAŽIVANJA**

U svrhu preciznijeg uvida u fenotip i ulogu  $\gamma\delta$  T-limfocita, ali i važnosti istraženih gena, bilo bi zanimljivo učiniti prospektivnu studiju bolesnika s eKRSsNP koji se koriste intranazalnom kortikosteroidnom terapijom i u slučaju recidiva nosne polipoze i potrebe za novim operativnim zahvatom ponoviti uzorkovanje SNŠ i polipa te usporediti izražaj gena i količinu  $\gamma\delta$  T-limfocita.

Poželjno je i dobivene rezultate ponoviti u proširenoj skupini bolesnika te uključiti i bolesnike s komorbidirajućom astmom za koju se smatra da u tih bolesnika ima vrlo sličan mehanizam upale kao i nosna polipoza te usporediti iste parametre.

Također, mogla bi biti korisna i nadopuna alergijske obrade u tih bolesnika, prvenstveno testom PRICK te serumskim eozinofilnim kationskim proteinom.

Unatoč ograničenjima, dobiveni rezultati tkivnih udjela i transkripcijskih profila  $\gamma\delta$  T-limfocita i drugih mononukleara polipoidne i sinonazalne sluznice, proširuju dosadašnje spoznaje o patogenezi eKRSsNP, otkrivajući nove, potencijalno važne dijagnostičke, terapijske i istraživačke mete.

## 6. ZAKLJUČAK

---

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati iznjedrili su sljedeće zaključke:

1. Bolesnici s eozinofilnim kroničnim rinosinitisom s nosnom polipozom (eKRSsNP) pretežno su muškog spola. Veći udio eozinofila u nosu zabilježen je u bolesnika s eKRSsNP što potvrđuje ovaj dijagnostički postupak kao važan u otkrivanju eKRSsNP.
2. Subpopulacija  $\delta 1$ - $\delta 2$ -  $\gamma\delta$  T-limfocita značajno je više zastupljena u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz sluznice polipa i sluznice SNŠ u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na populaciju mononuklearnih stanica izoliranih iz sluznice srednje nosne školjke (SNŠ) kontrolnih ispitanika. Osim toga, značajno veći udio  $\delta 1$ - $\delta 2$ - subpopulacije zastupljen je u žena u odnosu na muškarce. Navedeni rezultati ukazuju na mogući doprinos dvostruko negativnih  $\delta 1$ - $\delta 2$ - subpopulacija u razvoju nosne polipoze.
3. Subpopulacija  $\delta 1+\delta 2$ -  $\gamma\delta$  T-limfocita značajno je manje zastupljena u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz sluznice polipa i SNŠ u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na populaciju mononuklearnih stanica izoliranih iz sluznice SNŠ kontrolnih ispitanika. Značajno veći udio  $\delta 1+\delta 2$ - subpopulacije zastupljen je u muškaraca u usporedbi sa ženama. Navedeni rezultati ukazuju na moguću zaštitnu ulogu subpopulacije  $\delta 1+\delta 2$ - od nastanka eKRSsNP.
4. Objektivni klinički pokazatelji težine bolesti eKRSsNP (udio eozinofila na nosnoj sluznici, Lund-Mackey sustav) pozitivno koreliraju sa zastupljenosti subpopulacije  $\delta 1$ - $\delta 2$ -  $\gamma\delta$  T-limfocita u tkivu polipa i sluznice SNŠ u bolesnika s eKRSsNP, što ukazuje na moguću ulogu ove subpopulacije  $\gamma\delta$  T-limfocita kako u razvoju upale tipa 2 tako i u progresiji i težini bolesti.
5. Subpopulacija  $\delta 1+\delta 2$ -  $\gamma\delta$  T-limfocita negativno korelira s udjelom eozinofila u nosu bolesnika s eKRSsNP, ali i Lund-Mackey sustavom. Ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu ove subpopulacije u inhibiciji upale tipa 2 te ublažavanju kliničke slike ove bolesti.
6. Genski izražaj IL-13 značajno je veći u sluznici polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na sluznicu SNŠ bolesnika s eKRSsNP i kontrolnih ispitanika. Porastom izražaja IL-13 značajno raste vrijednost Lund-Mackey sustava što ukazuje na ulogu ovog citokina u progresiji i težini bolesti. Izražaj IL-13 značajno negativno korelira sa zastupljenošću

subpopulacije  $\delta 1+\delta 2-$  što dodatno ukazuje na moguću zaštitnu ulogu ove subpopulacije na nastanak nosne polipoze. Izražaj IL-13 značajno je veći u žena.

7. Genski izražaj CCR3 značajno je veći u sluznici polipa u odnosu na sluznicu SNŠ bolesnika s eKRSsNP i kontrola što potvrđuje ulogu ovih receptora u nastanku upale tipa 2.
8. Genski izražaj TRDV1 značajno negativno korelira s serumskom razinom IgE u oboljelih od eKRSsNP što ukazuje na moguću zaštitnu ulogu TRDV1 u nastanku alergijskih bolesti . Porastom dobi smanjuje se genski izražaj TRDV1.
9. Izražaj GATA3 značajno pozitivno korelira sa subpopulacijom  $\delta 2+ \gamma \delta$  T-limfocita što ukazuje na potencijalnu ulogu  $\delta 2+$  subpopulacije u diferencijaciji upale tipa 2.



## 7. REFERENCE

---

- Adams, E. J., Gu, S., & Luoma, A. M. (2015). Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cellular immunology*, 296(1), 31–40.
- Agrati, C., Cimini, E., Sacchi, A., Bordoni, V., Gioia, C., Casetti, R., Turchi, F., Tripodi, M., & Martini, F. (2009). Activated V gamma 9V delta 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1), 522–529.
- Agrati, C., D'Offizi, G., Narciso, P., Abrignani, S., Ippolito, G., Colizzi, V., & Poccia, F. (2001). Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 7(1), 11–19.
- Albu, S. (2020). Chronic Rhinosinusitis-An Update on Epidemiology, Pathogenesis and Management. *J Clin Med.*;9(7):2285.
- Alkon N, Bauer WM, Krausgruber T, Goh I, Griss J, Nguyen V, Reininger B, Bangert C, Staud C, Brunner PM, Bock C, Haniffa M, Stingl G. Single-cell analysis reveals innate lymphoid cell lineage infidelity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2022 Feb;149(2):624-639.
- Amirapu, S., Biswas, K., Radcliff, F.J., Wagner Mackenzie, B., Ball, S., Douglas, R.G. (2021). Sinonasal Tissue Remodelling during Chronic Rhinosinusitis. *Int J Otolaryngol.*; 2021:7428955.
- Antczak, A., Domańska-Senderowska, D., Górski, P., Pastuszek-Lewandoska, D., Nielepkowicz-Goździńska, A., Szewczyk, K., Brzezińska- Lasota, E. (2016). Analysis of changes in expression of IL-4/IL-13/STAT6 pathway and correlation with the selected clinical parameters in patients with atopic asthma. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(2), 195–204.
- Baba, S., Kagoya, R., Kondo, K., Suzukawa, M., Ohta, K., Yamasoba, T. (2015). T-cell phenotypes in chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Japanese patients. *Allergy Asthma Clin Immunol.*;11:33.
- Bachert, C., Gevaert, P., Holtappels, G., Johansson, S. G., & van Cauwenberge, P. (2001). Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 107(4), 607–614.
- Bachert, C., Han, J. K., Desrosiers, M., Hellings, P. W., Amin, N., Lee, S. E., Mullol, J., Greos, L. S., Bosso, J. V., Laidlaw, T. M., Cervin, A. U., Maspero, J. F., Hopkins, C., Olze, H., Canonica, G. W., Paggiaro, P., Cho, S. H., Fokkens, W. J., Fujieda, S., Zhang, M., Mannent, L. P. (2019). Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind,

placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet* (London, England), 394(10209), 1638–1650.

- Bachert, C., Maurer, M., Palomares, O., & Busse, W. W. (2021). What is the contribution of IgE to nasal polyposis?. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 147(6), 1997–2008.
- Bachert, C., Zhang, N., Cavaliere, C., Weiping, W., Gevaert, E., & Krysko, O. (2020). Biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 145(3), 725–739.
- Bank, I., & Marcu-Malina, V. (2014). Quantitative peripheral blood perturbations of  $\gamma\delta$  T cells in human disease and their clinical implications. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 47(3), 311–333.
- Bankova, L. G., & Barrett, N. A. (2020). Epithelial cell function and remodeling in nasal polyposis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 124(4), 333–341.
- Bao Y, Zhu X. Role of Chemokines and Inflammatory Cells in Respiratory Allergy. *J Asthma Allergy*. 2022;15:1805-1822
- Bassis, C. M., Tang, A. L., Young, V. B., & Pynnonen, M. A. (2014). The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*, 2, 27.
- Benninger, M. S., Ferguson, B. J., Hadley, J. A., Hamilos, D. L., Jacobs, M., Kennedy, D. W., Lanza, D. C., Marple, B. F., Osguthorpe, J. D., Stankiewicz, J. A., Anon, J., Denny, J., Emanuel, I., & Levine, H. (2003). Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 129(3 Suppl), S1–S32.
- Beule, A. (2015). Epidemiology of chronic rhinosinusitis, selected risk factors, comorbidities, and economic burden. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 14, Doc 11
- Beule, A. G. (2010). Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 9. Doc07.
- Born, W. K., Huang, Y., Jin, N., Huang, H., & O'Brien, R. L. (2010). Balanced approach of  $\gamma\delta$  T cells to type 2 immunity. *Immunology and cell biology*, 88(3), 269–274.
- Breiteneder, H., Peng, Y. Q., Agache, I., Diamant, Z., Eiwegger, T., Fokkens, W. J., Traidl-Hoffmann, C., Nadeau, K., O'Hehir, R. E., O'Mahony, L., Pfaar, O., Torres, M. J., Wang, D. Y., Zhang, L., & Akdis, C. A. (2020). Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma. *Allergy*, 75(12), 3039–3068.
- Burke, B. (2004). The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology*, 209(1-2), 51–56.

- Caccamo, N., Dieli, F., Wesch, D., Jomaa, H., & Eberl, M. (2006). Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *Journal of leukocyte biology*, 79(4), 663–666.
- Cairo, C., Arabito, E., Landi, F., Casati, A., Brunetti, E., Mancino, G., & Galli, E. (2005). Analysis of circulating gammadelta T cells in children affected by IgE-associated and non-IgE-associated allergic atopic eczema/dermatitis syndrome. *Clinical and experimental immunology*, 141(1), 116–121.
- Champion, N. J., Villazala-Merino, S., Thwaites, R. S., Stanek, V., Killick, H., Pertsinidou, E., Zghaebi, M., Toth, J., Fröschl, R., Perkmann, T., Gangl, K., Schneider, S., Ristl, R., Scott, I. C., Cohen, E. S., Molin, M., Focke-Tejkl, M., Regelsberger, G., Hansel, T. T., Valenta, R., Niederberger-Leppin, V., Eckl-Dorna, J. (2023). Nasal IL-13 production identifies patients with late-phase allergic responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 152(5), 1167–1178.e12.
- Carsuzaa, F., Béquignon, É., Dufour, X., de Bonnecaze, G., Lecron, J. C., & Favot, L. (2021). Cytokine Signature and Involvement in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 417.
- Chai, H., Xu, F., Wang, J., Zhang, Y., Xie, X., Zhou, H., Liu, Y., Liang, X., & Wang, A. (2023). Profiling CCR3 target pathways for discovering novel antagonists from natural products using label-free cell phenotypic assays. *Chemico-biological interactions*, 385, 110732.
- Clark, B. L., & Thomas, P. G. (2020). A Cell for the Ages: Human  $\gamma\delta$  T Cells across the Lifespan. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 8903.
- Chang, C. H., Chai, C. Y., Ho, K. Y., Kuo, W. R., Tai, C. F., Lin, C. S., Tsai, S. M., Wu, S. C., & Juan, K. H. (2001). Expression of transforming growth factor-beta 1 and alpha-smooth muscle actin of myofibroblast in the pathogenesis of nasal polyps. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 17(3), 133–138.
- Chong, V. F., Fan, Y. F., Lau, D., & Sethi, D. S. (1998). Functional endoscopic sinus surgery (FESS): what radiologists need to know. *Clinical radiology*, 53(9), 650–658.
- Danilova, E., Skrindo, I., Gran, E., Hales, B. J., Smith, W. A., Jahnsen, J., Johansen, F. E., Jahnsen, F. L., & Baekkevold, E. S. (2015). A role for CCL28-CCR3 in T-cell homing to the human upper airway mucosa. *Mucosal immunology*, 8(1), 107–114.
- Danisman, Z., Linxweiler, M., Kühn, J. P., Linxweiler, B., Solomayer, E. F., Wagner, M., Wagenpfeil, G., Schick, B., & Berndt, S. (2023). Differential nasal swab cytology represents a valuable tool for therapy monitoring but not prediction of therapy response in chronic rhinosinusitis with nasal polyps treated with Dupilumab. *Frontiers in immunology*, 14, 1127576.
- del Toro E, Portela J. Nasal Polyps. 2023 Jul 31. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32809581. Pristupljeno: 01.10.2023. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32809581/>

- Deniger, D. C., Moyes, J. S., & Cooper, L. J. (2014). Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Frontiers in immunology*, 5, 636.
- De Schryver, E., Devuyst, L., Derycke, L., Dullaers, M., Van Zele, T., Bachert, C., & Gevaert, P. (2015). Local immunoglobulin e in the nasal mucosa: clinical implications. *Allergy, asthma & immunology research*, 7(4), 321–331.
- Dietz de Loos, D., Lourijsen, E. S., Wildeman, M. A. M., Freling, N. J. M., Wolvers, M. D. J., Reitsma, S., & Fokkens, W. J. (2019). Prevalence of chronic rhinosinusitis in the general population based on sinus radiology and symptomatology. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 143(3), 1207–1214.
- Du, K., Wang, M., Zhang, N., Yu, P., Wang, P., Li, Y., Wang, X., Zhang, L., & Bachert, C. (2021). Involvement of the extracellular matrix proteins periostin and tenascin C in nasal polyp remodeling by regulating the expression of MMPs. *Clinical and translational allergy*, 11(7), e12059.
- Eberhardt, J. A., Torabinejad, M., & Christiansen, E. L. (1992). A computed tomographic study of the distances between the maxillary sinus floor and the apices of the maxillary posterior teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 73(3), 345–346.
- Eggesbø, L. M., Risnes, L. F., Neumann, R. S., Lundin, K. E. A., Christophersen, A., & Sollid, L. M. (2020). Single-cell TCR sequencing of gut intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells reveals a vast and diverse repertoire in celiac disease. *Mucosal immunology*, 13(2), 313–321.
- Falk, M. C., NG, G., Zhang, G. Y., Fanning, G. C., Kamath, K. R., & Knight, J. F. (1994). Predominance of T cell receptor V delta 3 in small bowel biopsies from coeliac disease patients. *Clinical and experimental immunology*, 98(1), 78–82.
- Fay, N. S., Larson, E. C., & Jameson, J. M. (2016). Chronic Inflammation and  $\gamma\delta$  T Cells. *Frontiers in immunology*, 7, 210.
- Feazel, L. M., Robertson, C. E., Ramakrishnan, V. R., & Frank, D. N. (2012). Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 122(2), 467–472.
- Fleming, C., Morrissey, S., Cai, Y., & Yan, J. (2017).  $\gamma\delta$  T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression. *Trends in cancer*, 3(8), 561–570.
- Fokkens, W. J., Lund, V. J., Hopkins, C., Hellings, P. W., Kern, R., Reitsma, S., Toppila-Salmi, S., Bernal-Sprekelsen, M., Mullol, J., Alobid, I., Terezinha Anselmo-Lima, W., Bachert, C., Baroody, F., von Buchwald, C., Cervin, A., Cohen, N., Constantinidis, J., De Gabory, L., Desrosiers, M., Diamant, Z., ... Zwetsloot, C. P. (2020). European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*, 58(Suppl S29), 1–464.
- Folci, M., Ramponi, G., Arcari, I., Zumbo, A., & Brunetta, E. (2021). Eosinophils as Major Player in Type 2 Inflammation: Autoimmunity and Beyond. *Advances in experimental medicine and biology*, 1347, 197–219.

- Fonseca, S., Pereira, V., Lau, C., Teixeira, M. D. A., Bini-Antunes, M., & Lima, M. (2020). Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells*, 9(3), 729.
- Freeman SC., Karp DA., Kahwaji, CI. Physiology, Nasal. (2023). In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 30252342. Pristupljeno: 01.10.2023. Dostupno na : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252342/>
- Fujieda, S., Imoto, Y., Kato, Y., Ninomiya, T., Tokunaga, T., Tsutsumiuchi, T., Yoshida, K., Kidoguchi, M., & Takabayashi, T. (2019). Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 68(4), 403–412.
- Fundová, P., Funda, D. P., Kovář, D., Holý, R., Navara, M., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2013). Increased expression of chemokine receptors CCR1 and CCR3 in nasal polyps: molecular basis for recruitment of the granulocyte infiltrate. *Folia microbiologica*, 58(3), 219–224.
- Gevaert, P., Han, J. K., Smith, S. G., Sousa, A. R., Howarth, P. H., Yancey, S. W., Chan, R., & Bachert, C. (2022). The roles of eosinophils and interleukin-5 in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *International forum of allergy & rhinology*, 12(11), 1413–1423.
- Gorski, S. A., Hahn, Y. S., & Braciale, T. J. (2013). Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003615.
- Gour, N., & Wills-Karp, M. (2015). IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*, 75(1), 68–78.
- Gu, Y., Tang, S., Wang, Z., Cai, L., Lian, H., Shen, Y., & Zhou, Y. (2021). A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of  $\beta$ -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*, 12(1), 6166–6185.
- Guerra, G., Testa, D., Salzano, F. A., Tafuri, D., Hay, E., Schettino Bs, A., Iovine, R., Marcuccio, G., & Motta, G. (2021). Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: Etiopathogenesis and Recurrence. *Ear, nose, & throat journal*, 100(5\_suppl), 597S–605S.
- Gurtner, A., Borrelli, C., Gonzalez-Perez, I., Bach, K., Acar, I. E., Núñez, N. G., Crepaz, D., Handler, K., Vu, V. P., Lafzi, A., Stirm, K., Raju, D., Gschwend, J., Basler, K., Schneider, C., Slack, E., Valenta, T., Becher, B., Krebs, P., Moor, A. E., ... Arnold, I. C. (2023). Active eosinophils regulate host defence and immune responses in colitis. *Nature*, 615(7950), 151–157.
- Hahn, Y. S., Taube, C., Jin, N., Sharp, L., Wands, J. M., Aydintug, M. K., Lahn, M., Huber, S. A., O'Brien, R. L., Gelfand, E. W., & Born, W. K. (2004). Different potentials of gamma delta T cell subsets in regulating airway responsiveness: V gamma 1+ cells,

but not V gamma 4+ cells, promote airway hyperreactivity, Th2 cytokines, and airway inflammation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 172(5), 2894–2902.

- Havel, M., Kornes, T., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., & Sundberg, J. (2016). Eliminating paranasal sinus resonance and its effects on acoustic properties of the nasal tract. *Logopedics, phoniatrics, vocology*, 41(1), 33–40.
- Hellings, P. W., & Steelant, B. (2020). Epithelial barriers in allergy and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 145(6), 1499–1509.
- Heritage, P. L., Underdown, B. J., Arsenault, A. L., Snider, D. P., & McDermott, M. R. (1997). Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(4 Pt 1), 1256–1262.
- Himi, T., Takano, K., Ogasawara, N., Go, M., Kurose, M., Koizumi, J., Kamekura, R., Kondo, A., Ohkuni, T., Masaki, T., Kojima, T., Sawada, N., & Tsutsumi, H. (2011). Mucosal immune barrier and antigen-presenting system in human nasal epithelial cells. *Advances in otolaryngology*, 72, 28–30.
- Hirata, N., Takeuchi, K., Majima, Y., & Sakakura, Y. (2000). The Vdelta1 T cell receptor repertoire in human nasal mucosa. *Scandinavian journal of immunology*, 52(4), 380–384.
- Hopkins, C., Browne, J. P., Slack, R., Lund, V., & Brown, P. (2007). The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict?. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 137(4), 555–561.
- Hsu, U. H., & Chiang, B. L. (2023).  $\gamma\delta$  T Cells and Allergic Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 65(2), 172–182.
- Huang, Y., Jin, N., Roark, C. L., Aydintug, M. K., Wands, J. M., Huang, H., O'Brien, R. L., & Born, W. K. (2009). The influence of IgE-enhancing and IgE-suppressive gammadelta T cells changes with exposure to inhaled ovalbumin. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 183(2), 849–855.
- Hwang, S. S., Lee, S., Lee, W., & Lee, G. R. (2010). GATA-binding protein-3 regulates T helper type 2 cytokine and ifng loci through interaction with metastasis-associated protein 2. *Immunology*, 131(1), 50–58.
- Iinuma, T., Okamoto, Y., Yamamoto, H., Inamine-Sasaki, A., Ohki, Y., Sakurai, T., Funakoshi, U., Yonekura, S., Sakurai, D., Hirahara, K., & Nakayama, T. (2015). Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 114(4), 289–298.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133.

- Ivanovska, M., Abdi, Z., Murdjeva, M., Macedo, D., Maes, A., & Maes, M. (2020). CCL-11 or Eotaxin-1: An Immune Marker for Ageing and Accelerated Ageing in Neuro-Psychiatric Disorders. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(9), 230.
- Iwaszko, M., Biały, S., & Bogunia-Kubik, K. (2021). Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*, 10(11), 3000.
- Hwang, S. S., Lee, S., Lee, W., & Lee, G. R. (2010). GATA-binding protein-3 regulates T helper type 2 cytokine and ifng loci through interaction with metastasis-associated protein 2. *Immunology*, 131(1), 50–58.
- Kang, I., Kim, Y. & Lee, H.K. (2023). Double-edged sword:  $\gamma\delta$  T cells in mucosal homeostasis and disease. *Exp Mol Med* 55, 1895–1904.
- Katainen, E., Kostamo, K., Virkkula, P., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Haapaniemi, A., & Toskala, E. (2015). Local and systemic proteolytic responses in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis and asthma. *International forum of allergy & rhinology*, 5(4), 294–302.
- Kilic, H., Karalezli, A., Hasanoglu, H. C., Erel, O., & Ates, C. (2012). The relationship between hs-CRP and asthma control test in asthmatic patients. *Allergologia et immunopathologia*, 40(6), 362–367.
- Kim, B. S., Siracusa, M. C., Saenz, S. A., Noti, M., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Hepworth, M. R., Van Voorhees, A. S., Comeau, M. R., & Artis, D. (2013). TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Science translational medicine*, 5(170), 170ra16.
- Kim, J., Ham, J., Kang, H. R., Bae, Y. S., Kim, T., & Kim, H. Y. (2023). JAK3 inhibitor suppresses multipotent ILC2s and attenuates steroid-resistant asthma. *Science advances*, 9(51), eadi3770.
- Kokubo, K., Onodera, A., Kiuchi, M., Tsuji, K., Hirahara, K., & Nakayama, T. (2022). Conventional and pathogenic Th2 cells in inflammation, tissue repair, and fibrosis. *Frontiers in immunology*, 13, 945063.
- Kotas, M. E., Patel, N. N., Cope, E. K., Gurrola, J. G., 2nd, Goldberg, A. N., Pletcher, S. D., Seibold, M. A., Moore, C. M., & Gordon, E. D. (2023). IL-13-associated epithelial remodeling correlates with clinical severity in nasal polyposis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 151(5), 1277–1285.
- Kucuksezer, U. C., Ozdemir, C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2018). Chronic rhinosinusitis: pathogenesis, therapy options, and more. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 19(16), 1805–1815.
- Laidlaw, T. M., Buchheit, K. M. (2020). Biologics in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 124(4), 326–332.

- Laidlaw, T. M., Mullol, J., Woessner, K. M., Amin, N., & Mannent, L. P. (2021). Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 9(3), 1133–1141.
- Lazuardi, L., Jenewein, B., Wolf, A. M., Pfister, G., Tzankov, A., & Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology*, 114(1), 37–43.
- Lal, D., Keim, P., Delisle, J., Barker, B., Rank, M. A., Chia, N., Schupp, J. M., Gillece, J. D., & Cope, E. K. (2017). Mapping and comparing bacterial microbiota in the sinonasal cavity of healthy, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis subjects. *International forum of allergy & rhinology*, 7(6), 561–569.
- Lal, D., Wright, B. L., Shim, K. P., Zarka, M. A., Lee, J. J., Chang, Y. H., Ochkur, S. I., Divekar, R., Doyle, A. D., Jacobsen, E. A., Kita, H., & Rank, M. A. (2019). Eosinophil peroxidase, GATA3, and T-bet as tissue biomarkers in chronic rhinosinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 143(6), 2284–2287.e6.
- Lam, K., Schleimer, R., & Kern, R. C. (2015). The Etiology and Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis: a Review of Current Hypotheses. *Current allergy and asthma reports*, 15(7), 41.
- Lan, F., Zhang, N., Gevaert, E., Zhang, L., & Bachert, C. (2016). Viruses and bacteria in Th2-biased allergic airway disease. *Allergy*, 71(10), 1381–1392.
- Lee, H., Ruane, D., Law, K., Ho, Y., Garg, A., Rahman, A., Esterházy, D., Cheong, C., Goljo, E., Sikora, A. G., Mucida, D., Chen, B. K., Govindraj, S., Breton, G., & Mehandru, S. (2015). Phenotype and function of nasal dendritic cells. *Mucosal immunology*, 8(5), 1083–1098.
- Lee, W., Chang, L., Huang, Z., Huang, J., Yang, L., Wang, Z., & Zhang, G. (2017). A Retrospective Analysis of  $\gamma\delta$  T Cell Expression in Chronic Rhinosinusitis and Its Association with Recurrence of Nasal Polyps. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*, 79(5), 251–263.
- Lee, Y. N., Alt, F. W., Reyes, J., Gleason, M., Zarrin, A. A., & Jung, D. (2009). Differential utilization of T cell receptor TCR alpha/TCR delta locus variable region gene segments is mediated by accessibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17487–17492.
- Li, X. H., Lu, M. Y., Li, Y. J., Liu, Z. H., Yin, Z. N., Liu, B., & Wu, Y. Z. (2021). Circulating PD1+V $\delta$ 1+ $\gamma\delta$  T Cell Predicts Fertility in Endometrial Polyp Patients of Reproductive-Age. *Frontiers in immunology*, 12, 639221.
- Li, X., Wang, Z., Chang, L., Chen, X., Yang, L., Lai, X., Li, S., Huang, J., Huang, Z., Wu, X., Bellanti, J. A., Zheng, S. G., & Zhang, G. (2019).  $\gamma\delta$ T cells contribute to type 2 inflammatory profiles in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clinical science (London, England : 1979)*, 133(22), 2301–2315.
- Li, Z., Yang, L., Wang, J., Shi, W., Pawar, R. A., Liu, Y., Xu, C., Cong, W., Hu, Q., Lu, T., Xia, F., Guo, W., Zhao, M., & Zhang, Y. (2010). beta-Actin is a useful internal



control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish & shellfish immunology*, 29(1), 89–93.

- Liu, M., Liu, J., Weitzel, E. K., & Chen, P. G. (2022). The predictive utility of the 22-item sino-nasal outcome test (SNOT-22): A scoping review. *International forum of allergy & rhinology*, 12(1), 83–102.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lv, J., Xiong, Y., Li, W., Cui, X., Cheng, X., Leng, Q., & He, R. (2018). IL-37 inhibits IL-4/IL-13-induced CCL11 production and lung eosinophilia in murine allergic asthma. *Allergy*, 73(8), 1642–1652.
- Malabarba, M. G., Rui, H., Deutsch, H. H., Chung, J., Kalthoff, F. S., Farrar, W. L., & Kirken, R. A. (1996). Interleukin-13 is a potent activator of JAK3 and STAT6 in cells expressing interleukin-2 receptor-gamma and interleukin-4 receptor-alpha. *The Biochemical journal*, 319 ( Pt 3)(Pt 3), 865–872.
- Malm L. (1997). Assessment and staging of nasal polyposis. *Acta oto-laryngologica*, 117(4), 465–467.
- Maniscalco, M., Calabrese, C., D'Amato, M., Guida, P., Molino, A., Aliani, M., De Tullio, R., Foschino Barbaro, M., Ricciardolo, F. L. M., & Carpagnano, G. E. (2019). Association between exhaled nitric oxide and nasal polyposis in severe asthma. *Respiratory medicine*, 152, 20–24.
- Maspero, J., Adir, Y., Al-Ahmad, M., Celis-Preciado, C. A., Colodenco, F. D., Giavina-Bianchi, P., Lababidi, H., Ledanois, O., Mahoub, B., Perng, D. W., Vazquez, J. C., & Yorgancioglu, A. (2022). Type 2 inflammation in asthma and other airway diseases. *ERJ open research*, 8(3), 00576-2021.
- Melandri, D., Zlatareva, I., Chaleil, R. A. G., Dart, R. J., Chancellor, A., Nussbaumer, O., Polyakova, O., Roberts, N. A., Wesch, D., Kabelitz, D., Irving, P. M., John, S., Mansour, S., Bates, P. A., Vantourout, P., & Hayday, A. C. (2018). The  $\gamma\delta$ TCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. *Nature immunology*, 19(12), 1352–1365.
- Meltzer, E. O., Hamilos, D. L., Hadley, J. A., Lanza, D. C., Marple, B. F., Nicklas, R. A., Bachert, C., Baraniuk, J., Baroody, F. M., Benninger, M. S., Brook, I., Chowdhury, B. A., Druce, H. M., Durham, S., Ferguson, B., Gwaltney, J. M., Kaliner, M., Kennedy, D. W., Lund, V., Naclerio, R., ... American Rhinologic Society (ARS) (2004). Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 114(6 Suppl), 155–212.
- Merleev, A. A., Marusina, A. I., Ma, C., Elder, J. T., Tsoi, L. C., Raychaudhuri, S. P., Weidinger, S., Wang, E. A., Adamopoulos, I. E., Luxardi, G., Gudjonsson, J. E., Shimoda, M., & Maverakis, E. (2018). Meta-analysis of RNA sequencing datasets

reveals an association between TRAJ23, psoriasis, and IL-17A. *JCI insight*, 3(13), e120682.

- Mihalj, H., Butković, J., Tokić, S., Štefanić, M., Kizivat, T., Bujak, M., Baus Lončar, M., & Mihalj, M. (2022). Expression of Oxidative Stress and Inflammation-Related Genes in Nasal Mucosa and Nasal Polyps from Patients with Chronic Rhinosinusitis. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5521.
- Mjösberg, J., Bernink, J., Golebski, K., Karrich, J. J., Peters, C. P., Blom, B., te Velde, A. A., Fokkens, W. J., van Drunen, C. M., & Spits, H. (2012). The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity*, 37(4), 649–659.
- Morgan, A. J., Symon, F. A., Berry, M. A., Pavord, I. D., Corrigan, C. J., & Wardlaw, A. J. (2005). IL-4-expressing bronchoalveolar T cells from asthmatic and healthy subjects preferentially express CCR 3 and CCR 4. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(3), 594–600.
- Morita, C. T., Jin, C., Sarikonda, G., & Wang, H. (2007). Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunological reviews*, 215, 59–76.
- Moro-García, M. A., Alonso-Arias, R., & López-Larrea, C. (2013). When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Frontiers in immunology*, 4, 107.
- Mozzanica, F., Preti, A., Gera, R., Gallo, S., Bulgheroni, C., Bandi, F., Ottaviani, F., & Castelnuovo, P. (2017). Cross-cultural adaptation and validation of the SNOT-22 into Italian. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 274(2), 887–895.
- Mullol, J., Azar, A., Buchheit, K. M., Hopkins, C., & Bernstein, J. A. (2022). Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: Quality of Life in the Biologics Era. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 10(6), 1434–1453.
- Mutoh, M., Kimura, S., Takahashi-Iwanaga, H., Hisamoto, M., Iwanaga, T., & Iida, J. (2016). RANKL regulates differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell and tissue research*, 364(1), 175–184.
- Nakayama, T., Okada, N., Yoshikawa, M., Asaka, D., Kuboki, A., Kojima, H., Tanaka, Y., & Haruna, S. I. (2018). Assessment of suitable reference genes for RT-qPCR studies in chronic rhinosinusitis. *Scientific reports*, 8(1), 1568.
- Newton, J. R., & Ah-See, K. W. (2008). A review of nasal polyposis. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(2), 507–512.

- Nielsen, M. M., Witherden, D. A., & Havran, W. L. (2017).  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nature reviews. Immunology*, 17(12), 733–745.
- Nurkic, J., Ahmad, M. A., Arifhodzic, N., & Jusufovic, E. (2016). The role of target organ diagnostic approach in seasonal allergic rhinitis: nasal smear eosinophils. *Materia socio-medica*, 28(2), 125–128.
- Okushi, T., Nakayama, T., Morimoto, S., Arai, C., Omura, K., Asaka, D., Matsuwaki, Y., Yoshikawa, M., Moriyama, H., & Otori, N. (2013). A modified Lund-Mackay system for radiological evaluation of chronic rhinosinusitis. *Auris, nasus, larynx*, 40(6), 548–553.
- Olze, H., Förster, U., Zuberbier, T., Morawietz, L., & Luger, E. O. (2006). Eosinophilic nasal polyps are a rich source of eotaxin, eotaxin-2 and eotaxin-3. *Rhinology*, 44(2), 145–150.
- Orlandi, R. R., Kingdom, T. T., Hwang, P. H., Smith, T. L., Alt, J. A., Baroody, F. M., Batra, P. S., Bernal-Sprekelsen, M., Bhattacharyya, N., Chandra, R. K., Chiu, A., Citardi, M. J., Cohen, N. A., DelGaudio, J., Desrosiers, M., Dhong, H. J., Douglas, R., Ferguson, B., Fokkens, W. J., Georgalas, C., ... Kennedy, D. W. (2016). International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *International forum of allergy & rhinology*, 6 Suppl 1, S22–S209.
- Ota, Y., Ikemiyagi, Y., Sato, T., Funakoshi, T., Hiruta, N., Kitamura, M., Bujo, H., & Suzuki, M. (2016). Measuring local immunoglobulin E in the inferior turbinate nasal mucosa in patients with allergic rhinitis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 65(4), 396–399.
- Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., & Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*, 9(5), 745–755.
- Paik, Y., Dahl, M., Fang, D., & Calhoun, K. (2008). Update: the role of FoxP3 in allergic disease. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16(3), 275–279.
- Pang, D. J., Neves, J. F., Sumaria, N., & Pennington, D. J. (2012). Understanding the complexity of  $\gamma\delta$  T-cell subsets in mouse and human. *Immunology*, 136(3), 283–290.
- Pawankar, R., Nonaka, M. (2007). Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Current allergy and asthma reports*, 7(3), 202–208.
- Pawankar, R. U., Okuda, M., Suzuki, K., Okumura, K., & Ra, C. (1996). Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal gamma delta T cells in allergic and infectious rhinitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153(5), 1655–1665.
- Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.

- Pinto J. M. (2011). Olfaction. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(1), 46–52.
- Plužarić, V., Štefanić, M., Mihalj, M., Tolušić Levak, M., Muršić, I., Glavaš-Obrovac, L., Petrek, M., Balogh, P., & Tokić, S. (2020). Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and  $\gamma\delta$  T Cells in Human Psoriasis Vulgaris. *Frontiers in immunology*, 11, 572924.
- Qu, G., Wang, S., Zhou, Z., Jiang, D., Liao, A., & Luo, J. (2022). Comparing Mouse and Human Tissue-Resident  $\gamma\delta$  T Cells. *Frontiers in immunology*, 13, 891687.
- Raciborski, F., Arcimowicz, M., Samoliński, B., Pinkas, W., Samel-Kowalik, P., & Śliwczyński, A. (2021). Recorded prevalence of nasal polyps increases with age. *Postepy dermatologii i alergologii*, 38(4), 682–688.
- Ramakrishnan, V. R., Feazel, L. M., Gitomer, S. A., Ir, D., Robertson, C. E., & Frank, D. N. (2013). The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PloS one*, 8(12), e85507.
- Richter, A., Puddicombe, S. M., Lordan, J. L., Bucchieri, F., Wilson, S. J., Djukanovic, R., Dent, G., Holgate, S. T., & Davies, D. E. (2001). The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(3), 385–391.
- Roan, F., Obata-Ninomiya, K., & Ziegler, S. F. (2019). Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *The Journal of clinical investigation*, 129(4), 1441–1451.
- Rotter N. (2016). Evidence and evidence gaps in therapies of nasal obstruction and rhinosinusitis. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*, 15, Doc06.
- Rutishauser, T., Lepore, M., Di Blasi, D., Dangy, J. P., Abdulla, S., Jongo, S., Ramadhani, K., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Tanner, M., Daubenberger, C., & De Libero, G. (2020). Activation of TCR V $\delta$ 1+ and V $\delta$ 1-V $\delta$ 2-  $\gamma\delta$  T Cells upon Controlled Infection with *Plasmodium falciparum* in Tanzanian Volunteers. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 204(1), 180–191.
- Rutledge, R. G., & Côté, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic acids research*, 31(16), e93.
- Ryu, G., & Kim, D. W. (2020). Th2 inflammatory responses in the development of nasal polyps and chronic rhinosinusitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 20(1), 1–8.
- Saito, H., Honda, K., Asaka, C., Ueki, S., & Ishikawa, K. (2016). Eosinophil chemotaxis assay in nasal polyps by using a novel optical device EZ-TAXIScan: Role of CC-chemokine receptor 3. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 65(3), 280–285.

- Salam, N., Rane, S., Das, R., Faulkner, M., Gund, R., Kandpal, U., Lewis, V., Mattoo, H., Prabhu, S., Ranganathan, V., Durdik, J., George, A., Rath, S., & Bal, V. (2013). T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *The Indian journal of medical research*, 138(5), 595–608.
- Sanchez Sanchez, G., Papadopoulou, M., Azouz, A., Tafesse, Y., Mishra, A., Chan, J. K. Y., Fan, Y., Verdebout, I., Porco, S., Libert, F., Ginhoux, F., Vandekerckhove, B., Goriely, S., & Vermijlen, D. (2022). Identification of distinct functional thymic programming of fetal and pediatric human  $\gamma\delta$  thymocytes via single-cell analysis. *Nature communications*, 13(1), 5842.
- Satyanarayana, K., Hata, S., Devlin, P., Roncarolo, M. G., De Vries, J. E., Spits, H., Strominger, J. L., & Krangel, M. S. (1988). Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor alpha/delta locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21), 8166–8170.
- Savage, A. K., Constantinides, M. G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., & Bendelac, A. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*, 29(3), 391–403.
- Schalek, P., Hart, L., Fuksa, J., & Guha, A. (2022). Quality of life in CRSwNP: evaluation of ACCESS and Lund-Mackay computed tomography scores versus the QoL questionnaire. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 279(12), 5721–5725.
- Schleimer R. P. (2017). Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Annual review of pathology*, 12, 331–357.
- Sedaghat A. R. (2017). Chronic Rhinosinusitis. *American family physician*, 96(8), 500–506.
- Seki, N., Miyazaki, M., Suzuki, W., Hayashi, K., Arima, K., Myburgh, E., Izuhara, K., Brombacher, F., & Kubo, M. (2004). IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(10), 6158–6166.
- Settupane G. A. (1996). Nasal polyps and immunoglobulin E (IgE). *Allergy and asthma proceedings*, 17(5), 269–273.
- Sharma, A., Berga-Bolanos, R., Sultana, D. A., & Sen, J. M. (2013). IL-4 and IL-4 receptor expression is dispensable for the development and function of natural killer T cells. *PloS one*, 8(8), e71872.
- Shin, S. H., Ye, M. K., Park, J., & Geum, S. Y. (2022). Immunopathologic Role of Eosinophils in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13313.

- Shkorbotun Y. (2020). Evaluation of the ukrainian version of snort-22 questionnaire validity for assessing the quality of life in patients with chronic rhinosinusitis and nasal septum deviation. *Georgian medical news*, (308), 43–47.
- Sikkema, L., Ramírez-Suástegui, C., Strobl, D. C., Gillett, T. E., Zappia, L., Madissoon, E., Markov, N. S., Zaragosi, L. E., Ji, Y., Ansari, M., Arguel, M. J., Apperloo, L., Banchemo, M., Bécavin, C., Berg, M., Chichelnitskiy, E., Chung, M. I., Collin, A., Gay, A. C. A., Gote-Schniering, J., ... Theis, F. J. (2023). An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nature medicine*, 29(6), 1563–1577.
- Sinha, S., Kaler, L. J., Proctor, T. M., Teuscher, C., Vandenbark, A. A., & Offner, H. (2008). IL-13-mediated gender difference in susceptibility to autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(4), 2679–2685.
- Sitkauskiene, B., Johansson, A. K., Sergejeva, S., Lundin, S., Sjöstrand, M., & Lötvall, J. (2004). Regulation of bone marrow and airway CD34+ eosinophils by interleukin-5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(3), 367–378.
- Sogut, A., Yilmaz, O., Kirmaz, C., Ozbilgin, K., Onur, E., Celik, O., Pinar, E., Vatansever, S., Dinc, G., & Yuksel, H. (2012). Regulatory-T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity. *International archives of allergy and immunology*, 157(4), 349–353.
- Soklic, T. K., Rijavec, M., Silar, M., Koren, A., Kern, I., Hocevar-Boltezar, I., & Korosec, P. (2019). Transcription factors gene expression in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Radiology and oncology*, 53(3), 323–330.
- Soler, Z. M., Jones, R., Le, P., Rudmik, L., Mattos, J. L., Nguyen, S. A., & Schlosser, R. J. (2018). Sino-Nasal outcome test-22 outcomes after sinus surgery: A systematic review and meta-analysis. *The Laryngoscope*, 128(3), 581–592.
- Speir, M. L., Bhaduri, A., Markov, N. S., Moreno, P., Nowakowski, T. J., Papatheodorou, I., Pollen, A. A., Raney, B. J., Seninge, L., Kent, W. J., & Haeussler, M. (2021). UCSC Cell Browser: visualize your single-cell data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(23), 4578–4580.
- Steelant, B., Seys, S. F., Van Gerven, L., Van Woensel, M., Farré, R., Wawrzyniak, P., Kortekaas Krohn, I., Bullens, D. M., Talavera, K., Raap, U., Boon, L., Akdis, C. A., Boeckxstaens, G., Ceuppens, J. L., & Hellings, P. W. (2018). Histamine and T helper cytokine-driven epithelial barrier dysfunction in allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141(3), 951–963.
- Steinke, J. W., Crouse, C. D., Bradley, D., Hise, K., Lynch, K., Kountakis, S. E., & Borish, L. (2004). Characterization of interleukin-4-stimulated nasal polyp fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(2), 212–219.
- Sun, C., Ouyang, H., & Luo, R. (2017). Distinct characteristics of nasal polyps with and without eosinophilia. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 83(1), 66–72.

- Takabayashi, T., & Schleimer, R. P. (2020). Formation of nasal polyps: The roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 145(3), 740–750.
- Tantilipikorn, P., Sookrung, N., Muangsomboon, S., Lumyongsatien, J., Bedavanija, A., & Suwanwech, T. (2018). Endotyping of Chronic Rhinosinusitis With and Without Polyp Using Transcription Factor Analysis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 82.
- Tauber, M., Basso, L., Martin, J., Bostan, L., Pinto, M. M., Thierry, G. R., Houmadi, R., Serhan, N., Loste, A., Blériot, C., Kamphuis, J. B. J., Grujic, M., Kjellén, L., Pejler, G., Paul, C., Dong, X., Galli, S. J., Reber, L. L., Ginhoux, F., Bajenoff, M., ... Gaudenzio, N. (2023). Landscape of mast cell populations across organs in mice and humans. *The Journal of experimental medicine*, 220(10), e20230570.
- Tindemans, I., Serafini, N., Di Santo, J. P., & Hendriks, R. W. (2014). GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity*, 41(2), 191–206.
- Tsurumoto, H., Takamura, H., Takasaki, K., Yoshimi, R., & Kobayashi, T. (1997). *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho*, 100(5), 512–517.
- Usha, G., Pal, I., Kumar, S., Mondal, B., & Basu, G. (2022). Assessment of Nasal Smear Eosinophil Counts in Allergic Rhinitis: How Useful is it?. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India*, 74(4), 540–546.
- Vaessen, L. M., Schipper, F., Knoop, C., Claas, F. H., & Weimar, W. (1996). Inverted V delta 1/V delta 2 ratio within the T cell receptor (TCR)-gamma delta T cell population in peripheral blood of heart transplant recipients. *Clinical and experimental immunology*, 103(1), 119–124.
- Van Bruaene, N., Derycke, L., Perez-Novo, C. A., Gevaert, P., Holtappels, G., De Ruyck, N., Cuvelier, C., Van Cauwenberge, P., & Bachert, C. (2009). TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(2), 253–259.
- Van Bruaene, N., Pérez-Novo, C. A., Basinski, T. M., Van Zele, T., Holtappels, G., De Ruyck, N., Schmidt-Weber, C., Akdis, C., Van Cauwenberge, P., Bachert, C., & Gevaert, P. (2008). T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 121(6), 1435–1441.
- Vanderhaegen, T., Gengler, I., Dendooven, A., Chenivresse, C., Lefèvre, G., & Mortuaire, G. (2022). Eosinophils in the Field of Nasal Polyposis: Towards a Better Understanding of Biologic Therapies. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 62(1), 90–102.
- Verhoef, P. A., Constantinides, M. G., McDonald, B. D., Urban, J. F., Jr, Sperling, A. I., & Bendelac, A. (2016). Intrinsic functional defects of type 2 innate lymphoid cells impair innate allergic inflammation in promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF)-deficient mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(2), 591–600.

- Vogt, S., & Mattner, J. (2021). NKT Cells Contribute to the Control of Microbial Infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 718350.
- Wang, M., Tang, S., Yang, X., Xie, X., Luo, Y., He, S., Li, X., & Feng, X. (2022). Identification of key genes and pathways in chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma comorbidity using bioinformatics approaches. *Frontiers in immunology*, 13, 941547.
- Wang, X., Xu, C., Ji, J., Cai, Y., Shu, Y., Chao, Y., Wu, X., Zou, C., Wu, X., & Tang, L. (2020). IL-4/IL-13 upregulates Sonic hedgehog expression to induce allergic airway epithelial remodeling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 318(5), L888–L899.
- Watelet, J. B., Bachert, C., Claeys, C., & Van Cauwenberge, P. (2004). Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. *Allergy*, 59(1), 54–60.
- Wei, P., Hu, G. H., Kang, H. Y., Yao, H. B., Kou, W., Zhang, C., & Hong, S. L. (2014). Role of the aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Inflammation*, 37(2), 387–395.
- Whyte, A., & Boeddinghaus, R. (2019). The maxillary sinus: physiology, development and imaging anatomy. *Dento maxillo facial radiology*, 48(8), 20190205.
- Wrobel, P., Shojaei, H., Schitteck, B., Gieseler, F., Wollenberg, B., Kalthoff, H., Kabelitz, D., & Wesch, D. (2007). Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 320–328.
- Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., Chen, Z., Wang, K., Zhang, T., Xu, J., Han, Y., Zhang, T., Wu, X., Wang, J., Gong, W., Zheng, S., ... Huang, J. (2014).  $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, 40(5), 785–800.
- Wynn T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annual review of immunology*, 21, 425–456.
- Yang, Y., Li, L., Yuan, L., Zhou, X., Duan, J., Xiao, H., Cai, N., Han, S., Ma, X., Liu, W., Chen, C. C., Wang, L., Li, X., Chen, J., Kang, N., Chen, J., Shen, Z., Malwal, S. R., Liu, W., Shi, Y., Zhang, Y. (2019). A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Activation. *Immunity*, 50(4), 1043–1053.
- Yu, J., Yan, B., Shen, S., Wang, Y., Li, Y., Cao, F., Xiong, W., Piao, Y., Hu, C., Sun, Y., Zhang, L., & Wang, C. (2023). IgE directly affects eosinophil migration in chronic rhinosinusitis with nasal polyps through CCR3 and predicts the efficacy of omalizumab. *The Journal of allergy and clinical immunology*, S0091-6749(23)01385-4.



- Yu, S. E., Chiang, S., Olonisakin, T. F., Moore, J. A., Bergmark, R. W., Maxfield, A. Z., Roditi, R. E., Buchheit, K. M., Lundberg, M., Mitchell, M. B., & Lee, S. E. (2024). Local cytokine levels associate with SNOT-22 and UPSIT scores in chronic rhinosinusitis. *International forum of allergy & rhinology*, 14(1), 114–118.
- Zarobkiewicz, M. K., Wawryk-Gawda, E., Kowalska, W., Janiszewska, M., & Bojarska-Junak, A. (2021).  $\gamma\delta$  T Lymphocytes in Asthma: a Complicated Picture. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 69(1), 4.
- Zhao, Y., Niu, C., & Cui, J. (2018). Gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells: friend or foe in cancer development?. *Journal of translational medicine*, 16(1), 3.
- Zheng, R., & Yang, Q. (2014). The role of the  $\gamma\delta$  T cell in allergic diseases. *Journal of immunology research*, 2014, 963484.
- Zhou, Y., Mihindikulasuriya, K. A., Gao, H., La Rosa, P. S., Wylie, K. M., Martin, J. C., Kota, K., Shannon, W. D., Mitreva, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2014). Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome biology*, 15(5), R66.

#### Web izvori:

1. Gene Expression Omnibus (GEO): Single cell RNA-seq reveals high heterogeneity among human  $\gamma\delta$  T cells. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE149356>. (15.01.2024.)
2. Single Cell Portal: Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. [https://singlecell.broadinstitute.org/single\\_cell/study/SCP253/allergic-inflammatory-memory-in-human-respiratory-epithelial-progenitor-cells](https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP253/allergic-inflammatory-memory-in-human-respiratory-epithelial-progenitor-cells). (25.01.2024.)

## 8. SAŽETAK

---

**Ciljevi istraživanja:** Radi boljeg razumijevanja etiopatogeneze bolesti i utvrđivanja potencijalnih točaka za razvoj pametnih lijekova, koji su danas trend u liječenju brojnih imunološki posredovanih upalnih bolesti, a time i eozinofilnog kroničnog rinosinitisa s nosnom polipozom (eKRSsNP) istraživane su moguće stanične ( $\gamma\delta$  T-limfocita i njihovih subpopulacija (V $\delta$ 1 + V $\delta$ 2 - , V $\delta$ 1 - V $\delta$ 2 + , V $\delta$ 1 - V $\delta$ 2 - ) i molekularne (mRNA V $\delta$ 1, V $\delta$ 2, V $\delta$ 3, IL-4, IL-13, GATA3, MMP7 i CCR3) osnove eKRSsNP. Potencijalni stanični i molekularni elementi ove bolesti testirani su na sinonazalnoj sluznici (sluznici nosnog polipa i srednje nosne školjke (SNŠ)) oboljelih te uspoređivani s uzorkom SNŠ kontrola. Izražaji spomenutih gena i opisane stanične populacije uspoređivane su i s kliničkim pokazateljima težine bolesti. **Dizajn studije:** Opažajno istraživanje parova. **Materijali i metode:** U istraživanju je sudjelovalo 84 bolesnika, od čega 43 bolesnika s dijagnozom eozinofilnog kroničnog rinosinitisa s nosnom polipozom (eKRSsNP) i 41 kontrola. Svim bolesnicima učinjen je klinički pregled i potrebna radiološka obrada (bolesnicima s eKRSsNP CT PNS), laboratorijska obrada (alergijska obrada, hsCRP) bris nosa na eozinofile te su ispunili upitnik SNOT22. Uzorci polipa i SNŠ u bolesnika s eKRSsNP i SNŠ u kontrolnih ispitanika pripremljeni su za imunofenotipizaciju  $\gamma\delta$  T-limfocita na protočnom citometru te za kvantitativnu analizu traskriptoma pomoću RT-qPCR. **Rezultati:** Subpopulacija V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- ( $p = 0,001$ ; GLMM)  $\gamma\delta$  T-limfocita bila je značajno više zastupljena u sluznici polipa i SNŠ oboljelih od eKRSsNP u odnosu na sluznicu SNŠ kontrolnih ispitanika. Ista subpopulacija značajno pozitivno korelira s vrijednostima Lund-Mackey (LM) klasifikacije (SNŠ,  $p = 0,043$ ; polip,  $p = 0,034$ ; GLMM) i udjelu eozinofila u obrisku nosa (SNŠ,  $p = 0,002$ ; polip,  $p = 0,014$ ; GLMM) . S druge strane, subpopulacija V $\delta$ 1+V $\delta$ 2-  $\gamma\delta$  T-limfocita značajno je manje zastupljena u sluznici polipa i SNŠ oboljelih od eKRSsNP ( $p = 0,005$ ; GLMM) u odnosu na sluznicu SNŠ kontrolnih ispitanika. Genski izražaj IL-13 ( $p = 0,013$ ; GLMM) i CCR3 ( $p = 0,007$ ; GLMM) bio je značajno veći u sinonazalnoj sluznici oboljelih od eKRSsNP u odnosu na sluznicu kontrola. **Zaključak:** S obzirom na snažnu zastupljenost V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- subpopulacije  $\gamma\delta$  T-limfocita u sluznici bolesnika s eKRSsNP te povezanost s LM i udjelom eozinofila u obrisku nosa, značajna je uloga ove subpopulacije u nastanku eKRSsNP i upali tipa 2. S druge strane, V $\delta$ 1+V $\delta$ 2- subpopulacija moguće ima zaštitnu ulogu u sprječavanju nastanka upale tipa 2 i eKRSsNP, zbog značajno manje zastupljenosti u sinonazalnoj sluznici oboljelih od eKRSsNP i značajne negativne korelacije s LM sustavom i udjelom eozinofila u obrisku nosa.

Pojačani genski izražaj CCR3 i IL-13 u sinonazalnoj sluznici oboljelih od eKRSsNP potvrđuje njihov važan doprinos Th2 upali u ovoj bolesti.

Ključne riječi: kronični rinosinuitis, nosni polip, Th2 upala,  $\gamma\delta$ T-limfociti

## 9. SUMMARY

---

**Goals of the study:** In order to better understand the etiopathogenesis of the disease and to determine potential points for the development of smart drugs, which are currently in the trend to treat numerous immune-mediated inflammatory diseases, and thus eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (eCRSwNP), possible cellular ( $\gamma\delta$  T lymphocytes and their subpopulations ( V $\delta$ 1 + V $\delta$ 2 - , V $\delta$ 1 - V $\delta$ 2 + , V $\delta$ 1 - V $\delta$ 2 - ) and molecular (mRNA V $\delta$ 1, V $\delta$ 2, V $\delta$ 3, IL-4, IL-13, GATA3, MMP7 and CCR3) basis of eCRSwNP. Potential cellular and molecular elements of this disease were tested on sinonasal mucosa (polyp tissue and the middle nasal turbinate (MNT)) of patients and compared with the sample of the MNT of the controls. The expressions of the mentioned genes and the described cell population were also compared with the clinical indicators of the severity of the disease. **Study design:** Observational study of couples. **Materials and methods:** 84 patients participated in the study, of which 43 subjects were diagnosed with eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (eCRSwNP) and 41 were controls. All subjects underwent a clinical examination and CT scan of paranasal sinuses (for CRSwNP group), laboratory treatment (allergy tests, hsCRP), nasal swab for eosinophils and filled out the SNOT22 questionnaire. Samples of polyps and MNT in patients with eCRSwNP and MNT in control subjects were prepared for immunophenotyping of  $\gamma\delta$  T-lymphocytes on a flow cytometer and for quantitative analysis of the transcriptome using RT-qPCR. **Results:** Subpopulation V $\delta$ 1-V $\delta$ 2- ( $p = 0,001$ ; GLMM) of  $\gamma\delta$  T-lymphocytes was significantly more prevalent in the sinonasal mucosa in the group of subjects with eCRSwNP compared to control group. The same subpopulation significantly and positively correlates with the values of the Lund-Mackey (LM) classification (MNT,  $p = 0,043$ ; polyp,  $p = 0,034$ ; GLMM) and the percentage of eosinophils in the nasal swab (MNT,  $p = 0,002$ ; polyp,  $p = 0,014$ ; GLMM). On the other hand, the subpopulation V $\delta$ 1+V $\delta$ 2-  $\gamma\delta$  T-lymphocytes is significantly less represented in the sinonasal mucosa of patients with eCRSwNP ( $p = 0,005$ ; GLMM) compared to the sinonasal mucosa of control subjects. Gene expression of IL-13 ( $p = 0,013$ ; GLMM) and CCR3 ( $p = 0,007$ ; GLMM) was significantly higher in the sinonasal mucosa of patients with eCRSwNP compared to the mucosa of controls. **Conclusion:** Considering the strong representation of the V $\delta$ 1-V $\delta$ 2 subpopulation of  $\gamma\delta$  T-lymphocytes in the mucosa of patients with eCRSwNP and the association with LM and the percentage of eosinophils in nasal swabs, the role of this subpopulation in the development of eCRSwNP and type 2 inflammation

is significant. On the other hand, V $\delta$ 1+V $\delta$ 2-subpopulation possibly has a protective role in preventing type 2 inflammation and eCRSwNP, due to significantly less representation in the sinonasal mucosa of patients with eCRSwNP and a significant negative correlation with the LM system and the percentage of eosinophils in the nasal swab. Enhanced gene expression of CCR3 and IL-13 in the sinonasal mucosa of patients with eCRSwNP confirms their important contribution to Th2 inflammation in this disease.

Key words: chronic rhinosinusitis, nasal polyp, Th2 inflammation,  $\gamma\delta$ T lymphocytes

## 10. ŽIVOTOPIS

---

Stjepan Grga Milanković rođen je 31.03.1993. u Osijeku. Trenutno živi u Vukovaru sa suprugom i sinom.

Osnovnu školu završio je u Vukovaru 2007. godine. Iste godine upisuje Opću Gimnaziju u Vukovaru, koju završava 2011.godine. Titulu doktora medicine stječe diplomiranjem 2017.godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Pripravnički staž obavio je u Općoj županijskoj bolnici Vukovar (danas Nacionalna memorijalna bolnica „dr. Juraj Njavro“) od 2017.-2018. godine. Stručni ispit položio je 2018. godine te se potom zaposlio na Zavodu za hitnu medicinu Vukovarsko- srijemske županije. Iste godine započinje specijalizaciju u Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC-a Osijek.

2020.godine upisuje poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij „Molekularne bioznanosti“ koji se provodi u suradnji Sveučilišta J. J. Strossmayera, Instituta Ruđera Boškovića u Zagrebu i Sveučilišta u Dubrovniku. 2022. godine obranio je temu doktorata: „Doprinos gama delta ( $\gamma\delta$ ) T-limfocita u razvoju tipa 2 upale u sinonazalnoj sluznici oboljelih od kroničnog alergijskog rinosinuitisa s nosnom polipozom“, pod mentorstvom doc.dr.sc. Hrvoja Mihalja, dr.med. i izv.prof.dr.sc. Stane Tokić, mag.mol.biol.

Od 2022. godine izabran je na mjesto naslovnog asistenta na Katedri za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta Otorinolaringologija, koji se provodi na diplomskom studiju medicine.

Također, od 2018. godine Stjepan Grga Milanković član je Hrvatske liječničke komore, a 2019. godine postaje aktivan član Hrvatskog liječničkog zbora i Kluba laringektomiranih Osijek.

Tijekom specijalizacije pohađa brojne domaće i međunarodne tečajeve:

- Tečaj „Novi šivaći materijali, transplantati i lokalni režnjevi;, Zagreb, 2019.
- Tečaj „ Functional endoscopic endonasal surgery 2019“, Slovenija, Maribor, 2019.
- Tečaj „Obstructive sleep apnea“, Zagreb, 2019.

Tečaj iz sinusne kirurgije FESS: Hands-on tečaj na animalnom modelu, CIRAS lamb's

head dissection, Zagreb, 2020.

- Tečaj iz rinokirurgije: Graz Course on Rhinosurgery, Graz, Austrija, 2021.
- Tečaj iz ugradnje govornih proteza: "Global Postlaryngectomy Rehabilitation Academy"; Nizozemska, Amsterdam, 2021.
- Tečaj odizanja slobodnih režnjeva – "International Course for Stepwise Flap Raising" Aachen, Njemačka, 2023.
- Tečaj iz mikrokirurgije: "Training course in basic microsurgical techniques" u Frankfurtu, Njemačka, 2023.

Kao aktivni sudionik sudjelovao je na sljedećim kongresima:

- Aktivno sudjelovanje na 11.kongresu Hrvatskog društva za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, Mali Lošinj, 2019.
- Aktivno sudjelovanje na 6. hrvatskom rinološkom kongresu, Zagreb, 2020.
- Aktivno sudjelovanje na 12.kongresu Hrvatskog društva za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, Split, 2021.
- Aktivno sudjelovanje na Europskom rinološkom kongresu u Thessalonikiju, Grčka, 2021.
- Aktivno sudjelovanje na Europskom rinološkom kongresu u Sofiji, Bugarska, 2023.

Popis objavljenih publikacija:

1. Zubčić, Ž. Mendeš, T. Včeva, A. Mihalj, H. Bogović, V. Milanković, SG. Presence of pepsin in laryngeal tissue and saliva in benign and malignant neoplasms. Biosci Rep. 2020 Nov 27;40(11).
2. Bogović, V. Milanković, SG. Zubčić, Ž. Včeva, A. Mihalj, M. Maleš, J. Kotromanović, Ž. Grebenar, M. Mendeš, T. Mihalj, H. Open Approach in Rhinoplasty. Southeastern European Medical Journal. 2019; 3(2); 56-62.
3. Mihalj, H. Včeva, A. Zubčić, Ž. Šestak, A. Bogović, V. Milanković, SG. Prpić, T. Abičić, I. Rezo, M. The effectiveness of diode laser in reduction of inferior turbinate. Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. 2020. 17-24. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/244558>
4. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Včeva, A. Kotromanović, Ž. Rotim, T. Zrno, N. Šestak, A. Bogović, V. Milanković, SG. Prpić, T. Abičić, I. Rezo, M. Duboke infekcije vrata. Medica Jadertina. 2020;50 (3):219-225.

5. Včeva, A. Đanić, D. Đanić Hadžibegović, A. Šimunjak, B. Filipović, B. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Mendeš, T. Kotromanović, Ž. Vranješ, Ž. Maleš, J. Roje, Ž. Jurić, S. Šestak, A. Bogović, V. Milanković, SG. Prpić, T. Abičić, I. Rezo, M. Smjernice za opstruktivnu apneju u spavanju. *Medica Jadertina*. 2020;50 (3):249-256.
6. Mihalj, H. Včeva, A. Kopic, V. Zubčić, V. Pavić, D. Milanković, SG. Šestak, A. Traumatska dislokacija maksilarnog mliječnog centralnog sjekutića u nosnu šupljinu. *Med. Jad.* 2019; (Supl):29. (sažetak)
7. Milanković, SG. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Včeva, A. Kotromanović, Ž. Bogović, V. Šestak, A. Mendeš, T. Papilarni karcinom štitnjače s metastazom vrata nakon uredno iznesene trudnoće. *Med. Jad.* 2019; (Supl):30. (sažetak)
8. Zubčić, Ž. Mihalj, H. Včeva, A. Kotromanović, Ž. Bogović, V. Milanković, SG. Utjecaj pepsina na nastanak tumora larinksa. *Med. Jad.* 2019; (Supl):39-40. (sažetak)
9. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Včeva, A. Maleš, J. Kotromanović, Ž. Bogović, V. Milanković, SG. Upotreba diodnog lasera na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC- a Osijek. *Med. Jad.* 2019; (Supl):29. (sažetak)
10. Maleš, J. Milanković, SG. Bogović, V. Šestak, A. Prpić, T. Abičić, I. Unilateralna endoskopska septoplastika. *Medica Jadertina*, 2020;50 (Supplement):26-26. (sažetak)
11. Maleš, J. Milanković, SG. Šestak, A. Bogović, V. Abičić, I. Prpić, T. Usporedba endoskopske i standardne septoplastike. *Medica Jadertina*, 2020;50 (Supplement):27- 27. (sažetak, poster)
12. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Včeva, A. Maleš, J. Mendeš, T. Bogović, V. Milanković, SG. Šestak, A. Efektivnost redukcije donjih nosnih školjki diodnim laserom. *Medica Jadertina*, 2020;50 (Supplement):30-30. (sažetak, poster)
13. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Včeva, A. Vranješ, Ž. Maleš, J. Birtić, D. Mendeš, T. Milanković, SG. Prpić, T. Bogović, V. Abičić, I. Rezo, M. Moguš, M. Šestak, A. Implementation of telemedicine in otorhinolaryngology. *Southeastern European Medical Journal*, 2021; 5(1).
14. Zubčić, Ž. Šestak, A. Mihalj, H. Kotromanović, Ž. Včeva, A. Prpić, T. Rezo, M. Milanković, SG. Bogović, V. Abičić, I. The association between type 2 diabetes mellitus, hypothyroidism, and thyroid cancer. *Acta Clin Croat (Suppl. 1)* 2020; 59:129-135.



15. Abičić, I. Prpić, T. Bogović, V. Milanković, SG. Mihalj, H. Včeva, A. Zubčić, Ž. Šestak, A. Rezo, M. Characteristics of malignant thyroid tumors: A retrospective study on 320 patients. *Acta Clin Croat (Suppl. 1)* 2020; 59:108-114
16. Milanković, SG. Mendeš, T. Obostrana koštana atrezija hoana: radi li se uistinu o urgentnoj kirurškoj potrebi ili...?. *Med Jad* 51 (2021) Suplement
17. Bogović, M., Rončević, R. i Milanković, S.G. (2021). Impact of Anaemia and Dysregulated Iron Metabolism on COVID-19 Clinical Outcome – Review Article. *Southeastern European Medical Journal*, 5 (2), 9-17.

Prilozi:

1. SNOT 22 UPITNIK

SNOT 22 upitnik

**SNOT 22 upitnik**

Ocijenite težinu nosnih simptoma u posljednja 2 tjedna, te zaokružite broj na skali 0-5 za svaki simptom, s obzirom na težinu tih simptoma u vašem slučaju.

	Nema problema	Vrlo blagi problem	Blagi problem	Srednje teški problem	Teški problem	Najveći mogući problem
Potreba za ispuhivanjem nosa	0	1	2	3	4	5
Kihanje	0	1	2	3	4	5
Sekrecija iz nosa	0	1	2	3	4	5
Kašalj	0	1	2	3	4	5
Slijevanje sekreta niz grlo	0	1	2	3	4	5
Gusti iscjedak iz nosa	0	1	2	3	4	5
Punoća u uhu	0	1	2	3	4	5
Vrtoglavica	0	1	2	3	4	5
Bol u uhu	0	1	2	3	4	5
Bol i pritisak u licu	0	1	2	3	4	5
Otežano uspjavanje	0	1	2	3	4	5
Buđenje noću	0	1	2	3	4	5
Izostanak kvalitetnog sna	0	1	2	3	4	5
Neispavanost	0	1	2	3	4	5
Umor	0	1	2	3	4	5
Smanjena produktivnost	0	1	2	3	4	5
Smanjena koncentracija	0	1	2	3	4	5
Frustriranost/iritabilnost	0	1	2	3	4	5
Tuga	0	1	2	3	4	5
Posramljenost	0	1	2	3	4	5
Slabiji njuh i okus	0	1	2	3	4	5
Začepljenost i punoća u nosu	0	1	2	3	4	5

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_