

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET

Tijana Vukadinović

Imunohistohemijske karakteristike
vaskularizacije i inflamatorne infiltracije
nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim
rinosinuzitisom

DOKTORSKA DISERTACIJA

Podgorica, 2024

UNIVERSITY OF MONTENEGRO
FACULTY OF MEDICINE

Tijana Vukadinović

Immunohistochemical characteristics of
vascularization and inflammatory infiltration
of the nasal mucosa in patients with
chronic rhinosinusitis

DOCTORAL DISSERTATION

Podgorica, 2024

PODACI O DOKTORANDU, MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Doktorand

Ime i prezime: Tijana Vukadinović

Datum rođenja: 26.12.1980. godine, Kragujevac, Srbija

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, 2009 godina

Mentor: Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Komentor: Prof. dr Biserka Vukomanović-Đurđević, vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

Komisija za ocjenu prijave doktorske disertacije:

Prof. dr Miroslav Radunović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Prof. dr Biserka Vukomanović-Đurđević, vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Doc. dr Elvir Zvrko, docent, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Prof. dr Aleksandar Perić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Miroslav Radunović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Prof. dr Biserka Vukomanović-Đurđević, vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Prof. dr Elvir Zvrko, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet

Prof. dr Aleksandar Perić, redovni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Datum odbrane : 09.12.2024. godine

INFORMATION ON THE DOCTORAL STUDENT, MENTOR AND MEMBERS OF THE COMMITTEE

Information on doctoral student

Name and surname: Tijana Vukadinović

Date and place of birth: 26.12.1980. Kragujevac, Serbia

Name of completed study program and year of graduation: Faculty of Medicine, University of Montenegro, 2009

Mentor: Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Comentor: Prof. dr Biserka Vukomanović-Đurđević, Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defense in Belgrade

Thesis and candidate assessment committee:

Prof. dr Miroslav Radunović, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Prof. dr Biserka Vukomanović-Đurđević, Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defense in Belgrade

Doc. dr Elvir Zvrko, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Prof. dr Aleksandar Perić, Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defense in Belgrade

Doctoral dissertation evaluation and defense committee:

Prof. dr Miroslav Radunović, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Prof. dr Biserka Vukomanović-Đurđević, Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defense in Belgrade

Prof. dr Elvir Zvrko, University of Montenegro, Faculty of Medicine

Prof. dr Aleksandar Perić, Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defense in Belgrade

Date of defense: 09.12.2024.

Izražavam neizmjernu zahvalnost svojim mentorima Prof. dr Aleksandru Periću, Prof. dr Aleksandri Vuksanović-Božarić i Prof. dr Biserki Vukomanović-Đurđević na smjernicama, strpljenju, podršci, uloženom trudu i pomoći u pripremi i izradi doktorske disertacije.

Disertaciju posvećujem svojoj porodici, roditeljima koji su podsticali i vjerovali u moj profesionalni put i moje izbore, sestri i bratu za stalnu motivaciju i inspiraciju, za njihovu neizmjernu podršku i razumijevanje.

Zahvalnost dugujem Ministarstvu prosvjete, nauke i inovacija Crne Gore na saradnji i finansijskom osnovu koji je uložen u moje akademsko usavršavanje i istraživanje, koje je osnova disertacije, u vidu stipendije na koju sam kao nosilac ponosna.

Dr Tijana Vukadinović

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

Naziv doktorskih studija: Doktorske akademske studije Univerziteta Crne Gore ,
Medicinski fakultet, Doktorski studijski program: Medicina

Naslov doktorske disertacije: Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i
inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom

Datum prijave doktorske teze: 10.05.2022.

Datum sjednice Senata Univerziteta Crne Gore na kojoj je prihvaćena teza:
28.10.2022.

Rezime/ Izvod iz teze

Uvod: Gusta inflamatorna ćelijska infiltracija i vaskularizacija nazalne sluzokože su histološke karakteristike hroničnog rinosinuzitisa (CRS). Remodelovanje tkiva uključuje hipertrofiju respiratornog epitela, zadebljanje bazalne membrane, izražen stromalni edem praćen fibrozom i gust inflamatorni infiltrat. Sinonazalna polipoza je hronična inflamatorna bolest sluzokože nosa i paranazalnih šupljina u kojoj dominira T2 imuni odgovor, koji dovodi do oštećenja nazalne i sinusne sluzokože posredovanog eozinofilima.

Ciljevi istraživanja:

1. Na osnovu rezultata patohistološke i imunohistohemijske analize uporediti i procijeniti stepen povezanosti intenziteta inflamatorne infiltracije epitela i subepitela i vaskularizacije subepitela, kod pacijenata sa različitim formama hroničnog rinosinuzitisa u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Procijeniti nivo korelacije imunohistohemijskih i kliničkih parametara koji ukazuju na stepen proširenosti hroničnog zapaljenja.

Metodologija: Istraživanje predstavlja prospektivnu studiju presjeka, kojom su obuhvaćena devedeset i četiri ispitanika, sprovedenu u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je sprovedeno je u Klinici za otorinolaringologiju i Institutu za patologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, u periodu od marta 2020 do oktobra

2022 godine. Protokol i metode studije su odobreni odlukom Etičkog komiteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu (IRB odobrenje br. 21/2022), kao i odlukom Komiteta za medicinsku etiku i bioetiku Medicinskog fakulteta Univerzita Crne Gore (odluka broj 381/2 od 04.03.2022. godine). Svi ispitanici koji su studijom obuhvaćeni su prethodno dali pisani informativni pristanak. Istraživanjem su obuhvaćeni pacijenti kod kojih je dijagnostikovano hronični rinosinuzitis u skladu sa Evropskim pozicionim dokumentom o rinosinuzitisu i nazalnim polipima (EPOS) 2020. Svi ispitanici su hirurški liječeni u Klinici za otorinolaringologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu u periodu trajanja studije. Studija je obuhvatila trideset i tri pacijenta koji su imali CRS sa nazalnom polipozom bez osetljivosti na aspirin (CRSwNP), dvadeset pacijenata sa nazalnom polipozom, koja je dio patološkog supstrata u okviru respiratorne bolesti izazvane aspirinom (AERD) i deset pacijenata koji su imali CRS bez polipoze (CRSsNP), a koji su indikovani za hirurško liječenje. Kontrolnu grupu činio je trideset i jedan ispitanik bez inflamacije sluznice nosa i paranazalnih šupljina, indikovano za hirurško liječenje pneumatizovane srednje nosne školjke. Svi pacijenti su bili klinički ocjenjeni prije operacije za nazalne simptome, kvalitet života i nalaz pregleda paranazalnih šupljina kompjuterizovanom tomografijom. Uzorci sinonazalnih polipa i nazalne sluzokože svih pacijenata i ispitanika uključenih u studiju su imunohistohemijski obojeni na marker infiltracije eozinofila BMK13 i markere angiogeneze CD31 i CD34.

Rezultati: Pacijenti sa AERD su imali najveći nivo imunoekspresije za BMK13. Najjači obrazac bojenja CD34 pronađen je u grupi sa AERD, a najviši nivo ekspresije za CD31 u CRSwNP grupi. Pronašli smo pozitivnu korelaciju između BMK13, narušenog kvaliteta života i radiološki procijenjenog stepena bolesti kod pacijenata sa CRSwNP. Osim kod pacijenata sa CRSsNP, nije pronađena korelacija između markera eozinofilije tkiva i markera vaskularne proliferacije. Sve tri grupe pacijenata sa CRS su pokazale značajnu statističku razliku u vrijednostima ispitivanih imunohistohemijskih markera: CD31 ($p < 0,05$); CD34 ($p < 0,01$); BMK13 ($p < 0,001$). Imunoreaktivnost za CD31 i CD34 nije bila u potpunosti odsutna ni kod jednog ispitanika. Odnos između imunohistohemijskih markera i rezultata kliničkih parametara pacijenata uključenih u ovu studiju pokazao je umjerenu pozitivnu korelaciju između BMK13 i SNOT-22 ($r_s = 0,46$) i između BMK13 i LMS ($r_s = 0,58$) u grupi CRSwNP. U grupi CRSsNP, granična statistička značajnost u

korelaciji je prikazana samo za CD31 i BMK13, koji su pokazali umerenu pozitivnu korelaciju ($r_s = 0,65$). Pokazano je da LMS korelira sa VAS i SNOT-22 u grupama pacijenata sa CRSwNP ($r_s = 0,53$; $r_s = 0,58$) i AERD ($r_s = 0,55$; $r_s = 0,6$). Kod kontrolnih subjekata smo pronašli pozitivnu korelaciju između SNOT-22 i VAS ($r_s = 0,77$) i između CD31 i CD34 ($r_s = 0,47$)

Zaključci: Pacijenti sa AERD fenotipom imaju najveći stepen stromalne eozinofilne infiltracije i endotelne proliferacije u poređenje sa drugim fenotipovima CRS. Marker infiltracije eozinofila BMK13 pokazuje značajniju korelaciju sa kliničkim parametrima CRS u poređenju sa markerima vaskularne proliferacije. Značaj ovog istraživanja je fokus na analizi korelacije gustine eozinofilnog inflamatornog infiltrata i intenziteta vaskularizacije strome u okviru hroničnog rinosinuzitisa. Marker angiogeneze CD31 i CD34 su značajno više ispoljeni u sluznici pacijenata sa AERD i CRSwNP u odnosu na pacijente sa CRSsNP i zdrave ispitanike. Posebno je ispitan AERD u morfološkom smislu, kao zaseban entitet među oboljelima od hroničnog rinosinuzitisa, iako nije dokazano postojanje korelacije između markera eozinofilne infiltracije i vaskularne proliferacije u lamini propriji kod pacijenata sa sinonazalnom polipozom.

Ključne reči: endotel; eozinofili; imunohistohemija; upala; nazalna polipoza; hronični sinuzitis; AERD.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: klinička anatomija, otorinolaringologija

UDK broj:

INFORMATION ON THE DOCTORAL DISSERTATION

Name of doctoral studies: Doctoral academic studies at the University of Montenegro, Faculty of Medicine, Doctoral study program: Medicine

Doctoral thesis title: Immunohistochemical characteristics of vascularization and inflammatory infiltration of the nasal mucosa in patients with chronic rhinosinusitis

Thesis application date: 10.05.2022.

Thesis acceptance date (UoM Senate Session): 28.10.2022.

Abstract/ Thesis Overview:

Introduction: Dense inflammatory cell infiltration and vascularization of the nasal service are the histological features of chronic rhinosinusitis (CRS). Tissue remodeling includes hypertrophy of the respiratory epithelium, thickening of the basement membrane, pronounced stromal edema followed by fibrosis and a dense inflammatory infiltrate. Sinonasal polyposis is a chronic inflammatory disease of the mucous membrane of the nose and paranasal cavities in which the T2 immune response predominates, leading to damage to the nasal and sinus services mediated by eosinophils.

Aims:

1. Based on the results of pathohistological and immunohistochemical analysis, compare and evaluate the degree of connection between the intensity of inflammatory infiltration of the epithelium and subepithelium (lamina propria) and vascularization of the subepithelium in patients with various forms of chronic rhinosinusitis compared to healthy subjects.
2. Assess the level of correlation of immunohistochemical and clinical parameters that indicate the extent of chronic inflammation.

Methods: The research is a prospective cross-sectional study, which included ninety-four patients, conducted in accordance with the Helsinki Declaration. The research was conducted at the Clinic for Otorhinolaryngology and the Institute of Pathology of the Military Medical Academy in Belgrade, in the period from March 2020 to October 2022. The study protocol and methods were approved by the decision of the Ethics Committee

of the Military Medical Academy in Belgrade (IRB approval no. 21/2022), as well as by the decision of the Committee for Medical Ethics and Bioethics of the Faculty of Medicine at the University of Montenegro (decision no. 381/2 of 03.04.2022). All subjects included in the study gave written informed consent beforehand. The research included patients who were diagnosed with chronic rhinosinusitis in accordance with the European Position Document on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS) 2020. All subjects were surgically treated at the Otorhinolaryngology Clinic of the Military Medical Academy in Belgrade during the study period. The study included 33 patients who had CRS with aspirin-unresponsive nasal polyposis (CRSwNP), 20 patients with nasal polyposis as part of aspirin-induced respiratory disease (AERD), and 10 patients who had CRS without polyposis (CRSsNP), indicated for surgical treatment. The control group consisted of 31 subjects without inflammation of the nasal mucosa and paranasal cavities indicated for surgical treatment of pneumatized middle nasal concha. All patients were clinically evaluated before surgery for nasal symptoms, quality of life, outcome and findings of paranasal cavity examination by computed tomography. Samples of sinonasal polyps and nasal mucosa of all patients and subjects included in the study were immunohistochemically stained for eosinophil infiltration marker BMK13 and angiogenesis markers CD31 and CD34.

Results: Patients with AERD had the highest level of immunoexpression for BMK13. The strongest CD34 staining pattern was found in the AERD group, the highest expression level for CD31 in the CRSvNP group. We found a positive correlation between BMK13, impaired quality of life and radiologically assessed degree of disease in patients with CRSvNP. Except for patients with CRSsNP, no correlation was found between markers of tissue eosinophilia and markers of vascular proliferation. All three groups of patients with CRS showed a significant statistical difference in the values of the examined immunohistochemical markers: CD31 ($p < 0.05$); CD34 ($p < 0.01$); BMK13 ($p < 0.001$). Immunoreactivity for CD31 and CD34 was not fully matched in any subject. The relationship between immunohistochemical markers and the results of clinical parameters of the patients included in this study showed a moderate positive correlation between BMK13 and SNOT-22 ($r_s = 0.46$) and between BMK13 and LMS ($r_s = 0.58$) in the CRSvNP group. In the CRSsNP group, borderline statistical significance in the

correlation was shown only for CD31 and BMK13, which showed a moderate positive correlation ($r_s = 0.65$). LMS was shown to correlate with VAS and SNOT-22 in CRSvNP ($r_s = 0.53$; $r_s = 0.58$) and AERD ($r_s = 0.55$; $r_s = 0.6$) patient groups. In control subjects, we found a positive correlation between SNOT-22 and VAS ($r_s = 0.77$) and between CD31 and CD34 ($r_s = 0.47$)

Conclusion: Patients with AERD phenotype have the highest degree of stromal eosinophilic infiltration and endothelial proliferation compared to other CRS phenotypes. The eosinophil infiltration marker BMK13 shows a significant correlation with the clinical parameters of CRS compared to markers of vascular proliferation. The significance of this research is the focus on the correlation analysis of the density of eosinophilic inflammatory infiltrate and the intensity of vascularization of the stroma in chronic rhinosinusitis. Angiogenesis markers CD31 and CD34 were significantly more expressed in the mucosa of patients with AERD and CRSwNP compared to patients with CRSsNP and healthy subjects. AERD was specifically examined in a morphological sense, as a separate entity among patients with chronic rhinosinusitis, although the existence of a correlation between markers of eosinophilic infiltration and vascular proliferation in the lamina propria in patients with sinonasal polyposis was not proven..

Keywords: endothelium; eosinophils; immunohistochemistry; inflammation; nasal polyposis; chronic sinusitis; AERD.

Scientific field: Medicine

The branch of scientific field: clinical anatomy, otorhinolaryngology

UDC number:

PREDGOVOR

Hronični rinosinuzitis (CRS) predstavlja samoobnavljajuću inflamaciju uzrokovanu disfunkcijom između agenasa životne sredine i imunog sistema domaćina. Patogenezu CRS uzrokuju patogeni i štetni agensi spoljašnje sredine, koji pokreću višestruke imunološke mehanizme i dovode do remodelovanja epitela. CRS je heterogena grupa oboljenja sluznice nosa i paranazalnih šupljina i može se podijeliti na CRS sa nazalnim polipima (CRSwNP) i hronični rinosinuzitis bez nosnih polipa (CRSSNP) u zavisnosti od endoskopski uočenog prisustva nazalnih polipa u srednjem nosnom hodniku. Tri glavna inflamatorna endotipa, tip 1, tip 2 i tip 3, mogu se naći i u CRSwNP i u CRSSNP fenotipovima. Histološka karakteristika eozinofilnog CRS (E CRS) je eozinofilna infiltracija. E CRS je povezan sa težom kliničkom slikom, povećanim komorbiditetom i većom stopom recidiva, kao i sa prisustvom gustog, nazalnog sekreta. Eozinofili su multipotentne efektorske ćelije koje omogućavaju odbranu domaćina od patogena, kao i kod alergijskih i nealergijskih inflamatornih bolesti. Eozinofili stupaju u interakciju sa *Staphylococcus aureus*, stafilokoknim enterotoksinom B i gljivama, koji su prisutni u tkivu pacijenata sa CRS. Ove interakcije aktiviraju Th2 imuni odgovor u sinonazalnoj sluznici i podstiču lokalnu inflamaciju. Aktivirani eozinofili su otkriveni ne samo u tkivu, već i u sekretu sinonazalne sluznice.

Respiratornu bolest pogoršanu nesteroidnim antiinflamatornim lijekovima (NSAIL) (AERD) karakteriše hronična eozinofilna inflamacija respiratornog trakta kod pacijenata sa astmom i/ili hroničnim rinosinuzitisom (CRS), praćena nazalnim polipima (NP) kao i preosetljivošću na NSAIL, uključujući aspirin. Patofiziologija AERD kao endotipa astme podrazumijeva disregulaciju metabolizma arahidonske kiseline (AA), kao i hroničnu, ekstenzivnu, eozinofilnu inflamaciju tipa 2. AERD karakteriše hronična upala sa disbalansom eikozanoida, visokim nivoom inflamatornih medijatora kao što su cistenil leukotrijeni (CisLTs) i prostaglandin D2 (PGD2), aktivacijom mastocita, trombocita i urođenih limfoidnih ćelija (ILC2).

Remodelovanje tkiva koje uključuje, između ostalog, inflamatorni infiltrat i neovaskularizaciju nazalne i sinusne sluzokože je dio patogeneze hroničnog rinosinuzitisa (CRS). Cilj ovog istraživanja bio je da se kliničkim parametrima procijeni

povezanost infiltracije eozinofila i angiogeneze u stromi nazalnih polipa (NP)/sluzokože nosa i sinusa, sa kliničkim parametrima kod pacijenata sa različitim fenotipovima CRS, kao i kod ispitanika bez inflamacije nazalne sluzokože.

Studija koja je osnov doktorske disertacije je istraživala povezanost između eozinofilne infiltracije i proliferacije endotela u sluznici nosa/sinusa kod pacijenata sa tri različita klinička fenotipa CRS. Takođe smo željeli da ispitamo da li je AERD poseban entitet unutar CRS-a sa formiranjem NP, prema njegovim histološkim karakteristikama vezanim za angiogenezu i eozinofilnu infiltraciju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Hronični rinosinuzitis	1
1.2 Inflamacija u okviru hroničnog rinosinuzitisa	4
1.3 Remodelovanje nazalne sluznice u okviru hroničnog rinosinuzitisa	8
1.4 Sinonazalna polipoza	14
1.5 Patohistološka dijagnostika hroničnog rinosinuzitisa	22
2. Angiogeneza	25
2.1 Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)	28
3. Eozinofili	34
4. Ciljevi istraživanja i hipoteze	41
4.1 Ciljevi istraživanja	41
4.2 Hipoteze istraživanja	42
5. Materijal i metode	42
5.1 Prikaz studije i selekcija pacijenata	42
5.2 Kriterijumi za uključivanje u studiju	44
5.3 Kriterijumi za isključivanje iz studije	45
5.4 Varijable koje se mjere u studiji	45
5.5 Opis procedura	45
5.6 Statistička analiza	47
6. Rezultati	47
6.1 Demografske karakteristike	47
6.2 Klinički parametri	48
6.3 Imunohistohemijske karakteristike	50
7. Diskusija	55
8. Zaključci	63
9. Reference	64

1. UVOD

1.1 Hronični rinosinuzitis

Pojam nazalne polipoze se pominje po prvi put u Egipatskoj literaturi , oko 2000 godina prije nove ere. "Sushruta Samhita" je najstariji poznati hirurški tekst, koji detaljno opisuje pregled, dijagnozu, liječenje kao i procedure iz oblasti plastične hirurgije, uključujući estetsku hirurgiju i rinoplastiku. Rekonstrukcije nosne piramide su primjenjivane nakon amputacije koja se sprovodila kao kazna za zločin. "Sushruta Samhita" je prevedena na arapski jezik u 8. vijeku, Hesler je preveo na latinski, Velurs na njemački jezik, a na engleski Hoernl. 1910. godine Kaviraj Bhishagharatna je objavio izdanje na engleskom, a novije izdanje je izdato 1963. [1]. Iako je Sushruta prvi uveo hirurške procedure iz oblasti rinohirurgije, u oblasti rinologije veća pažnja i prostor dat je Hipokratu, koji je proučio i dokumentovao podatke koji se odnose na patologiju iz oblasti otorinolaringologije, traumu , infekcije u oblasti rinologije, kao i nazalnu polipozu. Metod ekstrakcije, odnosno ekstirpacije polipa pomoću sunđera, koji je opisao i primjenjivao Hipokrat, krajem 19. vijeka koristili su pojedini rinolozi poput Voltolinija [2]. Kao etiološki faktor za nastanak polipoze, u ranom sedamnaestom vijeku smatrala se lokalna trauma [3]. Boehaave je 1774 godine prvi put pretpostavio da nazalni polipi vode porijeklo do nazalne sluznice i sluznice paranazalnih šupljina. Billroth je 1843 godine postavio tezu da su nazalni polipi hipertrofična sinonazalna mukoza, obzirom da epitel koji prekriva površinu polipa u većem dijelu histološki odgovara epitelu sluznice paranazalnih šupljina. Vizualizacija promjena nazalne sluznice predstavljala je izazov i ograničenje sve do 1829 godine kada je Benjamin Guy Babington prvi put upotrebio ravna i konusna ogledala, da bi usmjerio dnevnu svjetlost u prostor usne duplje i omogućio pregled ždrijela. Alfred Kirstein je prvi put upotrebio vještački izvor svjetla. Nosni spekulum kao osnovni instrument za pregled nosne duplje u različitim formama se koristio još od doba Hipokrata.

1993. godine Kern i Shenck su došli do rezultata da je sinonazalna polipoza prisutna kod 25,9% pacijenata oboljelih od alergijskog rinitisa, dok je 3,9% pacijenata koji nemaju alergijski rinitis bolovalo od sinonazalne polipoze. Sinonazalna polipoza je

multifaktorijska bolest, čiju osnovu čini hronična inflamacija, često udružena sa anatomskim i genetskim abnormalnostima. Polipoza koju karakteriše masivni edem sluznice krajnja je manifestacija inflamacije sluznice u nosnoj šupljini pri čemu se formiraju tvorevine sluznice koje su na peteljci ili su sesilne [4].

Hronični rinosinuzitis se definiše kao zapaljenje sluzokože nosa i paranazalnih sinusa, karakterisano sa dva ili više simptoma, među kojima su osjećaj zagušenosti nosa i sekrecija iz nosa, osjećaj bola ili pritiska u predjelu lica, smanjenje ili gubitak osjećaja mirisa, i / ili endoskopski nalaz polipa u nosu sa ili bez prisustva sluzavo-gnojnog sekreta u srednjem nosnom hodniku i /ili promjene na nalazu kompjuterizovane tomografije, koje pokazuju otok sluzokože ostiomeatalnog kompleksa i /ili zasjenčavanja šupljina paranazalnih sinusa, u periodu dužem od dvanaest nedjelja [5].

Hronični rinosinuzitis je dijagnostikovao kod 5% do 12% svjetske populacije [6]. Inflamacija sluznice je prisutna i održava se uz prisustvo komorbiditeta što su astma, preosjetljivost na nesteroidne antiinflamatorne lijekove, alergijski gljivični sinuzitis. U odnosu na tip imunološkog odgovora razlikuje se više kliničkih fenotipova. Hronični rinosinuzitis sa nazalnim polipima predstavlja entitet gdje dominira T2 tip imunološkog odgovora, dok hronični rinosinuzitis bez nazalne polipoze predstavlja fenotip dominantnog T1 tipa imunološkog odgovora. Sinonazalna sluznica je mjesto susreta organizma sa različitim faktorima spoljašnje sredine, patogenima i alergenima. Brojni patogeni koji stupaju u kontakt sa sinonazalnom sluznicom, stimulišu imuni sistem domaćina i na taj način započinju obnavljajući proces inflamacije u okviru hroničnog rinosinuzitisa. Osim faktora spoljašnje sredine, inicijatori inflamacije potiču i do samog organizma domaćina. Etiološki faktori domaćina su genetska predispozicija, koja podrazumijeva oboljenja, koja u okviru kliničnog sindroma podrazumijevaju i prisustvo sinonazalne polipoze. Primjer je cistična fibroza, autozomno recesivno oboljenje, udruženo sa mutacijom CFTR gena u regionu q31, hromozoma 7. Kod 32% do 44% oboljelih, manifestuje se sinonazalna polipoza u okviru hroničnog rinosinuzitisa [7].

Anatomske varijacije struktura nosnog kavuma, koje dovode do kompromitovane aeracije, poslijedične hipoksije i inflamacije su devijacija nosne pregrade, koja je najčešća i pneumatizacija nosnih školjki, dominantno srednjih. Urođeni imunitet čine epitelna barijera, ćelije mukoze - makrofagi, dendritične ćelije, mastociti, cirkulišu fagocitomonociti i neutrofilni, urođene limfoidne ćelije, NK ćelije, kao i sistem komplementa.

Urođeni imunitet omogućava fagocitozu, aktivaciju komplementa za identifikaciju i uklanjanje bakterija, komplekse antitijela, identifikaciju i uklanjanje štetnih agenasa spoljašnje sredine i aktiviranje stečenog imunog odgovora [8].

Staphylococcus aureus je patogen koji često kolonizuje sluznicu nosa. Prisustvo IgE antitijela na enterotoksine A i B *Staphylococcus aureus* u tkivu nosnih polipa svrstava ih u etiološke faktore. Osim kao estracelularni patogen, *S. aureus* je dokazan u epitelnim ćelijama nazalne sluznice, miofibroblastima, CD45- pozitivnim fagocitima, kao i u tkivu polipa pacijenta preosjetljivih na aspirin. Marrack i Kappler su 1990 godine kategorisali enterotoksine *S. aureus* kao superantigene [9]. U pitanju su proteini koji izazivaju inflamatornu reakciju uslijed aktivacije T i B limfocita. Enterotoksini *S. aureus* (SEB) narušavaju integritet epitelnih ćelija inhibirajući ekspresiju proteina zonule occludens (ZO). SEB aktivira toll-like receptor (TLR 2) što rezultira ekspresijom IL-6, IL-8, indukuje reaktivne vrste kiseonika, koji narušavaju integritet epitelnih ćelija. Inflamacija indukovana oslobođenim citokinima dovodi do degranulacije eozinofila i lokalizovane eozinofilne inflamacije [10]. Tkivo nazalnih polipa koje je pozitivno na IgE specifičan za stafilokokne enterotoksine (SAE- Ig-E), ima veće koncentracije eozinofila, eotaksina i IL-5. Prisustvo superantigena ELISA-om su dokazali Seiberling i saradnici, koji su otkrili uobičajene stafilokokne toksine (stafilokokni enterotoksin A [SEA], SEB, SEC1– SEC3, SED, toksin sindroma toksičnog šoka [TSST]-1) kod 48% pacijenata sa polipozom i kod 7,7% pacijenata oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa bez sinonazalne polipoze [10]. Stafilokokni enterotoksin B (SEB) može direktno stimulisati T ćelije da proizvode citokine tipa 2 (IL-5 i IL-13) i time indukovati eozinofilnu inflamaciju. Mast ćelije su prisutne u epitelu i submukozi tkiva polipa. Oslobođanjem proteaza, citokina i lipidnih medijatora inflamacije učestvuju u patogenezi hroničnog rinosinuzitisa. Njihova aktivacija je omogućena receptorima za prepoznavanje obrazaca (PRR), prilikom susreta sa patogenima [11].

PRR su komponente urođenog imunog sistema, koje su izražene na ćelijama imunog sistema uključujući i epitelne ćelije disajnih puteva (EPC). PRR mogu prepoznati strukture zajedničke mnogim patogenima, poznate kao molekularni obrasci povezani sa patogenom (PAMP), kao i molekularni obrasci povezani sa oštećenjem (DAMP), koji su endogeni signali proizvedeni kao odgovor na oštećenje ćelije ili stres. Nakon što prepoznaju ove obrasce, PRR mogu pokrenuti urođeni imuni odgovor [12].

Gljive stimulišu imuni odgovor domaćina, što ukazuje na njihovu ulogu u patogenezi CRS. Prirodne ćelije ubice (NK) su limfoidne ćelije u perifernoj krvi koje oslobađaju citokine i predstavljaju ranu fazu imunog odgovora protiv *Aspergillus*. *Aspergillus fumigatus* povećava lučenje inflamatornih citokina, kao što su IFN-g, TNF-a [13]. Gljive su sigurno etiološki faktor alergijskog gljivičnog rinosinuzitisa (AFRS). Alergijski gljivični rinosinuzitis karakteriše preosetljivost tipa1, nazalna polipoza, eozinofilni sekret, prisustvo neinvazivnih gljivica u lumenu paranazalnih šupljina [14]. Alergijski gljivični rinosinuzitis (AFRS) predstavlja podgrupu eozinofilnog gljivičnog rinosinuzitisa i podrazumijeva pacijente koji imaju pozitivan PRICK test ili Ig E antitijela na gljivice. Osim patogena, u faktore spoljašnje sredine spadaju i proteinski molekuli koji se ponašaju kao alergeni ili su to supstance koje su prisutne kao zagađivači u spoljašnjoj sredini.

1.2 Inflamacija u okviru hroničnog rinosinuzitisa

Hronična inflamacija sluznice je posljedica disfunkcije faktora okruženja i imunog sistema oboljelog. Nosna šupljina je prekrivena različitim vrstama epitela u zavisnosti od lokalizacije. Predio vestibuluma nosa prekriva pločasto slojeviti epitel sa orožavanjem, ispod kojeg se nalaze fibrozna i kolagena vlakna dermisa sa pripadajućim žlijezdama. Ostali dio zidova nosne šupljine osim gornje nosne školjke, gornjeg dijela nosne pregrade, krova nosne duplje i gornjeg dijela unutrašnje strane srednje nosne školjke prekriva pseudoslojeviti cilindrični epitel sa trepljama. Submukoza je građena od vezivnog tkiva bogatog krvnim sudovima, koji u vidu venskih sinusoida razdvajaju seromucinozne žlijezde. Osim nervnih vlakana prisutni su makrofagi, fibroblasti, limfociti, plazmociti i eozinofili. U vezivnom tkivu podsluznice nalaze se i seromukozne žlijezde [15]. Subepitelni kapilari su fenestrirani u cilju lakšeg transporta tečnosti. Limfoidno tkivo specifično za nazalnu sluznicu nalazi se u vidu nakupina limfoidnih ćelija, koje nije na taj način izraženo u sluznici paranazalnih šupljina. Ćelije limfoidnog tkiva su predstavljene B i T limfocitima, makrofagima, neutrofilima, eozinofilima i mast ćelijama. Olfaktivnu regiju koja obuhvata krov nosne duplje, gornju nosnu školjku i gornji dio nosne pregrade, prekriva olfaktorni epitel koji čine bipolarni neuroni- olfaktivne ćelije, od kojih polaze aksoni, koji prolazeći kroz bazalnu membranu se udružuju sa aksonima

ostalnih olfaktornih neurona formirajući folla olfactoria, koji se prolaskom kroz kribroznu laminu etmoidalne kosti završavaju u bulbus olfactorius. Na apikalnom kraju olfaktorne ćelije nalaze se cilije koje nose receptore za miris. Brojne su potporne ćelije olfaktornog epitela koje su uključene u procese sekrecije i apsorpcije. Bazalne ćelije se diferenciraju u olfaktorne i potporne. Laminu propriu čini rastresito vezivno tkivo u kojem su prisutne tubulo acinusne žlijezde [16]. Prisustvo lipofuscina daje olfaktornom epitelu žuto-smeđu boju. Mukozni sekret i produkt tubulo-alveoralnih Bowmanovih žlijezda–lizozim, proteini i IgA omogućavaju rastvaranje mirisnih partikula. Respiratorni epitel se nalazi na bazalnoj membrani (BM), koju čine bazalna lamina sastavljena iz kolagena tip IV i laminina tip V. Retikularni dio bazalne membrane je nastao od sloja fibroblasta koji se nalaze ispod. Miofibroblasti nastaju iz fibroblasta i karakteriše ih aktin glatkih mišića [17]. Iznad retikularnog dijela nalazi se lamina densa, a površnije same epitelne ćelije [18]. Bazalna membrana omogućava migraciju inflamatornih ćelija. Lamina propria sadrži serozne i mukozne žlijezde, koje se nalaze ispod bazalne membrane i sačinjena je od kolagena i polisaharida. Ekstracelularni matriks omogućava ćelijsku diferencijaciju, migraciju i proliferaciju. Sluzokoža disajnih puteva je konstatno izložena agensima spoljašnje sredine i različitim patogenima. Osnovni protektivni mehanizmi nazalne sluznice su mukocilijarni transport, urođeni i stečeni imunitet, koji omogućavaju eliminaciju patogena spoljašnje sredine. Submukozne žlijezde nosne sluznice proizvode sekret bogat vodom, proteinima i peptidima kao što su lizozim i laktoferin koji imaju antimikrobni efekat [19]. U hroničnom rinosinuzitisu prisutna je povećana produkcija mucina koji predstavlja glikozilirani protein. Vlažnost nazalne sluznice održava njenu homeostazu i predstavlja zaštitnu barijeru. Mali sadržaj vode u nazalnom sekretu i hipersekrecija prisutni su kod hronične inflamacije. Mucini su makromolekuli koji formiraju gel fazu nazalnog sekreta i određuju njegovu viskoznost. Sekretuju ih submukozne žlijezde ili epitelne peharaste ćelije. Visok viskozitet korelira sa stepenom infalamacije respiratornog epitela [12].

Najvažniji fiziološki odbrambeni mehanizam nazalne sluznice je mukocilijarni transport. Koordinisano kretanje cilija obezbjeđuje transport zadržanih čestica do nazofarinksa, odakle se uklanjaju aktom gutanja. Cilindrični trepljasti epitel nazalne sluznice je prvi put opisan 1835 godine korišćenjem svjetlosnog mikroskopa [20]. Svaka ćelija sadrži do 250 pokretnih cilija, širine 0,3 μm i dužine 5 μm , sa prisustvom karakterističnih mitohondrija

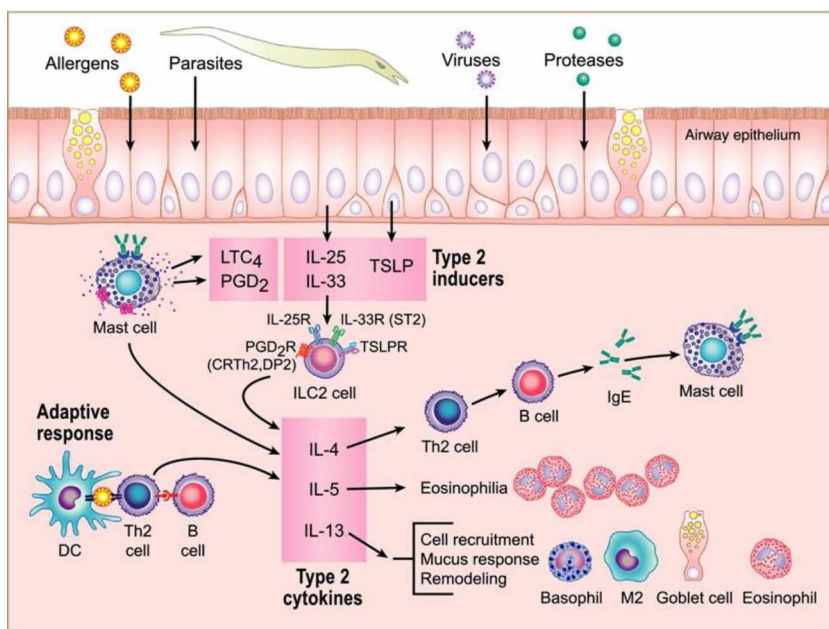
u apikalnom dijelu citoplazme, a koje uz prisustvo brojnih proteina i enzima omogućavaju pokretljivost cilija. Pecharaste ćelije i submukozne žlijezde obezbjeđuju nazalni sekret. Mukus je rastvor lipida i proteina koji se sastoji iz sol i gel faze. Gel faza se formira iznad vodene sol faze, koja sadrži jone natrijuma i hlora i omogućava kretanje cilija. Gel fazu karakterišu viskozitet i elastičnost koji omogućavaju zadržavanje udahnutih čestica i patogena. Na osnovu saharinskog testa brzina mukocilijarnog transporta kod zdrave osobe prosječno iznosi 7-15 mm [21]. Nazalna sekrecija je kontrolisana sekrecijom acetilholina, uglavnom preko holinergičkih vlakana. Ekstracelularni stimulans dovodi do egzostoze mucina, usmjeravajući granule mucina do apikalne površine perharaste ćelije. Ekspanzija mucina se odvija brzo jer je u granulama kondenzovan, bogat jonima kalcijuma. Nakon oslobađanja vezuje značajnu količinu vode i na taj način uvećava svoju količinu. Epitel predstavlja snažnu zaštitnu barijeru, kroz komplekse koji posreduju u adheziji ćelija-ćelija. Apikalni tijesni spojevi (TJ), koje čine okcludini, klaudini i proteini citosplazmatskog skeleta koji ih učvršćuju, zatvaraju paracelularni prostor. Tijesni spojevi zajedno vezuju aktinski skelet susjednih ćelija i sastoje se E-kadherina i članova porodice a-, b-, g-katenina. Dezmozomi obezbjeđuju dodatnu adhezivnu snagu epitelu tako što povezuju intermedijarne filamente sa transmembranskim adhezionim proteinima. Ovi kompleksi obezbjeđuju strukturni integritet epitela, regulišu protok jona i malih molekula i sprečavaju patogene, alergene i druge agense spoljašnje sredine da pristupe submukoznom prostoru [16]. Nekoliko od ovih proteina takođe uspostavlja polaritet ćelije i pokreće bitne ćelijske funkcije kao što su proliferacija i diferencijacija, omogućavajući vezu između gubitka integriteta epitela i pokretanja osnovnih ćelijskih funkcija neophodnih za regeneraciju. Narušavanje integriteta epitela uzrokuje izlaganje alergenima, respiratornim virusima koji sadrže proteaze ili citokinima kao što su interleukin IL-13 [22]. Epitelne ćelije takođe održavaju funkciju barijere kroz lučenje enzima koji imaju protektivnu ulogu u odnosu na patološke posljedice prekomjerne aktivnosti proteaza. Dodatni sloj odbrane obezbjeđuje sekret koji produkuje epitel. Sekret uključuje izlučene mucine, glikoproteine visoke molekularne težine koji zadržavaju čestice i patogene. Ispod ovog sloja sluzi nalazi se pericilijarni sloj niskog viskoziteta koji omogućava kretanje cilija i naknadnu eliminaciju patogena. Važnost mukocilijarnog klirensa za fiziologiju respiratornih organa je naglašena velikim brojem mutacija u cilijarnom aparatu za koje je do sada poznato da uzrokuju primarnu cilijarnu diskineziju,

sa hroničnim rinosinuzitisom kao karakteristikom. Epitelne ćelije takođe luče širok spektar antimikrobnih supstanci. Lizozim je mali katjonski protein koji luče submukozne žlijezde. Vezivanje lizozima za zidove bakterijskih ćelija olakšava fagocitozu makrofaga. Najefikasniji je protiv gram-pozitivnih bakterija, ali takođe djeluje protiv gram-negativnih bakterija i gljivica. Lizozim proizvode submukozne žlijezde, koje su manje prisutne u tkivu sinonazalnih polipa [23]. Laktoferin je u stanju da spriječi rast mikroba sakupljanjem gvožđa, onemogućavajući njegovu upotrebu od strane gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Vezuje lipopolisaharide iz ćelijskog zida gram-negativnih bakterija, inhibira ulazak RNK i DNK virusa u ćelije domaćina vezivanjem za virusne receptore domaćina [24]. Proteini kolektina (kolagen-lektin), kao što su proteini surfaktanta (SP-A i SP-D), C-reaktivni protein i lektin koji vezuje manozu, stupaju u interakciju sa brojnim bakterijama disajnih puteva, mogu aktivirati komplement i ispoljiti antimikrobna svojstva. Kolektini prepoznaju i vezuju se za lipopolisahide ćelijskih membrana bakterija, preko svojih domena za vezivanje ugljenih hidrata zavisnih od kalcijuma. Vitamin D smanjuje produkciju T2 citokina, IL-4, IL-5 i IL-13, dok stimuliše oslobađanje IL-10. Derivati vitamina D, inhibicijom TNF-a inhibiraju sekreciju matriksne metaloproteinaze-2 (MMP-2) i matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u fibroblastima uključenim u genezu nazalnih polipa. Metabolit vitamina D 1,25 (OH) 2VD3 inhibira T1 i stimuliše T2 imunski odgovor [25]. IL-37 proizvodi ljudska nazalna sluzokoža pomoću kalikreina. Transkripcija gena IL-37 indukovana je vezivanjem bioaktivnog oblika vitamina D za njegov receptor. Defenzini se direktno vezuju za viruse i na taj način onemogućavaju njihov ulazak u ćelije domaćina. A- i b-defenzin su eksprimirani u sinonazalnom epitelu. Imaju antimikrobna dejstva protiv bakterija i gljivica, kroz formiranje pora u bakterijskim i gljivičnim membranama [26]. Pojačana fagocitoza je funkcija nekoliko drugih sekretornih proteina koje proizvode epitelne ćelije, kao što su surfaktantni proteini. Respiratorni epitel nije pasivna barijera, već urođeni imuni organ sa aktivnom ulogom u odbrani domaćina. Oštećenje respiratornog epitela dovodi do smanjene diferencijacije cilijarnih ćelija, nepravilne funkcije cilija samog epitela što onemogućava transport i eliminaciju štetnog agensa.

1.3 Remodelovanje nazalne sluznice u okviru hroničnog rinosinuzitisa

Eggstonov koncept etiologije nazalne polipoze podrazumijeva da se polipi formiraju zahvaljujući vaskularnim promjenama sluznice koje su uzrokovane ponovljenim zapaljenskim procesom koji dovodi do kongestije i otoka. Oko 20% pacijenta oboljenih od hroničnog rinosinuzitisa boluje od sinonazalne polipoze. Astma, alergijski gljivični sinuzitis, eozinofilni hronični rinosinuzitis, cistična fibroza, Kartagenerov sindrom (sinopulmonalna bolest, azoospermija, nazalna polipoza), Youngov sindrom, Churg-Straussov sindrom (astma, eozinofilni vaskulitis), kao i preosjetljivost na nesteroidne antiinflamatorne lijekove udružena sa astmom – Samterov trijas (AERD) su stanja koja su udružena sa sinonazalnom polipozom. Sluznica etmoidalnih ćelija mjesto je inflamatornog procesa i mjesto gdje se najčešće formiraju polipodne mase. 1940 godine su imunohistohemijski dokazani eozinofili i limfociti u inflamatornom infiltratu nazalnih polipa. Sluznicu polipa čini respiratorni epitel sa poljima skvamozne metaplazije kao i poljima zadebljanja bazalne membrane. Gustina submukoznih žlijezda je najveća u predjelu samog ishodišta polipa. Goblet žlijezde u okviru epitela i submukozne serozne i mukozne žlijezde proizvode različite vrste mucina. Biofilm predstavlja trajne strukture formirane od nakupina bakterija i njihovih polisaharida. Karakteristika im je rezistencija na imuni odgovor organizma domaćina, na fagocitozu, kao i na dejstvo antibiotika. Razvoj hronične inflamacije u prisustvu biofilma polazi od aktuelne infekcije, kolonizacije i razvoja rezistencije na antibiotike. *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* najčešće formiraju biofilm nazalne sluznice koji održava inflamaciju, čineći je ponavljajućom [27]. Neurotransmiteri i neuropeptidi utiču na lučenje nazalnog sekreta i frekvenciju kretanja cilija. Urođena cilijarna disfunkcija je prisutna kod cistične fibroze i primarne cilijarne diskinezije, dok je stečena karakteristika hroničnog rinosinuzitisa. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* i *Pseudomonas aeruginosa* kompromituju mukocilijarni transport. U okviru hronične inflamacije dominira izmijenjen mukocilijarni transport i funkcija epitelne barijere, što dovodi do smanjene eliminacije proinflamatornih supstanci, formiranja propustljive barijere sa eksudacijom i izraženog imunog odgovora. Stimulisani imuni odgovor dovodi do povećanja proizvodnje citokina, dominacije T-ćelija u sluzokoži i infiltracije eozinofilima, što

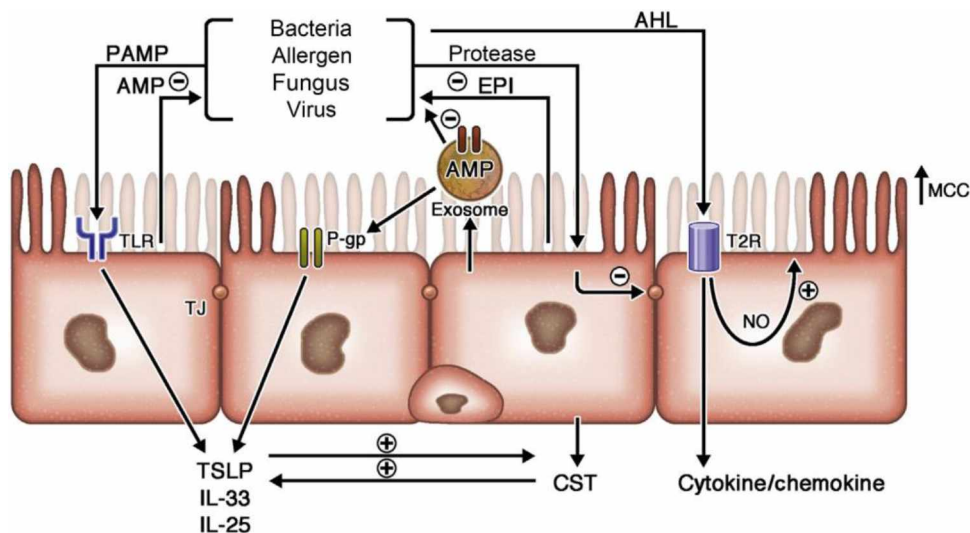
rezultira produženom hroničnom inflamacijom. Remodelovanje tkiva je karakteristika sinonazalne polipoze, pri čemu dominiraju promjene epitelnih ćelija i smanjenje ćelijske adhezije. Epitelno-mezenhimalni prelaz (EMT) je transformacija epitelnih ćelija u mezenhimske fenotipove pod specifičnim fiziološkim i patološkim uslovima. Epitel je fizička i imunološka barijera koja održava ravnotežu vode i elektrolita, uklanja, razgrađuje ili neutrališe toksine i patogene spoljašnje sredine. Epitelne ćelije su neophodne za urođeni imunitet na patogene. Imaju sposobnost da aktiviraju receptore za prepoznavanje obrazaca čime proizvode zaštitne enzime, peptide, proteine, lipide i jone, čineći tako epitel sluzokože efikasnom barijerom protiv patogena [28]. Do disfunkcije epitelne barijere dovode defekti proteina tijesnog spoja, nedostatak zaštitnih antiproteaza, disregulacija sistema elektrolita i transporta vode. Rezultat oštećenja epitela je povećana proizvodnja IL-25, IL-33 koja je posljedica efekta proteaza i patogena. Inflamacija po tipu T2 imunskog odgovora podrazumijeva povišene vrijednosti IL-4, IL-5, IL-13, eotaksin-1, eotaksin-2, eotaksin-3, eozinofilnog katjonskog proteina, monocitno hemoatraktantnog proteina (MCP-1) kao i koncentracije eozinofila, u poređenju sa zdravim ispitanicima. (slika 1.)



Slika 1. - inflamatorni odgovor tipa 2 kod hroničnog rinosinuzitisa sa nazalnim polipima [29]. CRSwNP- hronični rinosinuzitis sa nazalnim polipima, TSLP- timusni stromalni limfopoetin, IL- interleukin, ILC2- urođene limfoidne ćelije tipa 2, IgE- imunoglobulin E, LTC4- leukotrien C4, PGD2 - prostaglandin D2, DC - dendritična ćelija, TSLPR- receptor limfopoetina strome timusa.

Pored povećanog nivoa T2 ćelija, karakterističan je P-gp imunomodulator T2 odgovora u okviru hroničnog rinosinuzitisa. P-gp je 170 kDa transmembranski protein koji predstavlja transmembransku pumpu koja zavisi od adenozin trifosfata (ATP). Ovaj protein omogućava transport lijekova, toksina, metabolita i citokina kroz ćelijsku membranu pri čemu dolazi do hidrolize ATP-a. P-gp se nalazi u sluzokoži nosne pregrade, nosnih školjki i paranazalnim šupljinama kod čovjeka, kod zdravih ispitanika ali i kod pacijenata oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa. Nivoi membranskog i izlučenog P-gp koreliraju sa povećanim vrijednostima epitelnih citokina na način što reguliše sekreciju T-2 citokina [30]. Izraženija klinička slika je u skladu sa povećanim vrijednostima izlučenog P-gp. Protein se prenosi mukocilijarnim transportom i time širi polje inflamacije (slika 2.) U epitelu su prisutne akantoza i akantoliza. Povećana koncentracija proteina plazme i posledični edem su karakteristika polipa. Aktivna koagulacija je prisutna u tkivu oboljelih od CRS. Nivoi trombin/ antitrombina i inhibitora fibrinolize kojeg aktivira trombin, su veći kod pacijenata sa sinonazalnom polipozom udruženom sa astmom u odnosu na pacijente kod kojih astma nije komorbiditet. Formiranje polipa je praćeno taloženjem velikih količina fibrina [31].

IL-13 i prostaglandin E2 dovode do smanjenje broja cilindričnih ćelija, povećanja broja peraharstih ćelija i mastocita u okviru samog epitela. IL-17 ne dovodi do izraženih promjena u tipu ćelija epitela. Integritet epitela je neophodan za njegovu zaštitnu funkciju. Kompleksni spojevi se formiraju između apikalnog spoja i nižeg adherentnog spoja, uključujući dezmozome i hemidezmozome. Čvrsti spojevi apikalnog sloja regulišu i transport jona kroz sam epitel. Spojni proteini regulišu polaritet apikalno- bazalnih ćelija, difuziju jona, permeabilnost, migraciju i proliferaciju ćelija. Ukoliko je smanjena ekspresija proteina tijesnog spoja kao što je okcludin i kladin-4, dolazi do smanjene transepitelne rezistencije. Jedan od patogena koji utiče na okcludin i kladin-1 je *Pseudomonas aeruginosa* [30]. Epitelne ćelije gube polaritet na nivou apikalnih i bazalnih djelova i spojeva sa susjednim ćelijama. Mogućnost migracije stiču reorganizacijom citoskeleta i formiranjem vimetinskih filamenata. Izmijenjene ćelije dobijaju karakteristike mezenhima, uz povećanu ekspresiju matriksnih proteina i proteaza kao što su laminin i matriksne metaloproteinaze MMP 2 i MMP 9.



Slika 2. - Patogeni i faktori spoljašnje sredine stupaju u interakciju sa više receptora epitelnih ćelija pri čemu stimulišu urođeni i stečeni imuni odgovor [30]. P-gp ima ulogu da ukloni štetne agense spoljašnje sredine i stimuliše oslobađanje citokina.

EPI – endogeni inhibitor proteaze, AHL - acilhomoserin lakton, CST – cistatin, NO - azot oksid, PAMP - molekularni obrazac povezan sa patogenom.

Matriksne metaloproteinaze (MMP) su endopeptidaze zavisne od cinka, koje mogu razgraditi komponente ekstracelularnog matriksa i vaskularnih bazalnih membrana. Sintetišu ih fibroblasti, epitelne ćelije, makrofagi i neutrofili kao odgovor na patogeni agens [32]. Imaju važnu ulogu u migraciji leukocita u okviru inflamacije respiratornog trakta. Prema supstratima na kojima ispoljavaju efekat dijele se na kolagenaze, žalatinaze, matriks hidrolaze. MMP-9 se nalazi u granulama neutrofila i odmah se oslobađa nakon stimulacije faktorom nekroze tumora alfa (TNF- α) ili IL-8. Vaskularno remodelovanje je uzrokovano MMP-10 koju oslobađaju makrofagi [33]. Djelovanje MMP-9 je uravnoteženo tkivnim inhibitorima metaloproteinaza (TIMP) [34]. Kolagenaza MMP-1 je značajno prisutnija u epitelu pacijenta oboljelih od sinonazalne polipoze u odnosu na zdrave ispitanike [35]. Ćelije pozitivne na TIMP 1 i TIMP 3 su ponađene u eozinofilnim nazalnim polipima [36].

Epitelne ćelije pokreću i druge odbrambene mehanizme nakon identifikacije patogena, kroz veliki broj klasičnih receptora za prepoznavanje obrazaca, kao što su receptori gorkog ukusa (T2R), koji prepoznaju supstance kao što su kinin i nikotin. Ova porodica

receptora takođe prepoznaje supstance koje luče gram-negativne bakterije kao što je *Pseudomonas aeruginosa* [30]. Epitelne ćelije imaju protektivnu ulogu kroz sekreciju različitih proinflammatoryh medijatora koji izazivaju regrutovanje inflamatornih ćelija u disajne puteve. Dominantni su citokini IL-25, IL-33 koji samostalno ili u kombinaciji izazivaju inflamaciju kroz antigen nezavisnu aktivaciju urođenih limfoidnih ćelija tipa 2 (ILC2s) i kroz aktivaciju T2 ćelija. IL-33 može izazvati direktnu aktivaciju mastocita, produkciju prostaglandina D2, tromboksana A2 i CisLTs. Proinflammatoryh stimulansi povećavaju permeabilnost kroz fosforilaciju adherentnih spojeva, tijesnih spojeva i povezanog aktinskog citoskeleta. Fosforilacija tirozina u komponenti adherentnih spojeva je takođe povezana sa povećanom permeabilnosti. U nestimulisanim epitelnim ćelijama, receptorske i citoplazmatske proteinske tirozin fosfataze (PTP) se lokalizuju na endotelnim adherentnim ćelijama i defosforilišu komponente takvog spoja da bi promijenile permeabilnost. TNFa povećava fosforilaciju tirozina VE-kadherina da bi se poboljšala vaskularna permeabilnost. Aktinski citoskelet je osnova za stabilnost spoja, koji omogućava kontakt endotelnih ćelija i doprinosi promjenama u vaskularnoj permeabilnosti. Faktori koji indukuju propustljivost, destabilizuju spojeve ćelija tako što mijenjaju orijentaciju aktinskog snopa, koji zauzimaju vertikalni položaj. Perpendikularni aktinski filamenti, usmjeravaju mehaničku silu na spojeve i narušavaju njihov integritet. Mali guanozin trifosfati (GTPaze), posebno proteini Ras-homologne (Rho) porodice, identifikovani su kao glavni regulatori funkcije endotelne barijere kontrolisanjem endotelne permeabilnosti. Povećanje fosforilacije lakog lanca miozina (MLC) koje dovodi do formiranja aktin stresnih vlakana i aktivacije aktin-miozina kontraktilnosti se smatra glavnim mehanizmom Rho-posredovane endotelne hiperpermeabilnosti [37]. RhoA indukuje stresna vlakna i povećava kontraktilnost što dovodi do veće vaskularne permeabilnosti kao odgovor na razne vanćelijske stimulse uključujući trombin i histamin. RhoA je neophodan za povećanu permeabilnost kao odgovor na više stimulusa uključujući trombin i TNFa. RhoA se aktivira u endotelnim ćelijama tokom inflamacije, a aktivacija RhoA je direktno uključena u povećanu ekspresiju ICAM-1 u endotelnim ćelijama izloženim trombinu i lizofosfatidnoj kiselini. Važno je napomenuti da su zapaljenje i propustljivost endotela međusobno povezani patološki procesi. Brojni inflamatorni agonisti kao što su TNF-a i lipopolisaharidi (LPS) izazivaju hiperpermeabilnost epitelnih ćelija. Pokazano je da aktivacija neutrofila posredovana

hemoatraktantima takođe izaziva brzo povećanje permeabilnosti. Zauzvrat, ekstravazacija neutrofila dodatno podstiče inflamaciju endotela i stvaranje proinflamatornih citokina koji aktiviraju RhoA [37]. Povećana kontraktilnost aktin-miozina sa formiranjem aktinskih stresnih vlakana se smatra glavnim mehanizmom hiperpermeabilnosti endotela izazvane RhoA, fosforilacijom svijetlog lanca miozina.

Inflamatorni agensi brzo stimulišu ekspresiju intercelularnog adhezionog molekula (ICAM)-1, molekula adhezije vaskularnih ćelija (VCAM)-1 na vaskularnim endotelnim ćelijama, što olakšava regrutovanje neutrofila u endotel. Rho GTPaze posreduju u signalizaciji zavisnoj od integrina i na taj način regulišu trans-endotelnu migraciju neutrofila. Ekstravazacija neutrofila dodatno podstiče inflamaciju endotela i stvaranje proinflamatornih citokina koji aktiviraju RhoA, što dovodi do vaskularne disfunkcije, koja je posredovana patološkom RhoA signalizacijom [38].

ROS se stvaraju tokom normalnog ćelijskog metabolizma uslijed nepotpune redukcije molekularnog kiseonika. Superoksidni anjoni (O_2^-), hidroksilni radikali (OH^-), vodonik-peroksid (H_2O_2) i hipohlorna kiselina ($HOCl$) predstavljaju najčešće ROS sa visokim potencijalom oksidacije. Kada su u fiziološkim vrijednostima, ROS-posredovani ćelijski odgovori štite ćelije od oksidativnog stresa. Prekomjerna proizvodnja ROS tokom patoloških stanja izaziva oštećenje tkiva što je prisutno u patogenezi AERD [37]. Azot oksid (NO) funkcioniše kao važan signalni molekul u održavanju vaskularnog tonusa i promovisanju angiogeneze. Neki od metabolita NO poznatih kao reaktivne azotne vrste (RNS), kao što je peroksinitrit ($ONOO^-$), formirani nakon reakcije između NO i superoksid anjona izazivaju endotelnu disfunkciju. Štetni ćelijski efekti i ROS-a i RNS-a se pripisuju njihovoj ulozi u oksidaciji proteina, lipida i oštećenju DNK izazvane oksidansima [39]. Povećana permeabilnost, inflamacija i transmigracija neutrofila formiraju začarani krug vaskularne disfunkcije, koja je posredovana patološkom RhoA signalizacijom. Dominantni tipovi ćelija u pseudostratifikovanom epitelu su trepljaste ćelije, peharaste ćelije i bazalne progenitorske ćelije iz kojih potiču sve ostale podgrupe. Jonociti omogućavaju transport jona i regulišu viskoznost sluzi. Neuroendokrine ćelije (NEC) luče neuropeptide uključujući g-aminobuternu kiselinu (GABA). Hemosenzorne ćelije i ćelije mikrovilusa (MVC) imaju kapacitet da sintetišu CisLTs. Displazija bazalnih ćelija je karakteristika nazalne polipoze. Receptori za prepoznavanje su ekspimirani na ćelijama imunog odgovora uključujući i epitelne ćelije disajnog puta. Ovim receptorima

se prepoznaju molekularni obrasci koji se odnose na patogene, na oštećenje nastalo egzogenim ili endogenim agensom. Funkcionalni receptori- toll-like receptori, koji prepoznaju patogene i stimulišu imuni odgovor su karakteristika sinonazalne sluznice. Toll-like receptori su proteini membrane koji prepoznaju veliki spektar molekularnih obrazaca koji se povezani sa patogenima. TLR4 prepoznaje lipopoliosaharid (LPS) koji je komponenta membrane gram negativnih bakterija. TLR3 prepoznaje dvolančanu RNK kao genetski materijal virusa. Nakon prepoznavanja patogena ili oštećenja ćelije drugim faktorom, dolazi do produkcije inflamatornih i antimikrobnih peptida, citokina koji aktiviraju imuni odgovor [40]. Poremećaj u prepoznavanju između receptora i štetnog agensa dovodi do hronične inflamacije putem potenciranog ili neodgovarajućeg imunog odgovora. Disbalans na nivou natrijumovih kanala u epitelnim ćelijama utiče na količinu nazalnog sekreta i njegovu gustinu.

1.4 Sinonazalna polipoza

Pojam „ polip“ odnosi se na makroskopski prisutan izraštaj površine sluznice, koji u okviru morfološki izmijenjene sluznice prominira u lumen nosne ili paranazalnih šupljina. Polipi mogu predstavljati inflamatorno izmijenjenu sluznicu, hematolimfoidne ili mezenhimne tumore, kao i maligno izmijenjen epitel. U okviru hroničnog rinosinuzitisa polipodno izmijenjena sluznice predstavlja negranulomatozno inflamatorno izmijenjenu sluznicu[2]. Sinonazalnu polipozu, zbog značajno izmijenjenog mukocilijarnog transporta karakteriše gust, taman sekret okarakterisan kao eozinofilni. Na osnovu histološke građe, polipi su podijeljeni na edematozne - eozinofilne, hronične -inflamatorne i seromucinozne- žljezdane polipe. Hiperplazija epitela, submukozni edem, retencione mukozne ciste, kao i skvamozna metaplazija epitela su karakteristike edematoznih polipa, dok u inflamatornom infiltratu dominiraju eozinofili i plazma ćelije [41]. Hronični inflamatorni polip karakteriše prisustvo submukozne fibroze sa dominantnim limfocitima u inflamatornom infiltratu. Prisustvo eozinofila i njihovih produkata – Charcot-Leyden-ovih kristala su karakteristika sinonazalne polipoze ali i alergijskog gljivičnog sinuzitisa. U hroničnoj inflamaciji nazalne sluznice dolazi do dilatacije izvodnih kanala tubulo-alveolarnih žlijezda, koju uzrokuje njihova opstrukcija. Na taj način nastaju cistične formacije, nastale od izvodnih kanala novoformiranih žlijezda

samih polipa. Žlijezde polipa su novoformirane strukture koje nastaju nakon reepitelizacije dijela lamine propije, koja kroz defekt epitela formira izbočinu, odnosno začetak polipa. Na površini novoformiranog polipa patohistološki može biti prisutan niski kubični ili cilindrični epitel sa cilijama, ali bez prisustva velikog broja goblet ćelija. Kod formiranih polipa na površini se nalazi pseudoslojeviti respiratorni epitel sa goblet ćelijama. Najčešće prisutne žlijezde su duge, tubularne žlijezde, koje nastaju u srednjem ili distalnom dijelu polipa, a zatim se vertikalno pružaju. Mogu sadržati alveolarna proširenja. Površinu polipa može činiti i cilindrični epitel koji produkuje mukus. Iz bazalnih slojeva površinskog epitela razvijaju se žlijezde koje se izdužuju sa rastom samog polipa [12]. Njihovi izduženi kanali su ispunjeni mukusom. Degeneracija žlijezda je posljedica zadržavanja mukusa u tubulima koji time postaju dilatirani. Formiranje cista uzrokuje promjena epitela u niski, kuboidni epitel, kada žlijezda gubi svoju sekretornu aktivnost. Poseban entitet predstavljaju jednostrane, neinflamatorne polipoidne promjene respiratorne sluznice, ektodermalog porijekla, koje čine 0,5 – 4% svih tumora nosa. Od 1991. godine Svjetska zdravstvena organizacija je klasifikovala sinonazalne papilome u tri patohistološka tipa: egzofitični, invertni i onkocitni [42]. Invertni papilom nosi naziv Schneiderian papiloma u čast C. Viktora Schneidera, koji je 1660-ih godina identifikovao porijeklo nazalne sluzokože iz ektoderma. Invertni i egzofitični papilomi su najčešće dijagnostikovani podtipovi, a onkocitni najređe, sa samo 3-5% zastupljenosti. Invertni papilom potiče od sinonazalne Schneiderian membrane koja vodi porijeklo od neuroektoderma olfaktorne plakode i iz nazofaringealne sluzokože, koja je endodermalnog porijekla. Egzofitični papilom se u većini slučajeva nalazi na sluznici nosne pregrade, rijetko u predjelu vestibuluma nosa i srednje nosne školjke. Invertni i onkocitni papilom se javljaju na sluznici lateralnog zida nosnog kavuma, etmoidnog, maksilarnog sinusa, rijetko na sluznici frontalnog ili sfenoidnog sinusa. Patohistološki karakteriše ih urastanje hiperplastičnog pločastoslojevitog ili cilindričnog epitela u podsluznicu formirajući intraepitelne mikrociste koje sadrže mucin i magkofage [43]. Onkocitni papilom karakteriše više slojeva pseudoslojevitog cilindričnog epitela sa oezinofilnom citoplazomom, prisustvom intraepitelnih mukusnih mikrocista. Prisutan je lokalno invazivni rast i maligni potencijal. Hemangiomi nazalne sluznice mogu biti kapilarni ili kavernozni. Najčešće se javljaju na sluznici nosnih školjki ili prednjih partija nosne pregrade. Zapaljenski procesi koje karakteriše infiltracija tkiva oezinofilima su

alergijski gljivični sinuzitis, hronični hiperplastični eozinofilni sinuzitis i Samterov trijas (AERD).

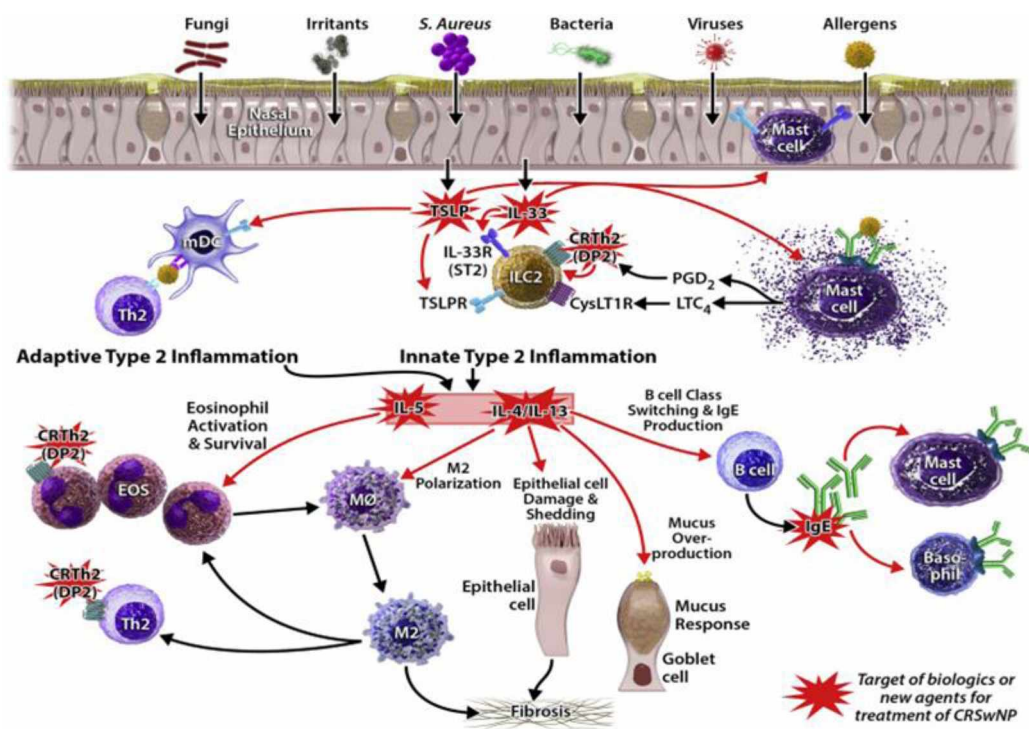
1967. godine Samter i Beers su ukazali na činjenicu da velika većina pacijenata oboljelih od bronijalne astme, koji imaju intoleranciju na nestroidne antiinflamatorne lijekove razvija sinonazalnu polipozu koju karakteriše recidivnost. Karakteristična je intolerancija na grupu nesteroidnih antiinflamatornih lijekova, zbog poremećaja regulacije prostaglandina i leukotrijena [44]. Predilekciono mjesto za formiranje polipa je ostiomeatalni kompleks. Kao jedan od uzroka smatra se dodir inflamirane sluznice koji za posljedicu ima oslobađanje proinflamatornih citokina. Oštećenja dovode do oslobađanja citotoksičnih medijatora i slobodnih radikala kiseonika, što dovodi do oštećenja epitela i same bazalne membrane. U cilju održanja integriteta sluznice aktiviraju se citokini, faktori rasta i talože se proteini ekstracelularnog matriksa [44]. Transformišući faktor rasta –beta (TGF- β) aktivira fibroblaste, dolazi do pojačane sinteze kolagena i umožavanja miofibroblasta, uz osnovu koju čini ekstracelularni matriks kao osnova za migraciju ćelija. Fagocitoza i apoptoza su izražene kod aktiviranih imunih ćelija. Autofagija je protetkivni mehanizam u kojem dominiraju lizozomi, a odvija se prilikom lezija epitelnih ćelija, ali doprinosi i fibrozi kao i remodelovanju sluznice. IL-4 i IL-13 dovode do diferencijacije fibroblasta u miofibroblaste i povećanog oslobađanja kolagena tipa III. Sam IL-13 može da dovede do izražene subepitelne fibroze. Remodelovanje sluznice u okviru hronične inflamacije iniciraju i eozinofili. Nakon lezije, ćelije epitela sekretuju IL-13, TGF- β , VEGF koji stimulišu mezenhimske ćelije uzrokujući subepitelnu fibrozu i hiperplaziju glatkih mišića [45]. Transport tečnosti i makromolekula preko endotela odvija se transcelularnim i paracelularnim putevima. Transcelularni put je predstavljen vezikularnim transportom većih makromolekula kao što su albumin i imunoglobulini. Čvrste spojeve (TJ) između ćelija čine kladini, koji uz dezmozome i adhezione veze omogućavaju nazalnoj sluznici funkciju mehaničke barijere [46]. Čvrsti spojevi odvajaju apikalnu od bazolateralne površine zatvarajući međućelijski prostor. Vizuelizovani su 1963. godine. Njihova paraćelijska barijera vrši kontrolu protoka tečnosti, jona i rastvorenih molekula. Zonula okluzivni proteini (ZO) povezuju proteine čvrstih spojeva sa citoskeletom ćelije. U zavisnosti od vrste kladina koji formira paracelularnu barijeru postojaće različit stepen propustljivosti epitela [16]. Adhezione veze (AJ) su odgovorne za međućelijsku adheziju povezivanjem ćelijske membrane i

skeleta. Čine ih kadherini, nektini, od kojih E- kadherin učestvuje u adheziji ćelije sa okolnim ćelijama, gradeći kompleks sa kateninima i na taj način povezuje proteine citoskeleta [47]. Dezmozomi su multiproteinski kompleksi zasnovani na kadherinu, odgovorni za mehaničku stabilnost međućelijskih spojeva i komunikaciju prenošenjem signala. Adhezija između ćelija se ojačava vezivanjem jona Ca^{++} za kadherine dezmozoma. Ekspresija dezmozomalnih kadherina je značajno smanjena u tkivu polipa u odnosu na zdravu nazalnu sluznicu [48]. Vaskularni endotelni (VE)-kadherin je ključni transmembranski AJ protein koji formira međućelijske spojeve u vaskularnom endotelu obezbeđujući homofilnu adheziju između susednih endotelnih ćelija. Povećanje permeabilnosti endotela ne samo da uzrokuje priliv tečnosti bogate proteinima u intersticijski prostor, već omogućava brzu migraciju neutrofila i nekontrolisani protok inflamatornih citokina, što izaziva respiratorne bolesti kao što je AERD. Vaskularni endotel se podvrgava konstantnom remodelovanju citoskeleta kao odgovor na različite cirkulišuće agoniste kao što su trombin i histamin, bakterijski patogeni i endotoksini. Reorganizacija citoskeleta izazvana štetnim stimulansima promoviše formiranje paracelularnih praznina, što dovodi do povećane propustljivosti endotela. Različiti članovi malih GTP-aza, porodice Rho imaju kontrastne efekte na remodelovanje citoskeleta i permeabilnost endotelnih ćelija. Aktivacija RhoA pokreće formiranje paracelularnog jaza, kontraktilnost ćelija i hiperpermeabilnost endotelnih ćelija (EC) [49]. Remodelovanje sluznice katarakteriše nakupljanje ekstracelularnog matriksa. TGF- β reguliše sintezu kolegana, fibronektina i proteoglikana, reguliše aktivnost matriksnih metaloproteinaza, utiče na diferencijaciju T ćelija čime inicira različite procese koji se odvijaju tokom hronične inflamacije tkiva. Povećana aktivnost matriksnih metaloproteinaza dovodi do oštećenja bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa čime se narušava integritet epitelnih ćelija. Makrofagi u sluznici respiratornog trakta interaguju sa epitelnim ćelijama. Toll-like receptori (TLR) su membranski proteini koji mogu prepoznati širok spektar PAMP-ova (molekularnih obrasca povezanih sa patogenima). TLR se sintetisu u endoplazmatskom retikulumu i eksprimiraju na svim urođenim imunim ćelijama, kao i na velikoj većini nehematopoetskih ćelija, kao što su makrofagi, neutrofili, prirodne ćelije ubice, mastociti, bazofili, eozinofili i epitelne ćelije [50]. Makrofagi i monociti koji su prisutni u sluzokoži disajnih puteva u zavisnosti od agensa sa kojim stupaju u kontakt, mogu imati proinflamatornu (M1) ili antiinflamatornu

(M2) ulogu. TLR ligandi prvenstveno usmeravaju makrofage ka M1 fenotipu, pri čemu se oslobađaju proinflamatorni medijatori kao što su TNF- α , IL-6 [51]. Oslobođeni inflamatorni agensi stimulišu fibroblaste u pravcu fibroze tkiva, bilo njihovom transmutacijom u miofibroblaste ili povećanjem broja njihovih ćelija. Citokini IL-4 i IL-13 pokreću diferencijaciju makrofaga u M2 fenotip [51]. U sinonazalnoj polipozi primjećeno je povećanje M2 makrofaga koji oslobađaju faktore rasta kao što su VEGF i PDGF, koji remodeluju ekstracelularni matriks [52]. Faktor rasta koji potiče od trombocita (PDGF) pripada humanim faktorima rasta koji regulišu rast i diobu ćelija. Prvobitno je izolovan iz seruma pune krvi, odsutan u serumu izvedenom iz plazme bez ćelija. Potom je ovaj faktor izolovan iz ljudskih trombocita. Fibroblasti, vaskularne glatke mišiće i endotelne ćelije i makrofagi takođe ekspimiraju ovaj faktor. Primarna funkcija PDGF-a je kontrola rasta mezenhimskih ćelija, kao što su fibroblasti i ćelije glatkih mišića [53]. Mastociti su locirani da otkriju i brzo reaguju na patogene na površini sluzokože. Mastociti povezani sa epitelom ekspimiraju i triptazu i karboksipeptidazu A3, dok oni koji su povezani za žlijezdani epitel u sinonazalnoj polipozi ekspimiraju ove proteaze u vezi sa himazom [54]. Obzirom da himaza indukuje lučenje sluzi, prisustvo himaze i mastocita u epitelu može igrati ključnu ulogu u prekomjernoj proizvodnji sluzi u sinonazalnoj polipozi (slika 3.). Mastociti u okviru sinonazalne polipoze i polipoze udružene sa preosjetljivošću na NSAIL, su izvor proinflamatornih leukotrijena (CysLTs). Adherentni trombociti poseduju sposobnost da konvertuju leukotrien A4 u CisLT, a uz to su i depo za IgE. Aktivacija trombocita je uključena u prekomjernu proizvodnju CysLT [56].

Eozinofili proizvode različite proinflamatorne molekule koji igraju važnu ulogu u dugoročnom održavanju plazma ćelija i proizvodnji antitijela u koštanoj srži. Takođe aktiviraju T ćelije tokom inflamatornih odgovora. Obzirom na veći broj aktiviranih T i podgrupe B ćelija, kao i proizvodnji antitijela koji su prisutni u sinonazalnoj polipozi, uticaj eozinofila je više od jednostavnog promovisanja imunog odgovora tipa 2. Imunomodulatorne supstance su smještene u granulama eozinofila. Ove granule sadrže prethodno formirane depoe katjonskih proteina, glavnog osnovnog proteina (MBP), eozinofilnog katjonskog proteina (ECP), neurotoksina izvedenog iz eozinofila (EDN) i eozinofile peroksidaze (EPKS). Njihovo dejstvo se ispoljava na patogenima spoljašnje sredine, ali i na tkivu domaćina. Eozinofili oslobađaju sadržaj granula putem klasične

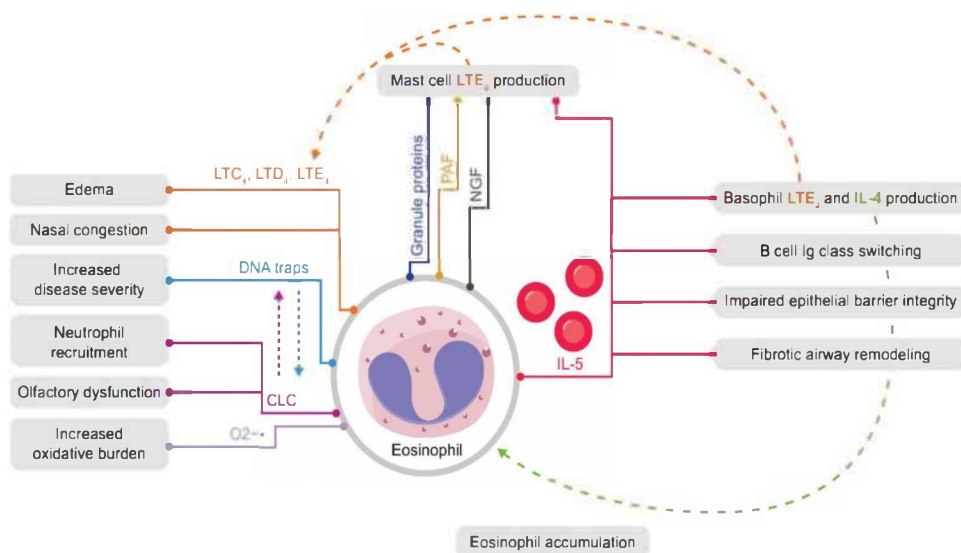
egzocitoze, egzocitoze spoja i degranulacije. Oslobođanje sadržaja eozinofilnih granula od strane tkivnih eozinofila je osnova inflamacije koja podrazumijeva eozinofilni infiltrat. Inflamatorni infiltrat u kojem dominiraju eozinofili uzrokuje ekspresiju periostina koji dovodi do angiogeneze, fibroze i zadebljanja bazalne membrane. U sekretu respiratornog epitela nalaze se lizozimi, laktoferin, vodonik peroksid i azot oksid koji djeluju protiv patogena. IL-33 sekretuju makrofagi i dendrične ćelije, dok IL-25 proizvode eozinofili ili mast ćelije. IL-25 dovodi do fibroze. Urođene limfoidne ćelije (ILC) su novoidentifikovana klasa urođenih imunih ćelija. Ove ćelije dijele mnoge karakteristike CD4⁺ T ćelija, ali im nedostaje ekspresija svih markera loze i ne izražavaju adaptivne receptore imunih ćelija, kao što je receptor T ćelija. Ove ćelije su sposobne da proizvode velike količine IL-5 i IL-13 i mogu se aktivirati citokinima IL-25, IL-33 [57].



Slika 3. Imunopatologija hroničnog rinosinuzitisa sa sinonazalnom polipozom – remodelovanje sluznice pod dejstvom citokina inflamatornog odgovora tipa 2 [55].

Formiranje eozinofilnih ekstracelularnih zamki (EET) je stimulirano imunoglobulinima (IgG i IgA) i faktorom koji aktivira trombocite (PAF), nakon čega dolazi do citolize eozinofila, kada se oslobađa DNK koja potiče iz jezgra i vezana je za histone. Eozinofili

mogu formirati ekstracelularne zamke i oslobađanjem mitohondrijalne DNK koja sadrži specifične proteine eozinofilnih granulocita, ali ne dovodi do citolize. Ekstracelularne zamke se sastoje od DNK, proteina granula, a prate ih Charcot-Leiden kristali (CLC) [58]. Prisustvo EET-a je primjećeno subepitelijalno u tkivu nazalnih polipa i znak je perzistentne eozinofilne inflamacije. Charcot-Leiden kristali eozinofila se sastoje od galektina-10, proteina citoplazme. Oboljeli od CRSwNP imaju više nivoe IL-5, eotaksina, IL-33 i upornu kolonizaciju *Staphylococcus aureus*, što je preduslov za formiranje EET u subepitelu sa defektima epitelne barijere. EET značajno povećavaju oslobađanje IL-6 iz epitelnih ćelija respiratornog trakta [59]. MBP kao katjonski protein eozinofilnih granula odvodi do remodelovanja sluznice disajnih puteva povećanjem ekspresije epitelno transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β) i matriksne metaloproteinaze 1 (MMP-1), kao i posljedične subepitelne fibroze (slika 4.). Eozinofilni katjonski protein, koji karakteriše eozinofilnu inflamaciju, takođe doprinosi TGF- β -posredovanoj fibrozi u patogenezi hroničnog rinosinuzitisa. EET i CLC su karakteristični za sluzokožu i nazalni sekret kod CRSsNP i CRSwNP. Karakteristično je da mastociti oslobađaju histamin kao odgovor na stimulaciju MBP i ECP. Prisustvo eozinofilne i neutrofilne inflamacije u CRS-u se više ne može smatrati odvojenim procesima. Poremećaj čula mirisa, pozitivan nalaz/supstrat na snimcima kompjuterizovane tomografije paranzalnih šupljina, karakteristični su kod pacijenata sa mješovitim granulocitnim fenotipom u CRS, koji pokazuju i eozinofilnu i neutrofilnu inflamaciju. CLC doprinose inflamaciji aktiviranjem makrofaga, što dovodi do upale izazvane IL-1 β , dok rastvorljivi galektin-10 ima antiinflamatorne efekte. CLC protein je prvobitno identifikovan kao lizofosfolipaza, dok je potom uvršćen u familiju galektina i nazvan galaktin-10 [60]. Humani eozinofili sadrže veliki broj citoplazmatskih CLC proteina, koji čini do 10% ukupnog ćelijskih proteina. Litička degranulacija predstavlja regulisan način ćelijske smrti aktiviranih eozinofila.



Slika 4. - uloga IL-5 i eozinofila u patofiziologiji hroničnog rinosinuzitisa sa sinonazalnom polipozom (CRSwNP) [61].

CLC - Charcot–Leiden kristali, CRSwNP - hronični rinosinuzitis sa sinonazalnom polipozom, DNK - deoksiribonukleinska kiselina, GM-CSF - faktor stimulacije kolonije granulocita-makrofaga, Ig – imunoglobulin, IL- interleukin, ILC2 - grupa 2 urođena limfoidna ćelija, LTC₄ - leukotrien C₄, LTD₄ - leukotrien D₄, LTE₄ - leukotrien E₄, NGF - faktor rasta nerava, O₂^{-•} - superoksidni radikal anjona, PAF - faktor aktivacije trombocita

Polipoidno izmijenjena sluznica se rijetko može uočiti u predjelu donje nosne školjke. Promjene sluznice podrazumijevaju promjene epitela i submukoze, kao i prisustvo inflamatornog infiltrata. Hronični rinosinuzitis udružen sa sinonazalnom polipozom karakteriše zadebljanje bazalne membrane, fibroza submukoze, mukozne žlijezde, hiperplazija goblet ćelija [62]. Produkcija IL-4, IL-5, IL-13 kao citokina T₂ imunskog odgovora dovodi do morfoloških promjena sluznice. Zadebljane bazalne membrane je rezultat povećane akumulacije fibronektina, kolegana tip V, III i I. Pseudocistične formacije su česte, ispunjene proteinima plazme, posebno albuminom. Metaloproteinaze kao enzimi razlažu fibronektin, elastin, laminin, pa razlažući komponente bazalne membrane dovode do povećane vaskularne propustljivosti što uzrokuje edem i migraciju inflamatornih ćelija. TGF-β povećava IL-4 kao i produkciju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) koji omogućava angiogenezu i edem submukoze. U submukozi

polipoidno izmijenjene sluznice nalaze se kapilarni krvni sudovi, periglandularni krvni sudovi, arterijsko- venske anastomoze. Venule polipa pokazuju patološku poziciju u odnosu na endotelne ćelije i bazalnu membranu. Mnogi ćelijski spojevi su širom otvoreni. Krvni sudovi polipa su lišeni inervacije. Oslobođanje inflamatornih medijatora omogućava mikrovaskularnu eksudaciju plazme, što dovodi do edema submukoze u okviru sinonazalne polipoze. IL-4 promoviše ekspresiju VCAM-1, što dovodi do VCAM-1 posredovane adhezije eozinofila na aktivirani endotel. Adhezija eozinofila na VCAM-1 dalje indukuje transmigraciju eozinofila kroz aktivirane endotelne ćelije, što dovodi do pojačanog oslobađanja aktivnih proteina eozinofilnih granula u inflamiranom tkivu. Reprezentativni citokini tipa 2 IL-4 i IL-13 indukuju ekspresiju molekula adhezije vaskularnih ćelija-1 (VCAM-1), ali ne i intercelularnog molekula adhezije-1 (ICAM-1), na endotelnim ćelijama [63]. VCAM-1 je predstavnik moćnog adhezivnog liganda za eozinofile periferne krvi, ali ne i za neutrofile. VCAM-1 indukuje veći stepen adhezije eozinofila ljudske periferne krvi putem interakcije sa alfa 4 integrinima, kao što su alfa 4-beta 1 i alfa 4-beta 7, koji su eksprimirani na površini eozinofila, u poređenju sa ICAM-1, koji je eksprimiran na endotelnim ćelijama. IL-4 i IL-13 utiču na adheziju eozinofila na nivou vaskulature unutar mjesta inflamacije. Citokin IL-5 kontroliše razvoj i sazrevanje eozinofila u koštanoj srži, produžava preživljavanje i stimulira funkciju eozinofila koji su mobilisani i aktivni u tkivima. IL-5 generiše T2 ćelije, urođene limfoidne ćelije grupe 2 (ILC2), mastociti, pa čak i prirodne T ćelije ubice. ILC2 dominiraju u sekreciji IL-5 i IL-13 koje na mjestu inflamacije mogu osloboditi i epitelne ćelije. Eozinofili su ćelije koje proizvode IL-25 i stoga mogu da aktiviraju ILC2 [61]. Faktor rasta eozinofila, kao što je faktor stimulacije kolonije granulocita-makrofaga (GM-CSF) produžava preživljavanje i reguliše aktivnost eozinofila. Eozinofili su sami po sebi sposobni da spontano generiše GM-CSF, ali ne i IL-5, tokom njihove transendotelne migracije.

1.5 Patohistološka dijagnostika hroničnog rinosinuzitisa

Standardna histopatološka verifikacija Hematoksilin-Eozin obojenih presjeka biopsija predstavlja osnovni metod za dijagnostiku sinonazalne polipoze i hroničnog rinosinuzitisa nakon sprovedenog hirurškog liječenja. Promjene na sluznici se verifikuju

kako na epitelu, tako i u stromi. Laminu propriju inflamatornih nosnih polipa karakteriše edem, izraženo prisustvo eozinofila, ekstenzivna limfocitoza, prisustvo cistično izmijenjenih žlijezda ispunjenih mukusom. U oko 10% nosnih inflamatornih polipa, hronično zapaljenje nije dominantno uzrokovano eozinofilima, već limfocitima i neutrofilima. Imunohistohemijske analize predstavljaju značajnu kategoriju analiza inflamatornog odgovora u sinonazalnoj polipozi i hroničnom rinosinuzitisu. Primjena specifičnih imunohistohemijskih markera, čija je ekspresija vezana za specifične tkivne i ćelijske promjene u okviru sinonazalne polipoze markira stepen i fazu patofiziološkog procesa. Standardizacija histopatoloških procedura i analiza svjetlosnim mikroskopom čine ove metode korisnim za interpretaciju mehanizma i faze bolesti. Metodu kvantitacije mikrovaskularne gustine (MVD) prvi je predložio Weidner 1991. godine. Weidner je razvio metod za procjenu mikrovaskularne gustine u vaskularnim žarištima koristeći pan-endotelne imunohistohemijske (IHC) testove obilježavanja, antitijela CD31, CD34 i von Villebrand faktora ili kolagena tipa IV. Vaskularne vruće tačke se identifikuju svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju male snage, skeniranjem cijelog obojenog presjeka tkiva. Pojedinačni mikrosudovi se zatim broje pri uvećanju velike snage u ovim regionima [64]. Tehnika podrazumijeva određivanje broja vaskularnih prostora u tkivnoj partiji najgušće inflamacije po kvadratnom milimetru površine na skeniranim preparatima obojenim imunohistohemijskim metodama. Određivanje broja vaskularnih prostora podrazumijeva prebrojavanje obrisa zida krvnog suda obojenog rutinskom imunohistohemijom u preparatu tkiva i dobijanje broja mikro-sudova po kvadratnom milimetru [65]. Ova metoda počinje skeniranjem cijelog odjeljka pod mikroskopskim poljem male snage da bi se identifikovalo nekoliko mjesta sa najvećom gustinom krvnih sudova, nakon čega slijedi prebrojavanje pojedinačnih novih mikro-sudova pod mikroskopskim poljem velike snage. Svaki pozitivan klaster endotelnih ćelija imunoreaktivnosti u izabranom polju računa se kao pojedinačni sud, pored morfološki identifikovanih sudova sa lumenom [66]. U području najveće neovaskularizacije pojedinačni mikrosudovi su prebrojani na polju od $200\times$ (tj. $20\times$ objektivno sočivo i $10\times$ okularno sočivo; $0,7386\text{ mm}^2$ po polju) i $400\times$ polje (tj. $40\times$ objektivno sočivo i $10\times$ okularno sočivo; $0,1885\text{ mm}^2$ po polju). Svaka endotelna ćelija ili klaster endotelnih ćelija obojena u smeđu boju, koja je bila jasno odvojena od susjednih mikrosudova i drugih elemenata vezivnog tkiva smatrala se jednim, prebrojivim mikrosudom. Intenzitet bojenja je ocijenjen kao odsustvo bojenja –

vrijednost 0, slab intenzitet – vrijednost 1, umjeren intenzitet - vrijednost 2 i jak intenzitet – vrijednost 3 [64].

Ispitanicima se preoperativno procjenjuje intenzitet nazalnih simptoma na osnovu upitnika SNOT-22 (Sino-nasal outcome test-22) [prilog A] i VAS (Visual Analog Score-a) [prilog B]. Na osnovu preoperativno učinjenog pregleda paranazalnih šupljina kompjuterizovanom tomografijom u aksijalnoj, sagitalnoj i koronalnoj ravni, kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom izračunava se Lund-Mackay skor, kojim se objektivno procjenjuje stepen proširenosti bolesti u nosnoj šupljini i paranazalnim šupljinama. Lund-Mackay skor vrednuje nalaz kompjuterizovane tomografije svih paranazalnih šupljina. Različite su metode subjektivne i objektivne procjene nazalne opstrukcije. Upitnici o kvalitetu života, koji se kao subjektivna metoda, koriste za procjenu promjene simptoma, uticaja bolesti na kvalitet života i efikasnosti liječenja hroničnih bolesti. Ovi upitnici su razvijeni za procjenu opšteg zdravstvenog stanja ili za procjenu određenog kliničkog etiteta. U rinologiji se koristi nekoliko upitnika, od kojih se od 2004. godine koristi NOSE skor. Stjuart i saradnici uveli su NOSE skor kao pouzdan i adekvatan metod samoprocjene za kvantifikaciju subjektivnih tegoba koje su posljedice nazalne opstrukcije. Skala obuhvata vrijednosti od 0 do 4, pri čemu se vrijednost 0 karakteriše kao nepostojanje tegobe, dok vrijednosti 4 pripada ozbiljan problem. Upitnik obuhvata otežano disanje na nos, nazlanu opstrukciju, loš kvalitet sna, otežano disanje na nos u naporu. Kao komparativna skala ima značaj nakon hirurškog liječenja devirane nosne pregrade [67].

Subjektivna metoda za analizu simptoma kod oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa je VAS. VAS je psihometrijska skala odgovora koja se odnosi na subjektivne karakteristike, a koja je korišćena i u društvenim naukama. VAS test je skala rangirana od vrijednosti 0 do 10, u smislu gradacije nazalnih simptoma. Prema EPOS smjernicama iz 2020. godine [5], na osnovu vrijednosti dodijeljene određenom simptomu, rinosinuzitis se klasifikuje kao blag (VAS : 0-3), umjeren (VAS : > 3-7) , izražen (VAS: > 7-10) [68]. Test koji obuhvata nazalne simptome, tegobe u predjelu glave i lica, emocionalni stres i kvalitet sna sadrži dvadeset i dva pitanja, a predstavljen je kao SNOT 22. Skor ima raspon od 0 do 110, pri čemu niži skor ukazuje na bolji kvalitet života pacijenta oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa, sa ili bez polipoze. Zbog svoje opširnosti SNOT 22 se koristi u oblasti rinologije, u cilju evaluacije bolesti. Upitnik karakteriše i ekстраназални симптоми који

se odnose na poremećaj sna i promjene raspoloženja uzrokovane bolešću. Upitnik SNOT-22 predstavlja subjektivnu procjenu sinonazalnih i nekih opštih simptoma u odnosu na kvalitet života oboljelih. Ukupna vrijednost upitnika obuhvata zbir odgovora na dvadeset i dva pitanja. Pacijent rangira intenzitet navedenog simptoma vrijednostima od 0 do 5, pri čemu vrijednost 5 predstavlja maksimalno izraženu tegobu. Maksimalni zbir je 110, mada je srednja vrijednost skora za većinu populacije 30 [69.]

2. Angiogeneza

Migracija ćelija endotela je glavna karakteristika angiogeneze i sam početak u angiogeno kaskadi. Ovaj proces je posljedica ćelijske autonomne pokretljivosti ili kolektivne migracije u kojoj grupa ćelija koordinira svoje kretanje ka hemotaktičkom gradijentu. Monociti učestvuju u procesu angiogeneze i njihov migratorni potencijal je u korelaciji sa endotelnim ćelijama. Proces angiogeneze koordinišu angiogeni faktori koji regulišu proliferaciju endotelnih ćelija, remodelovanje ekstracelularnog matriksa, diferencijaciju kapilara. Faktori angiogeneze vode porijeklo od inflamatornih ćelija u fiziološkim uslovima ili tumorskih ćelija u patološki izmijenjenom tkivu. Fiziološka angiogeneza je kontrolisana odnosom proangiogenih peptida i inhibitora angiogeneze. Redukcija apoptoze koja vodi u proliferaciju osnova je tumorske angiogeneze. Veći nivoi inhibitora angiogeneze ili nedostatak proangiogenih pepetida u tkivu onemogućice stvaranje novih krvnih sudova. Proteinske molekule su prisutne kao endogeni faktori koji stimulišu proces angiogeneze. Makrofagi sintetišu VEGF, TNF- α (tumor necrosis factor – α) interleukin 8 i TSP-1 (thrombospondin-1). Fibroblastni faktor rasta – bFGF (basic fibroblast growth factor) je prvi identifikovani angiogeni faktor. Regulatori angiogeneze su kiseli fibroblastni faktor rasta – aFGF (acid fibroblast growth factor), transformišući faktor rasta α i β - TGF- α i β (transforminggrowth factor – α and β), hepatocitni faktor rasta – HGF (hepatocyte growth factor), faktor tumorske nekroze – α – TNF- α (tumor necrosis factor- α), interleukin 8 (IL-8). Ključna uloga vaskulogeneze, u fiziološkim kao i u patološkim stanjima, pripada porodici proteina nazvanih vaskularni endotelni faktori rasta – VEGF (vascular endothelial growth factor).

Angiogeneza predstavlja rast novih krvnih sudova iz postojećih krvnih sudova i proces je koji se javlja kao fiziološki, ali je prisutan i u patološkim stanjima. Promjene se uglavnom

dešavaju na kapilarama, ali može uticati i na venule. Prvi angiogeni faktor je prečišćen u Harvardskoj medicinskoj školi 1984. godine. Ekstrakciju je omogućio njegov afinitet prema heparinu. Identifikovan je kao osnovni faktor rasta fibroblasta (bFGF) i stimulisao je proliferaciju kapilarnih endotelnih ćelija [70]. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), jedan od najvažnijih angiogenih faktora, koji su 1989. godine istovremeno otkrili dr Napoleone Ferrara i dr Jean Plouet [71]. Po hemijskoj građi VEGF je identičan molekulu zvanom faktor vaskularne permeabilnosti (VPF) koji je otkrio dr Harold Dvorak šest godina ranije [72]. Prvo antiangiogeno jedinjenje pod nazivom angiostatin, otkrili su O'Reili i Folkman 1994. godine iz seruma i urina miševa koji nose tumor [73]. Fiziološka angiogeneza omogućava zarastanje rana kroz revaskularizaciju tkiva nakon povrede, obnavljanje i produkciju ćelija i tkiva tokom fizioloških stanja kao što su, sazrevanje jajne ćelije tokom ovulacije, izgradnju placente tokom trudnoće, laktaciju, formiranje masnog tkiva. Patološka angiogeneza je podjednako zastupljena i kod benignih i kod malignih promjena tkiva. Tijelo kontroliše angiogenezu kroz faktore rasta koji stimulišu angiogenezu u ravnoteži sa inhibitorima angiogeneze. Angiogeneza je mehanizam kojim se već postojeća mikrovaskularna mreža širi kao odgovor na promjenu metaboličkog i mehaničkog okruženja. Novi krvni sudovi se formiraju prorastajućom angiogenezom ili splitirajućom angiogenezom koja podrazumijeva intususceptivno i uzdužno cijepanje, elongaciju i vaskulogenezu [72]. Svaki oblik angiogeneze, podrazumijeva promjene bazalne membrane, proliferaciju endotelnih ćelija i sazrijevanje kapilara. Svi ovi procesi su kontrolisani kroz složenu ravnotežu pro i antiangiogenih faktora. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i angiopoetini su najspecifičniji za endotelne ćelije i stoga mogu imati najvažniju ulogu u angiogenezi [74]. Angiogeneza je podstaknuta i neadekvatnom oksigenacijom tkiva. Kada tkiva postaju hipoksična, nedostatak kiseonika indukuje ili potiskuje različite proangiogene ili antiangiogene supstance što uzrokuje vaskularni rast. Povećana vaskularizacija obezbjeđuje isporuku kiseonika ćelijama tkiva putem povećane površine kapilarne mreže i maksimalnog protoka krvi u tkivima, kao i smanjenjem difuzionih udaljenosti između kapilara i parenhimskih ćelija. Kada tkiva dobiju adekvatnu količinu kiseonika čak i tokom perioda izražene metaboličke aktivnosti, proangiogeni i antiangiogeni faktori se vraćaju na skoro normalne nivoe, a negativni stimulans zauzvrat, zaustavlja dalji razvoj vaskulature, čime se zatvara povratna sprega. Formiranje krvnih sudova se može ostvariti kroz proces

klijanja ili intususcepcije, odnosno rasta unutar samog sebe, poznat i kao vaskularno cijepanje. Proces dovodi do širenja kapilarne mreže i karakteriše ga lokalna vazodilatacija, povećana vaskularna permeabilnost i proliferacija ćelija. Proteolitičku degradaciju bazalne membrane prati migracija proliferišućih endotelnih ćelija u ekstracelularni matriks. Novoformirane nakupine ćelija se reorganizuju da bi formirale vaskularni lumen i da bi ostvarile kontakt sa okolnim kapilarnim segmentima. Intususceptivna angiogeneza se odvija kroz formiranje transluminalnog stuba tkiva. Pravac koji zauzimaju stubovi usmjerava intususceptivnu angiogenezu u: (1) intususceptivni mikrovaskularni rast (širenje površine kapilara), (2) intususceptivna arborizacija (preoblikovanje neorganizovane vaskularne mreže u tipičan aranžman nalik na drvo) i (3) remodelovanje intususceptivnog grananja (optimizacija lokalnog vaskularnog grananja) [75]. Hipoksija koja je prisutna u okviru inflamacije kod pacijenta oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa povećava permeabilnost epitela, narušava cilijarnu funkciju. Ekspresija faktora koji izaziva hipoksiju-1a (HIF-1a) je izražena u tkivu nazalnih polipa [76]. Adenozin je nukleotid koji se proizvodi u svim ćelijama tijela postepenom defosforilacijom ATP-a. Hipoksična tkiva proizvode adenozin iz ATP-a, a adenozin zauzvrat funkcioniše da uspostavi ravnotežu između potrebe tkiva za kiseonikom i snabdijevanja kiseonikom [77]. Adenozin akutno povećava snabdijevanje kiseonikom izazivajući vazodilataciju i povećan protok krvi prvenstveno u skeletnim mišićima i moždanom tkivu. Smatra se da adenozin ima dugoročnu ulogu u održavanju oksigenacije tkiva stimulisanjem angiogeneze. Fiziološke koncentracije adenozina proizvedene u hipoksičnim uslovima stimulišu koncentracijom zavisnu proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija dobijenih iz velikih i malih krvnih sudova. Proliferacija i migracija endotelnih ćelija su ključni koraci u procesu angiogeneze neophodni za uspostavljanje kapilarnih klica u mikrokruženju hipoksičnog tkiva gdje su nivoi adenozina najviši. Smatra se da su angiogena dejstva adenozina posredovana, njegovom sposobnošću da poveća ekspresiju VEGF [78].

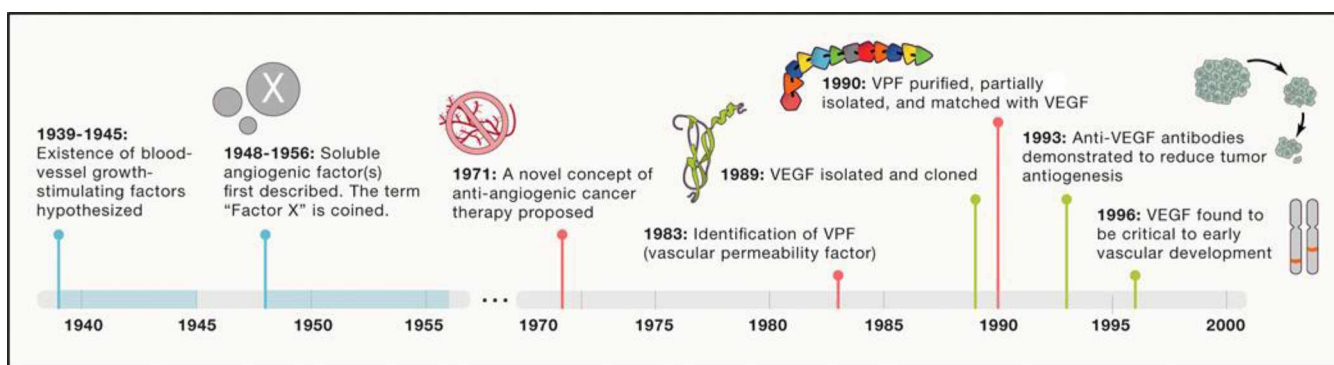
2.1. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)

VEGF je prvi put opisan 1989. godine. Značajna je njegova uloga u povećanju permeabilnosti kapilara za proteine plazme. VEGF-A, koji se češće označava kao VEGF, je najzastupljeniji tip i ima četiri izoforme, sa 121, 165, 189 i 206 aminokiselina (VEGF121, VEGF165, VEGF189 i VEGF206). VEGF-B je prisutan u srčanom i skeletnim mišićima. VEGF-C i VEGF-D su prisutni u limfangiogenezi i čine VEGF-srodne proteine [79]. Porodica VEGF ostvaruje efekte kroz vezivanje sa različitim afinitetima za receptore vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGFR). Identifikovana su tri tipa VEGF receptora (R1-R3). VEGFR-1 i VEGFR-2 su receptori visokog afiniteta za VEGF-A, dok se VEGFR-3 vezuje za VEGF-C i VEGF-D i lokalizovan je na limfnim sudovima [80]. Faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) je citokin koji remodeluje tkiva povećanjem vaskularne permeabilnosti i infiltracije leukocita, stimulišući proliferaciju vaskularnih endotelih ćelija, miocita i peharastih ćelija kao i povećanjem ekstracelularnog matriksa [81]. Prekomjerna ekspresija VEGF i njegovih receptora, VEGFR-1 i VEGFR-2, prisutna je tkivu nazalnih polipa kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom udruženim sa sinonazalnom polipozom [82]. Imunohistohemijska analiza sluznice polipa i donje nosne školjke kojom je identifikovana ekspresiju VEGF proteina i njegovog receptora VEGFR-2 ukazala je na njihovu veću zastupljenost u vaskularnom endotelu i žlijezdama tkiva polipa. Imunohistohemijska analiza sluznice nazalnih polipa, kod različitog stepena sinonazalne polipoze, ukazala je na veću ekspresiju VEGF i osnovnog fibroblastnog faktora rasta (bFGF) kod masivnije polipoze. U smislu patogeneze VEGF dovodi do edema i angiogeneze. Prisustvo VEGF proteina i VEGFR-1,2 receptora je izraženo u vaskularnom endotelu polipa, oko inflamatornih ćelija, u mukoznim žlijezdama i vaskularnom endotelu nazalne sluznice [83]. Hipoksija je stimulans za produkciju VEGF-a. Otok sluznice struktura srednjeg nosnog hodnika, koji predstavlja mjesto ušća više paranazalnih šupljina, dovodi do hipoksije na nivou sluznice odgovarajućih paranazalnih šupljina. VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 su transmembranski tirozin kinaza receptori, koje aktiviraju faktori rasta i koji ulaze u proces dimerizacije. Ligandom indukovana dimerizacija receptora pokreće signalnu transdukciju preko aktivacije autofosforilacije ili transfosforilacije susjednih receptorskih podjedinica.

Aktivacija VEGFR-1 je odgovorna za kontrolu ćelijske migracije, dok je aktivnost VEGFR-2 vezana za ćelijsku proliferaciju (slika 5.).

VEGFR-3 (Flt- 4) receptor, je identifikovan samo u endotelnim ćelijama limfnih sudova odraslih i najvjerojatnije je uključen u regulaciju procesa limfangiogeneze. Ne pokazuje afinitet za VEGF, ali ga aktiviraju VEGF-C i VEGF-D . Ekspresija VEGFR-2 perzistira i u adultnom dobu, što ukazuje da je VEGFR-2 medijator vaskulogene i angiogene aktivnosti dok aktivacija VEGFR-1 utiče na preživljavanje endotelnih ćelija. Interakcija između VEGF i VEGFR-2 je neophodna i odgovorna za proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih ćelija, permeabilnost krvnih sudova, limfangiogenezu i stimulaciju/inhibiciju imunih efektornih ćelija. VEGFR-1 i VEGFR-2 su široko rasprostranjeni na normalnom vaskularnom endotelu i povećava im se nivo u patološkoj angiogenezi indukovanoj sa VEGF-A. Smatra se da VEGFR-2 posreduje u većini angiogenih funkcija VEGF, uključujući i povećan ulazak kalcijuma, migraciju i proliferaciju endotelnih ćelija. Faktori rasta vaskularnog endotela (VEGF) su familija glikoproteina u okviru koje je do sada poznato pet proteina. VEGF-A je najznačajniji angiogeni faktor. Vezivanje za VEGFR-2 stimuliše endotelne ćelije da se razmnožavaju, migriraju i dovodi do povećanja vaskularne permeabilnosti. VEGF mRNA i protein su prisutni na sluznici donje nosne školjke ali značajno izraženiji u sluznici polipa, zahvaljujući i epitelniim ćelijama nazalnih polipa koje sekretuju VEGF [85]. Autokrini i parakrini funkcija VEGF proteina je razmatrana u okviru njegove ekspresije u vaskularnom endotelu i žlijezdama nazalnih polipa. Suprotno VEGF, insulinu sličan faktor rasta I – IGF-I (insulin - like growth factor I) ili faktor rasta iz trombocita – PDGF (platelet derived growth factor) takođe dovode do umnožavanja endotelnih ćelija, ali koje je praćeno izraženom proliferacijom fibroblasta [82]. VEGF je i faktor vaskularne permeabilnosti. Povećana propustljivost mikrovaskulature predstavlja ključni korak u procesu angiogeneze u toku zarastanja rana, pri čemu je glavna funkcija VEGF-a ekstravazacija proteina plazme, što dovodi do stvaranja ekstravaskularnog fibrinskog gela koji predstavlja osnovni supstrat za rast endotelnih ćelija [86]. VEGF dovodi do stvaranja fenestracija u endotelu malih krvnih sudova, čak i na onim mjestima na kojima endotelne ćelije obično nemaju fenestre, što za posljedicu ima povećanje permeabilnosti krvnih sudova. Inhibitorni efekat ispoljava na dendritičke ćelije u smislu inhibicije sazrijevanja nezrelih dendritičkih ćelija. Proliferacija endotelnih ćelija je omogućena stimulacijom

transporta heksoze. VEGF ima četiri glavne biološke aktivnosti koje doprinose indukciji angiogeneze: rast i proliferacija vaskularnih endotelnih ćelija, migracija vaskularnih endotelnih ćelija, preživljavanje nezrelih endotelnih ćelija putem prevencije apoptoze, povećana vaskularna permeabilnost kapilara [87]. VEGF-A ekspresija je regulisana brojnim faktorima kao što su hipoksija, citokini i faktori rasta (TGF- β), hormoni (estrogen i progesteron), dok u tumorima onkogenima i tumor supresor genima. Mikrovasularna hiperpermeabilnost dovodi do edema, zgrušavanja ekstravaziranog plazmatskog fibrinogena, formiranja proangiogenog fibrinskog gela što karakteriše patološku angiogenezu. Prostaglandin E2 stimuliše ekspresiju VEGF, što podstiče angiogenezu u nekim inflamatornim procesima. Jedan od potvrđenih promotora angiogeneze iz grupe citokina je i interleukin 6 (IL-6) [88].

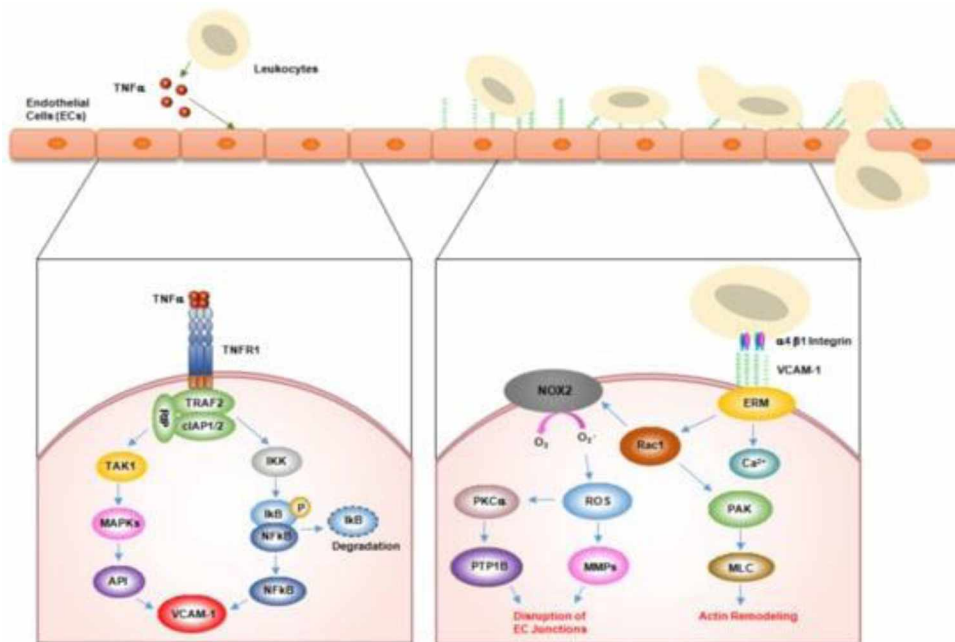


Slika 5. – hronologija postulata, identifikacije i biohemijske verifikacije vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) [84].

1975. godine Carsvell i saradnici su izolovali faktor nekroze tumora alfa (TNF α) koji pripada superfamiliji TNF liganda, produkt makrofaga, T limfocita i prirodnih ćelija ubica [89]. TNF α učestvuje u regulisanju imunoloških, hematopoetskih i proinflamatornih aktivnosti. Enzim matriks metaloproteaze TNF α -konvertujući enzim obrađuje TNF α pri čemu se dobija rastvorljivi oblik TNF- α , koji se specifično vezuje za transmembranski protein, TNF receptor 1 (TNFR1). Vezivanje TNF- α za TNFR rezultira inflamacijom, apoptozom, stvaranjem reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), proliferacijom i preživljavanjem ćelija [90]. Reaktivne vrste kiseonika (ROS) imaju dvostruku ulogu u regulaciji endotela. Na fiziološkim nivoima, ROS-indukovana signalna osa je neophodna za održavanje vaskularnog tonusa endotela, a takođe olakšava angiogenezu i akutne

inflamatorne odgovore u prisustvu patogena. Zauzvrat, prekomjerno stvaranje ROS u patološkim stanjima, odnosno inflamaciji dovodi do disfunkcije endotelne barijere u smislu povećanog permeabiliteta. Kao odgovor na štetni agens, epitelne ćelije i neutrofilu mogu direktno proizvesti ROS koji povećava permeabilnost i inflamatorni odgovor.

1989. godine VCAM-1 (CD106) je prvi put identifikovan kao glikoprotein na površini endotelnih ćelija. Ekspresiju VCAM-1 aktiviraju proinflamatorni citokini, uključujući TNF- α , a takođe i ROS, oksidovani lipoprotein niske gustine, visoka koncentracija glukoze [91]. Tokom inflamatornih odgovora, ligandi koji se vezuju za VCAM-1 na površini aktiviranih endotelnih ćelija prvo iniciraju aktivaciju fluksa kalcijuma, koji indukuje aktivaciju nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat-oksidge 2 (NADPH), što dovodi do stvaranja ROS-a. NADPH oksidge proizvodi superoksid iz kiseonika koristeći kofaktor NADPH, nakon čega slijedi dismutacija u vodonik peroksid (H_2O_2). Ovaj intracelularni H_2O_2 značajno utiče na transdukciju signala i dovodi do aktivacije matriksnih metaloproteinaza i protein kinaze Ca (PKCa). Aktivirani PKCa omogućava transendotelnu migraciju leukocita [92]. U inflamaciji TNF- α (tumorski faktor nekroze alfa), koji uglavnom potiče iz leukocita, pojačava ekspresiju VCAM-1 na površini endotelnih ćelija. Međusobno interaguju $\alpha_4\beta_1$ integrin na leukocitima i VCAM-1 na endotelnim ćelijama što dovodi do aktivacije reaktivnih forma kiseonika (ROS), influksa Ca^{++} , metaloproteinaza (MMP), protein kinaze Ca (PKCa), ispoljavajući efekat na molekule adhezije unutar spojeva endotelnih ćelija na način što omogućava leukocitima migraciju kroz epitel (slika 6.) [90].



Slika 6. - mehanizam adhezije leukocita i transendotelne migracije kroz endotelne ćelije posredovane molekulom adhezije vaskularnih ćelija-1 (VCAM-1) [90].

Angiogeneza nije moguća bez migracije endotelnih ćelija, koja je regulisana ekspresijom matriksnih metaloproteinaza (MMP). Terapija makrolidnim antibioticima je zasnovana na supresiji aktivnosti MMP, a posljedično na supresiji angiogeneze. Procjena stepena angiogeneze u okviru nosne polipoze je zahtijevna zbog hroničnih inflamatornih procesa koji dovode do remodelovanja sluznice, koji svakako obuhvata promjenu vaskularizacije tkiva. U okviru angiogeneze postoji odnos pro i antiangiogenih faktora. Ukoliko je angiogeneza osnova nazalne polipoze, promjenu u morfologiji krvnih sudova bi trebalo da prati proliferacija endotelnih ćelija. Ukoliko se polipoza razvija nezavisno od angiogeneze, krvni sudovi bi trebalo da svoju ekspanziju imaju u skladu sa metaboličkim potrebama tkiva bez većih morfoloških promjena u odnosu na neizmijenjenu sluznicu. Važan parametar je gustina kapilara u tkivu polipa, koji ukazuje na obim angiogeneze. Fibroblasti luče matriks metaloproteinaze (MMP) u inflamiranom području i omogućavaju formiranje granulacionog tkiva koje čine kolagen, glikoproteini i proteoglikani. Tokom inflamatornog odgovora, transformišući faktor rasta-b (TGF-b) koji luče makrofagi indukuje fibrozu diferencijacijom fibroblasta u aktivne miofibroblaste [93]. Miofibroblasti se odlikuju aktinskim filamentima - α -smooth muscle actin (α -SMA) u citoplazmi koji omogućavaju migraciju fibroblasta i formiranje

ekstracelularnog matriksa. Aktivirani fibroblasti luče velike količine enzima, faktora rasta i citokina koji indukuju angiogenezu i epitelizaciju. Formiranje i remodelovanje ekstracelularnog matriksa se odvija održavanjem ravnoteže između MMP i tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) koje luče nazalni fibroblasti [94]. TGF- β 1 reguliše faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF), koji indukuje angiogenezu u nazalnim fibroblastima. Povećani egzozomi u fibroblastima koji su kultivisani zajedno sa eozinofilima stimulišu sekreciju VEGF [82]. U inflamaciji, VEGF se luči iz epitelnih ćelija, fibroblasta, indukujući angiogenezu, a vaskularna permeabilnost se povećava proinflamatornim medijatorima. Prekomjerno taloženje fibrina je prisutno u eozinofilnom CRSwNP zbog neravnoteže u proteinima vezanim za fibrinolitički sistem [95]. Aktivacija trombina smanjuje ekspresiju tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i inhibira degradaciju fibrina, što dovodi do prekomjernog taloženja fibrina u tkivima. Taloženje fibrina značajno je povećano kod pacijenata sa CRSwNP, u odnosu na oboljele od CRSsNP. Povećano taloženje fibrina je povezano sa smanjenom ekspresijom tPA. Enzim tPA pretvara plazminogen u plazmin i razgrađuje fibrin. Proizvode ga epitelne ćelije, endotelne ćelije, makrofagi i fibroblasti. Kada tPA deluje kao citokin, on se vezuje za protein-1 receptor niske gustine vezan za receptor lipoproteina (LRP-1R) u fibroblastu i promovise proizvodnju kolagena i ECM [30]. Taloženja fibrina omogućava nedovoljno aktiviran plazminogen. Takvo taloženje fibrina je prisutno kod pacijenata sa eozinofilnim CRSwNP, koji karakteriše T2 inflamacija [86]. Endotelne ćelije (EC) imaju funkcije u kontroli koagulacije, trombolize, vaskularnog tonusa, permeabilnosti, inflamacije, regeneracije tkiva i angiogeneze. To je heterogena populacija ćelija čije molekularne karakteristike variraju duž vaskularnog stabla u istom organu, između različitih krvnih sudova. Najčešće korišćeni markeri imunohistohemijske ekspresije endotelnih ćelija su CD31, CD34 i von Willebrand faktor (vWF) na neizmijenjenom endotelu. CD31 je adhezivni i signalni protein od 130-kDa. Označan je kao i transmembranski glikoprotein PECAM-1 (molekul adhezije endotelnih ćelija trombocita 1). Prisutan je na površini trombocita, monocita, makrofaga i neutrofila i sastavni je dio endotelnog međućelijskog spoja. Najzastupljeniji je membranski glikoprotein koji se eksprimira na vaskularnom endotelu. Ima glavnu ulogu u kaskadi adhezije između EC i inflamatornih ćelija tokom inflamacije, u olakšavanju migracije leukocita i između EC tokom angiogeneze. Jedan je od najboljih markera za plazma ćelije, monocite i megakariocite [96]. CD31, je pan-

endotelni marker za procjenu mikrovaskularne gustine (MVD), obzirom na njegovu ulogu u angiogenezi kroz regulaciju međućelijskog spoja. CD31 se takođe eksprimira u svim hematopoetskim ćelijama i ostaje ekspimiran na elementima u krvi, osim u eritrocitima [97].

CD34 je transmembranski glikoprotein sa relativnom molekulskom masom od približno 115 kDa. Ekspimiran je u dendritskim ćelijama sluzokože, mastocitima i eozinofilima. [98]. CD34 je glikoprotein koji se eksprimira na hematopoetskim progenitorskim ćelijama, fibroblastima i vaskularnom endotelu. Najizraženiji je na nezrelim hematopoetskim ćelijama. Mali broj CD34 progenitora se nalazi u humanoj perifernoj krvi. Progenitori bazofila i eozinofila kao subpopulacija progenitora u perifernoj krvi se identifikuju kao kolonije „eozinofilnog tipa“ ili kao progenitori CD34 koji nose IL-5 receptore ili reaguju na IL-5. Izlaganje antigena kod alergijski senzibilisane osobe dovodi do povećanja progenitora inflamornih ćelija u perifernoj krvi i koštanoj srži. Epitelne ćelije i fibroblasti nazalnih polipa sekretuju različite citokine, kao i faktor matičnih ćelija koji može usmeriti sazrijevanje CD34 progenitorske ćelije do mastocita [99]

3. Eozinofili

Eozinofili nastaju u koštanoj srži kao i drugi elementi bijele krvne loze, a u krvotoku čine 1-3% bijelih krvnih ćelija. U tkivima eozinofili perzistiraju izvan koštane srži i krvnih sudova: u organima gastrointestinalnog i respiratornog trakta, slezine i limfnih čvorova. Kod alergijskih stanja prisutni su plućima i jednjaku. Životni vijek u cirkulaciji je 8-12 časova, dok u tkivima mogu perzistirati 8-12 dana u odsustvu stimulacije [100]. Njihova morfološka karakteristika su citoplazmatske granule ispunjene katjonskim proteinima. Inicijalni kontakt cirkulišućih eozinofila sa zidom krvnih sudova prije ekstravazacije omogućavaju selektini. Reverzibilna adhezija između selektina i njihovih liganda omogućava eozinofilima da se polako kreću duž vaskularnog endotela. Ekspresija E- i P-selektina na endotelnim ćelijama može biti pojačana IL-1 i TNF-a, dok je L-selektin konstantno ekspimiran na eozinofilima. IL-8 može izazvati prolazno zaustavljanje pokrenutih eozinofila, a eotaksin može trajno zaustaviti kretanje eozinofila [101]. Molekuli koji su najvažniji za čvrstu adheziju eozinofila za endotelne ćelije su CD11b/CD18 i VLA-4 na eozinofilima, a njihovi ligandi molekul intercelularne adhezije

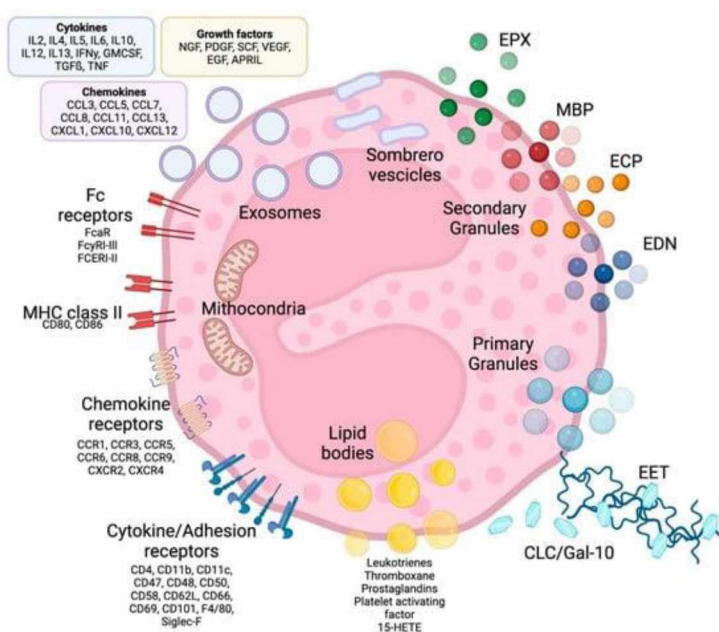
(ICAM)-1 i molekul adhezije vaskularnih ćelija (VCAM)-1 na endotelnim ćelijama. Ekspresiju molekula adhezije stimulišu citokini. IL-1 i TNF-a indukuju ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1 na endotelnim ćelijama. Neki citokini su selektivni induktori za određene molekule adhezije, kao što su IL-4 za VCAM-1 i IFN-g za ICAM-1. IFN-g takođe stimuliše ekspresiju galektina-9 u humanim fibroblastima, molekula koji omogućava adheziju eozinofila na ovim ćelijama. Migracija eozinofila je indukovana sa IL-3, IL-5 ili GM-CSF [102]. Ekspresija VCAM-1 i ICAM-1 na endotelnoj ćeliji je neophodna za transmigraciju eozinofila. IL-4-stimulisane endotelne ćelije proizvode eotaksin-3, koji kada se eksprimira na površini endotelne ćelije podržava transmigraciju eozinofila kroz ćelijski sloj. Eozinofili zatim migriraju u tkivo kao odgovor na hemotaktičke faktore proizvedene lokalno na mjestu inflamacije. Ova migracija je kretanje usmjereno ka gradijentima hemoatraktanta, a karakteriše je adhezija za proteine ekstracelularnog matriksa. Hemokini kao što je eotaksin-2 olakšavaju odvajanje od luminalnog VCAM-1 [103]. Kao odgovor na hemoatraktant, koncentracija citoplazmatskog Ca^{2++} raste i ćelija prolazi kroz polarizaciju. Ravan nastavak citoplazme, nazvan lamelipod, formira se na prednjoj strani pokretne ćelije, a rep koji se zove uropod se formira na zadnjem kraju. Jedro se nalazi bliže zadnjem nego prednjem dijelu. U polarizovanim ćelijama za kretanje uvijek postoji gradijent kalcijuma sa većom koncentracijom Ca^{2++} u repu nego u prednjem dijelu ćelije. Kada se ćelije kreću, intracelularna koncentracija Ca^{2++} raste prolazno, a zatim najbrže pada prilikom promjene pravca kretanja. Ovi Ca^{2++} zavisni signali potiču iz unutrašnjih zaliha Ca^{2++} oslobođenih kao odgovor na inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3). Diacilglicerol (DAG), koji se proizvodi zajedno sa IP3 i ima inhibitorni efekat na Ca^{2++} signale. Eozinofil se kreće tako što produžava lamelipod kojim prijanja za podlogu i sužava uropod dok se odvaja od podloge. Aktinski sistem omogućava kretanje ćelije, a polimerizacija i depolimerizacija aktina obezbjeđuju ćeliji kontraktilnost [104].

IL-3, IL-5, IL-13 i GM-CSF su prepoznati kao aktivatori funkcije eozinofila, uključujući migraciju. Hemokini kao što su eotaksin, eotaksin-2 i -3 RANTES i IL-8 su hemoatraktanti eozinofila. Hemokini se vezuju za intracelularni matriks preko adhezije za proteoglikane. Na ovaj način se formira fiksni gradijent hemokina unutar tkiva. Albumin je neophodan za migraciju eozinofila ka hemotaktičkim faktorima niske molekularne težine, kao što su citokini. Albumin je aktivno uključen u funkciju eozinofila

indukujući intracelularnu signalizaciju putem puta zavisnog od PI3 kinaze, stimulacije koja takođe može pokrenuti odgovor eozinofila na hemotaktičke faktore. Interakcija eozinofila sa albuminom dovodi do morfoloških promjena i većeg stepena degranulacije nakon stimulacije citokinom. Eozinofili su bijela krvna zrnca koja predstavljaju citotoksične efektorske ćelije, koje imaju imunomodulatorne i homeostatske funkcije [105]. Prisustvo granula u citoplazmi je karakteristika granulocita, koji predstavljaju podtip leukocita, uključujući neutrofile, eozinofile i bazofile. Eozinofilne granule se sastoje uglavnom od citotoksičnih katjonskih proteina, uz prisustvo citokina i hemokina. Nastaju iz hematopoetskih CD34+ matičnih ćelija kroz diferencijaciju, a nakon napuštanja koštane srži ne dolazi do dalje diobe ćelije. U okviru diferencijacije eozinofila specifična je sinteza glavnog osnovnog proteina (MBP), neurotoksina izvedenog iz eozinofila (EDN), eozinofilne peroksidaze (EPO), Charcot-Leiden kristalnog (CLC) proteina, CC hemokin receptor 3 (CCR3) i interleukin-5 receptorskog alfa (IL-5Ra) lanca [101]. Kao multifunkcionalni leukociti, uključeni su u patogenezu inflamatornog odgovora, preventivno kod alergijski senzibilisanih osoba i infekcije uzrokovane parazitskim helmintima. MBP omogućava ulazak tečnosti unutar ćelije i time doprinosi formiranju edema sluznice. MBP izražava dejstvo na način što indukuje ulazak natrijuma kroz epitel nazalne sluznice. Eozinofilni katjonski protein (ECP) stimuliše sekreciju mukusa i pokazatelj je eozinofilne degranulacije. Lipidna tijela sadrže prostaglandine, tromboksan i leukotriene, koji učestvuju u alergijskoj inflamaciji, fibrozi i trombozi. Eozinofili oslobađaju egzosome koji se spajaju sa ćelijskom membranom i dovode do oštećenja epitela. Eozinofilija kao inflamatorni infiltrat je svakako prisutna i u oblicima sinozalne polipoze bez preosjetljivosti na nesteroidne antiinflamatorne lijekove (NSAIL). Međutim, značajno veći nivo ECP u odnosu na broj samih eozinofila ukazuje na njihovu izraženu aktivnost u AERD. Neke gljive, patogeni i zagađivači prisutni u životnoj sredini su sposobni da izazovu aktivaciju eozinofila. Aktivnosti aspartat proteaze koje luči *Alternaria* indukuju aktivaciju i degranulaciju humanih eozinofila preko receptora-2 aktiviranog proteazom eksprimiranih na ćelijama. Ekstrakt *Dermatophagoides farinae* i njegov glavni alergen *Derf 1* direktno indukuje adheziju, degranulaciju i oslobađanje specifičnog proteina granula eozinofila [106, 68].

Karakteristika polipoze jeste transednotelijalna migracija i produžen život eozinofila u tkivu polipa, koji su uzrokovani koncentracijom IL-5. IL-5 dominantno sekretuju T

limfociti. Prostaglandin E2 ima značajno antiinflamatorno dejstvo, a najmanje koncentracije su uočene kod pacijenata preosjetljivih na acetil-salicilnu kiselinu, oboljelih od bronijalne astme i sinonazalne polipoze. Takođe, enterotoksin *Staphylococcus aureus* indukuje produkciju IL-5 koji dovodi do aktivacije eozinofila. TNF- α je produkt i makrofaga i T limfocita, koji stimulira produkciju VCAM-1 od strane fibroblasta nazalne sluznice. Povećana koncentracija TNF- α u tkivu nazalnih polipa akumulira eozinofile i limfocite u tkivu polipa preko VCAM-1 koji eksprimira endotel. Već prisutni eozinofili imaju sposobnost da produkuju TNF- α čime se ostvaruje obilan eozinofilni infiltrat u okviru inflamatornog infiltrata (slika 7.).



Slika 7. struktura eozinofila, granule, površinski receptori, egzozomi i EET [107]. Eozinofili posjeduju veliki broj proteina, receptora i enzima koji im omogućavaju interakciju sa mikrookruženjem. Ekspimiraju brojne receptore na svojoj površini, uključujući receptore za citokine, hemokine i lipidne medijatore, koji su uključeni u rast ćelije, opstanak, adheziju, migraciju i aktivaciju.

Skraćenice: CLC/Gal-10 - Charcot-Leiden kristalni proteini, ECP - eozinofilni katjonski protein, MBP - glavni osnovni protein, EPKS - eozinofilna peroksidaza, EDN - neurotoksin izveden iz eozinofila, MHC klasa II - kompleks histokompatibilnosti Major-II, EET - eozinofilne ekstracelularne zamke.

Leukotrieni su porodica inflamatornih lipidnih medijatora koje iz arahidonske kiseline sintetišu eozinofili, mastociti, makrofagi, neutrofil i bazofili. Leukotrieni C4 (LTC₄), D4 (LTD₄) i E4 (LTE₄) označeni su kao CysLTs zbog prisustva ostatka cisteina. U neutrofilima, monocitima, eozinofilima, mastocitima i bazofilima, arahidonska kiselina se oksiduje pomoću 5-lipoksigenaze (5-LO) da bi se proizveo nestabilan metabolit, leukotrien A₄ (LTA₄). U monocitima, mastocitima, eozinofilima i bazofilima, LTA₄ nakon konjugacije sa glutationom se zatim konvertuje u LTC₄ pomoću leukotrien C₄ sintaze (LTC₄S). Iz LTC₄ se ekstracelularno formira LTD₄ i njegov stabilan metabolit, LTE₄. LTC₄, LTD₄ i LTE₄ su snažni bronhokonstriktori kod ljudi [108]. Razlog za prekomjernu proizvodnju CysLT je povezan sa smanjenjem nivoa prostaglandina E₂ (PGE₂) u uzorcima nazalnog tkiva uključujući polipe u nosu. Nizak nivo PGE₂ doprinosi pomjeranju puta metabolizma arahidonske kiseline ka sintezi leukotriena. Na značaj mastocita u inflamaciji sluznice disajnog puta kod pacijenta sa preosjetljivošću na NSAIL ukazuju povišene vrijednosti prostaglandina D₂. Smanjena ekspresija mRNK COX-2 u tkivu nazalnih polipa, epitelnih ćelija i fibroblasta dovodi do smanjene produkcije prostaglandina E₂ što vodi do sublimiranog antiinflamatornog odgovora. Povećana ekspresija receptora za leukotrijene tip 1 uz produkciju cistenil leukotrijena i enzima uključenih u njihovu sintezu (5-lipooksigenaze i leukotrien C₄ sintetaze) dovodi do izraženog efekta leukotrijena na sluznici pacijenta preosjetljivih na NSAIL. Smanjena produkcija lipoksina A₄ u tkivu nazalnih polipa upućuje na poremećaj metabolizma arahidonske kiseline. Proliferacija i duže preživljavanje eozinofila u tkivu nosnih polipa uočena je uz povećanu koncentraciju Ig-E antitijela na enterotoksin *Staphylococcus aureus* kod pacijenata sa preosjetljivošću na NSAIL [109]. IL-3 indukuje produkciju monocita, megakariocita, neutrofila, eozinofila i bazofila. IL-5 je zadužen za diferencijaciju i usmjeravanje u sistemska cirkulaciju eozinofila nastalih iz pluripotentnih ćelija kostne srži. Makrofagi, endotelne ćelije, mast ćelije pa i sami eozinofili proizvode trombotični aktivirajući faktor (PAF) koji potencira migraciju eozinofila u odnosu na neutrofile kod atopičara. Eozinofili su najprisutniji u sluznicama organa izloženih spoljašnjoj sredini, prije svega organa disajnog i digestivnog sistema. Prostaglandin D₂ koji proizvode mast ćelije u sklopu alergijske reakcije, uzrokuje degranulaciju i morfološke promjene eozinofila. Prilikom degranulacije dolazi do oslobađanja glavnog osnovnog proteina (MBP-1 i MBP-2), neurotoksina dobijenog iz

eozinofila (EDN) , eozinofilnog katjonskog proteina (ECP). Eozinofilna peroksidaza indukuje produkciju hipohlorne ili hipobromne kiseline, koja je veoma toksična za patogene- parazite, ali na isti način dovodi do oštećenja sluznice i tkiva u okviru alergijske reakcije ili oboljenja sinonazalne sluznice. Produkti degranulisanih eozinofila su i leukotrijeni i prostaglandini.

Leukotrijeni su definisani u kasnim sedamdesetim godinama prošlog vijeka, kao lipidni zapaljenski medijatori nastali od arahidonske kiseline. LTC₄, LTD₄ i LTE₄ pripadaju grupi cistenil leukotrijena koji svoje efekte ispoljavaju preko aktivacije dvije vrste receptora CysLT1 i CysLT2, koji su prisutni na krvnim sudovima, zapaljenskim ćelijama i nazalnim submukoznim žlijezdama. Za CysLT1 receptor najveći afinitet ima LTD₄, dok se za LTC₄ i LTD₄ jednako vezuju za CysLT2. Rezultat ove interakcije je nazalna kongestija kao posljedica dilatacije krvnih sudova, njihove propustljivosti i posljedičnog edema sluznice, pojačana nazalna sekrecija uzrokovana povećanom produkcijom mukusa, povlačenje inflamatornih ćelija iz cirkulacije koje održavaju inflamaciju. Mast ćelije i bazofili u najvećoj mjeri produkuju cistenil leukotrijene. Eozinofili pacijenata oboljelih od AERD produkuju značajno više leukotrijena u odnosu na eozinofile zdravih pojedinaca [110]. Cistenil leukotrijeni (CysLTs) ispoljavaju proinflamatorni i profibrotički efekat na respiratornom traktu, uzrokujući bronhokonstrikciju, potencirajući eozinofilnu inflamaciju i ektravazaciju tečnosti kroz interakciju sa njihovim specifičnim receptorima. Sluznicu pacijenta oboljelih od AERD karakteriše povećana ekspresija CysLTs receptora (CysLTR1 i CysLTR2) u poređenju sa drugim formama hroničnog sinusinuzitisa. Postoji povećana ekspresija enzima leukotrien C4 sintaza (LTC₄S), koji omogućava sintezu CysLTs u AERD [111].

CysLT2 receptori su široko rasprostranjeni u moždanom tkivu, srčanom mišiću, krvnim sudovima i leukocitima. Povećane vrijednosti cistenil leukotrijena su potvrđene u nazalnom sekretu nakon izlaganja hladnom, suvom vazduhu, najvjerojatnije kao posljedica degranulacije mast ćelija. Dendritične ćelije su značajne antigen prezentujuće ćelije, koje ispoljavaju CysLT1 receptor i produkuju cisteinil leukotrijene, koji opet regulišu produkciju interleukina IL-10, IL-12, IL-5 i interferona - γ . IL-3, IL-5 stimuliše sintezu CysLT u eozinofilima, bazofilima i T limfocitima. IL-5 je značajan u inhibiciji apoptoze eozinofila, njihovoj aktivaciji i akumulaciji u tkivima. Receptor visokog afiniteta za IL-5 (IL-5R) se nalazi na eozinofilima i bazofilima [112]. Prostaglandin E₂

(PGE₂) ima antiinflamatorni efekat kroz inhibiciju degranulacije mastocita, inhibiciju aktivacije eozinofila, kao i inhibiciju lipooksigenaze (5LO), čime se prekida transformacija arahidnoske kiseline u CysLT. Antiinflamatorni efekat PGE₂ se ispoljava i kroz smanjenu vazodilatataciju, poslijedično i smanjenu vaskularnu permeabilnost. Preko svog EP2 receptora PGE₂ blokira degranulaciju mastocita, ograničava migraciju eozinofila i inhibira alergenom stimulirano oslobađanje inflamatornih medijatora koji potiču od mastocita uključujući PGD₂. Pacijenti sa AERD imaju smanjen nivo PGE₂, COX2 i EP2 receptora u fibroblastima i sinonazalnom tkivu, nizak nivo EP2 receptora u neutrofilima, mastocitima, eozinofilima i T- ćelijama, u poređenju sa pacijentima tolerantnim na aspirin, sa sinonazalnom polipozom [113]. Smanjena ekspresija PGE₂ omogućava povećane nivoe PGD₂ i leukotrijena [114].

PGD₂ je strukturni izomer PGE₂. Identifikovana su dva enzima u sintezi PGD₂ koji se zovu hematopoetska prostaglandin D sintaza (H-PGDS) i lipokalinskog tipa sintetaza (L-PGDS). H-PGDS je prisutan u okviru produkcije PGD₂ u mastocitima i drugim srodnim tkivima, posebno kod osoba sa AERD, dok je L-PGDS najviše izražen u centralnom nervnom sistemu. PGD₂ aktivira eozinofile, bazofile kroz homologni molekul hemoatraktantnog receptora eksprimiran na T2 limfocitima (CRTH2) [115,116]. Iako se smatralo da je dominantni odgovor u AERD vezan citokine T2 imunskog odgovora, izražena ekspresija IFN- γ i IL-4 porijeklom iz eozinofila ukazuju na učešće i T1 i T2 imunskog odgovora. IL-4 i IFN- γ povećavaju ekspresiju receptora cistenil leukotrijena (CysLTR1 i CysLTR2) u mononuklearnim ćelijama i granulocitima. Zanimljivo je da i IFN- γ favorizuje sazrijevanje eozinofila, dok IL-4 inhibira COX-2 [117]. LTA₄ nastaje iz arahidnoske kiseline dejstvom 5-lipooksigenaze. LTB₄ nastaje iz LTA₄ u neutrofilima i eozinofilima dejstvom LTA₄ hidrolaze. LTB₄ je proinflamatorni lipidni medijator, hemoatraktant za eozinofile, monocite, makrofage i neutrofile. Formiranje različitih granula eozinofila karakteriše razvoj i sazrijevanje eozinofila. Charcot-Leiden kristalni protein (CLC, koji se obilježava i kao galektin 10) i eozinofil peroksidaza (EPKS, takođe poznat kao EPO) nalaze se u primarnim granulama eozinofila [105]. Specifične eozinofilne granule sadrže četiri katjonska proteina — glavni bazični protein (MBP-1), eozinofilnu peroksidazu (EPX), eozinofilni katjonski protein (ECP) i neurotoksin dobijen iz eozinofila (EDN) — kao i brojne prethodno formirane citokine i hemokine [101]. Eotaksini omogućavaju migraciju eozinofila na mjesto inflamacije. Degranulacija

eozinofila je osnova patološkog susprata alergijskih i nealergijskih inflamatornih oboljenja. Oslobođanje sadržaja granula je moguće djelimičnom degranulacijom (PMD), citolizom, klasičnom i složenom egzocitozom. PMD karakteriše progresivno i selektivno oslobođanje sadržaja granula uz pomoć malih vezikula u odsustvu fuzije sa drugim granulama ili plazma membranom [118]. Tokom citolize, intaktne granule se oslobađaju nakon ruptуре plazma membrane. Sadržaj proteinskih granula uključuje glavni osnovni protein 1 (MBP1), koji povećanjem ekspresije epitelnog transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β) i matriksne metaloproteinaze-1 (MMP-1) u lamini propriji dovodi do subepitelne fibroze [119,120]. Glavni osnovni protein 1 (MBP-1) je katjonski protein uskladišten u kristalnom jezgru sekundarne granule eozinofila. N-terminalni domen definiše formu MBP-1 kao pre-protein kome nedostaje toksičnost. C-terminalni region kristališe da bi spriječio intracelularnu toksičnost kada se pro-MBP-1 cijepa, nakon sazrijevanja granula. Aktivacija eozinofila smanjuje pH unutar granula što dovodi do razgradnje kristalnog jezgra i oslobođanja MBP-1 kao aktivnog citotoksičnog proteina. Oštećenje izazvano MBP-1 nije selektivno, stoga je usmjereno na patogene i na ćelije domaćina. MBP-1 stimuliše proizvodnju proinflamatornog citokina IL-8 [101]. Antitijelo na humani eozinofilni glavni osnovni protein, klon BMK-13, prepoznaje glavni osnovni protein eozinofila (MBP), protein od 117 aminokisjelina, koji odgovara ostacima 106-222 proteoglikana koštane srži (prekursora). BMK-13 je pan-eozinofilni marker u presjecima tkiva u parafinu. BMK-13 se vezuje za eozinofile u tkivu ugrađenom u parafin. Preporučuje se razblaživanje 1:30 u PBS-u – Buffer PBS, 0.1% BSA. Vrijeme inkubacije je jedan sat na sobnoj temperaturi. Enzimski predtretman je neophodan. BMK-13 boji intracelularne, uskladištene proteine [121].

4. Ciljevi istraživanja i hipoteze

4.1. Ciljevi istraživanja:

1. Na osnovu rezultata patohistološke i imunohistohemijske analize uporediti i procijeniti stepen povezanosti intenziteta inflamatorne infiltracije epitela i subepitela (lamine proprije) i vaskularizacije subepitela kod pacijenata sa različitim formama hroničnog rinosinuzitisa u odnosu na zdrave ispitanike.

2. Procijeniti nivo korelacije imunohistohemijskih i kliničkih parametara koji ukazuju na stepen proširenosti hroničnog zapaljenja.

4.2. Hipoteze istraživanja:

1. Pacijenti sa Samterovim trijasom (AERD) imaju veći stepen vaskularizacije lamine proprije i intenzivniju inflamatornu infiltraciju epitela i subepitela u odnosu na ostale grupe ispitanika.
2. Postoji pozitivna korelacija između stepena vaskularizacije i inflamatorne infiltracije u lamini propriji sa jedne i kliničkih pokazatelja težine hroničnog rinosinuzitisa sa druge strane.

5. Materijal i metode

5.1. Prikaz studije i selekcija pacijenata

Istraživanje predstavlja prospektivnu studiju presjeka, kojom su obuhvaćena devedeset i četiri ispitanika, sprovedenu u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je sprovedeno je u Klinici za otorinolaringologiju i Institutu za patologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, u periodu od marta 2020. do oktobra 2022. godine. Protokol i metode studije su odobreni odlukom Etičkog komiteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu (IRB odobrenje br. 21/2022), kao i odlukom Komiteta za medicinsku etiku i bioetiku Medicinskog fakulteta Univerzita Crne Gore (odluka broj 381/2 od 04.03.2022. godine). Svi ispitanici koji su studijom obuhvaćeni su prethodno dali pisani informativni pristanak. Istraživanjem su obuhvaćeni pacijenti kod kojih je dijagnostikovao hronični rinosinuzitis u skladu sa Evropskim pozicionim dokumentom o rinosinuzitisu i nazalnim polipima (EPOS) 2020 [5]. Svi ispitanici su hirurški liječeni u Klinici za otorinolaringologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, u periodu trajanja studije. Pacijenti oboljeli od hroničnog rinosinuzitisa su podijeljeni u tri grupe u zavisnosti od kliničke manifestacije bolesti. Dvije osnovne grupe pacijenata su pacijenati koji su bili bez sinonazalne polipoze (CRSsNP) i ispitanici sa polipozom (CRSwNP). Među pacijentima sa polipozom izdvojili smo grupu pacijenata sa AERD. Kriterijumi za uključivanje

pacijenata sa AERD bili su dijagnoza CRSwNP, blaga perzistentna astma, potvrđena od strane pulmologa i podaci iz historije bolesti o pogoršanju respiratornih simptoma nakon uzimanja nekog od NSAIL. Ostali pacijenti sa CRS su bili bez astme i bez preosetljivosti na NSAIL. Kontrolnu grupu činili su ispitanici bez simptoma i znakova inflamacije nazalne sluznice, kod kojih je indikovano hirurško liječenje nazalne opstrukcije uzrokovane pneumatizacijom srednje nosne školjke (concha bullosa). Svi pacijenti su preoperativno bodovani prema intenzitetu nazalnih/sinusnih simptoma i procjeni kvaliteta života, dok su pacijenti sa CRS dodatno bodovani prema stepenu bolesti evidentiranom radiološki, kompjuterizovanom tomografijom (CT) paranazalnih šupljina, prema Lund-Mackay skoru (LMS).

Radiološka dijagnostika u vidu CT pregleda je neophodna u cilju planiranja hirurškog liječenja, utvrđivanja anatomskih varijacija, postavljanja dijagnoze akutnog ili hroničnog oboljenja. Odnos između nalaza evidentiranog CT skenom i simptoma koje pacijent navodi je različit, samim tim nalaz CT pregleda je neophodan u cilju postoperativnog praćenja ili objektivnog ocjenjivanja stadijuma bolesti. Lund-Mackay skor predstavlja vrijednost koja je rezultat sistema bodovanja nalaza dobijenog CT pregledom paranazalnih šupljina. CT pregled paranazalnih šupljina je učinjen u aksijalnoj, koronalnoj i sagitalnoj ravni. Promjene sluznice paranazalnih sinusa se kvantifikuju korišćenjem Lund-Mackay skora, koji ocenjuje svaku paranazalnu šupljinu pojedinačno : prednje etmoidalne ćelije, zadnje etmoidalne ćelije, maksilarni, frontalni i sfenoidalni sinus. Intenzitet zasjenčenosti parnazalne šupljine na CT snimku se kvantifikuje vrijednostima 0, kada nema radiološki vidljivih promjena paranazalnih šupljina, 1 pridutna je djelimična zasjenčenost paranazalne šupljine, dok vrijednost 2 ukazuje potpunu zasjenčenost [122]. Ostiomeatalni kompleks se ocenjuje vrijednostima 0 kada nije okludiran ili vrijednošću 2 kada je okludiran. Rezultati za desnu i za lijevu stranu se sabiraju. Ukupan, zbirni Lund-Mackay skor je u rasponu od 0 do 24 [123]. Pacijenti koji navode osjećaj bola u predjelu lica, koji odgovara paranazalnim šupljinama, nazalanu opstrukciju, postnazalno slivanje sa različitim stepenom oflaktorne disfunkcije, imaju značajnu korelaciju sa vrijednostima Lund-Mackay skora koji prati promjenu intenziteta kliničkih simptoma[124]. Vrijednost Lund-Mackay skora kod pacijenta oboljelih od hroničnog rinosinuzitisa korelira sa očekivanim modalitetom liječenja. Veće vrijednosti skora su prisutne kod hirurški liječenih pacijenata. Kod pacijenta bez sinonazalne

polipoze skor je značajno niži. Vrijednost Lund-Mackay skora može biti pokazatelj težine kliničkih simptoma i kvaliteta života pacijenta [125]. Za procjenu intenziteta simptoma korišćen je Visual Analogue Score (VAS). Pacijenti su procjenjivali simptome postavljanjem vertikalne oznake na skali od 0 do 10 cm u zavisnosti od težine navedenih simptoma. Vrijednost 0 označava da nema simptoma, gradacijski do vrijednosti 10 koja ukazuje na maksimalni intenzitet simptoma. Upitnik sadrži odgovore za 18 simptoma : glavobolja, začepljenje nosa, nazalni iscjedak, postnazalni iscjedak, oštećeno čulo mirisa, punoća lica, zubobolja, bol u licu/pritisak, epifora, kašalj, krvarenje iz nosa, zadržavanje suvog sekreta u nosu, opšte zdravstveno stanje, umor, groznica, mučnina, povraćanje, tečne stolice. Sedam simptoma od navedenih je uključeno u konačni rezultat, koji je evaluiran u okviru ove studije : nazalna opstrukcija, sekrecija iz nosa, postnazalni sekret, osjećaj punoće u predjelu paranazalnih šupljina, oslabljeno čulo mirisa, glavobolja [126]. Da bismo procijenili kvalitet života, korišćen je upitnik sino-nazalnog ishoda 22 (SNOT-22). SNOT-22 obuhvata širok spektar tegoba i simptoma koje se odnose na kvalitet života, uključujući fizičke tegobe, funkcionalna ograničenja i emocionalne posljedice. Upitnik nudi odgovore za 22 simptoma: potreba za izduvavanjem nosa, kihanje, sekrecija iz nosa, začepljenost nosa, gubitak mirisa ili ukusa, kašalj, postnazalno slivanje sekreta, gusti iscjedak iz nosa, punoća uva, vrtoglavica, bol u uhu, bol/pritisak u predjelu lica, teškoće prilikom spavanja, buđenje noću, nedostatak dobrog sna, osjećaj umora nakon buđenja, umor, smanjena produktivnost, smanjena koncentracija, frustracija/nemir/iritacija, tuga, stid. Pacijenti daju odgovor birajući vrijednost u zavisnosti od težine simptoma: 0 – tegoba/ problem ne postoji, 1 – veoma blaga tegoba, 2 – blaga tegoba, 3 – umjerena tegoba, 4 – ozbiljana tegoba i 5 – izuzetno ozbiljana tegoba. Upitnik podrazumijeva subjektivnu ocjenu navedenih simptoma u ukupnoj vrijednosti od 0-110, sa većim rezultatima kod izraženijeg uticaja tegoba na kvalitet života. [126,127,128].

5.2. Kriterijumi za uključivanje u studiju

Osim kontrole grupe koju čine ispitanici kojima je indikovano hirurško liječenje u cilju korekcije anatomskih struktura nosne šupljine, svi ostali ispitanici su pacijenti oboljeli od hroničnog rinosinuzitisa. Dvije grupe čine pacijenati kod kojih je klinički i radiološki dijagnostikovana sinonazalna polipoza, od kojih će kod jedne nazalna polipoza biti

udružena sa preosjetljivosti na NSAIL, dok treću grupu čine oboljeli od hroničnog rinosinuzitisa bez sinonazalne polipoze. Dijagnoza hroničnog rinosinuzitisa je postavljena u skladu sa kriterijumima objavljenim u dokumentu EPOS 2020 (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps) 2020 [5].

5.3. Kriterijumi za isključivanje iz studije

Osobe mlađe od osamnaest i starije od šezdeset i pet godina života, trudnice, dojilje, pacijenti sa sistemskim bolestima koje zahvataju nosnu šupljinu i paranazalne sinuse (Wegenerova granulomatoza sa poliangiitisom, Churg-Strauss-ov sindrom, Young sindrom), pacijenti sa hoanalnim polipima i hamartomima nosne šupljine, oboljeli od hroničnog gljivičnog rinosinuzitisa, pacijenti sa urođenim poremećajem mukocilijarnog transporta (cistična fibroza, primarna cilijarna diskinezija), pušači, pacijenti sa prethodnim operacijama paranazalnih sinusa, ispitanici koji su uzimali topikalne i/ili sistemske kortikosteroide, antihistaminike i antibiotike unutar mjesec dana prije početka istraživanja.

5.4. Varijable koje se mjere u studiji

Nezavisne varijable koje se utvrđuju su dijagnoza hroničnog rinosinuzitisa, prisustvo/odsustvo nazalnih polipa, udruženost hroničnog rinosinuzitisa sa preosetljivošću na NSAIL.

Zavisne varijable koje se mere su stepen imunoekspresije molekula CD31, CD34 i BMK-13 u uzorcima tkiva pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom, kao i zdravih ispitanika, intenzitet nosnih simptoma (skor nosnih simptoma), stepen inflamacije procijenjen na osnovu analize CT pregleda paranazalnih šupljina.

5.5. Opis procedura

Svi pacijenti obuhvaćeni studijom su hirurški liječeni u uslovima opšte endotrahealne anestezije. Uzorci tkiva polipa kod pacijenata sa CRSwNP/AERD, kao i hipertrofične sluznice pacijenata sa CRSsNP, uzeti su iz etmoidalnog labirinta tokom endoskopske

operacije sinusa (FESS). Uzorci tkiva nazalne sluzokože kontrolnih subjekata uzeti su lateralnom resekcijom pneumatizovane srednje nosne školjke (concha bullosa). Uzorci tkiva su fiksirani 24 sata u 4% puferovanom rastvoru formaldehida. Zatim su isprani vodom i dehidrirani koncentrovanim etanolom (70% do apsolutnog), a potom tretirani ksilelom i ubačeni u parafin. Parafinski blokovi su isječeni na debljinu od 3-5 mikrometara. Sekcije su obojene hematoksilinom i eozinom (H&E). Imunohistohemijsko bojenje je uključivalo deparafinizaciju nakon sječenja djelova od 3-4 mikrometra od parafinskog kalupa i sušenje nakon potatjanja u ksilenu, alkoholu i destilovanoj vodi. Deparafinisani djelovi su zagrijevani dva puta po pet minuta u mikrotalasnoj pećnici u kiveri sa 250 mL rastvora citratnog pufera (10 mmol/L). Nakon toga su hladjeni u citratnom puferisanom rastvoru na sobnoj temperaturi trideset minuta i dva puta isprani destilovanom vodom po trideset sekundi. Slijedeća faza uključuje blokiranje endogene peroksidaze na način što su djelovi tkiva natopljeni 3% vodonik peroksidom u trajanju od pet minuta; zatim isprani destilovanom vodom, prekriven fosfatnim puferom tri puta u trajanju od po dva minuta.

Imunohistohemijsko bojenje za MBP izvršeno je humanim BMK13 antitijelima (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Teksas, SAD), dok je bojenje za CD31 i CD34 izvršeno humanim anti-CD31 i anti-CD34 antitijelima (Elabscience, Houston, Teksas, SAD). Analiza imunohistohemijskih bojenja urađena je digitalnim svjetlosnim mikroskopom. Dobijeni skor imunološke reaktivnosti je upoređen u odnosu na grupe pacijenata sa CRS i u odnosu na kontrolnu grupu. Imunoreaktivnost BMK-13 je zabilježena kao bojenje degranulisanih eozinofila, i to: stepen 0 bez pozitivnih ćelija, stepen 1 - malo pozitivnih ćelija (manje od 5 ćelija), stepen 2 - umjeren broj pozitivnih ćelija (5-10 ćelija), stepen 3 - umjeren broj pojedinačnih i grupisanih ćelija (5-10 pojedinačnih i grupisanih ćelija), stepen 4- veliki broj pozitivnih ćelija, uključujući grupisane ćelije (više od 10 ćelija) [129]. Pozitivna imunoreaktivnost na CD31 i CD34 je zabilježena kao bojenje membrane endotelnih ćelija u kontinuitetu lumena vaskularnog prostora.

Metoda kvantifikacije mikrovaskularne gustine podrazumijeva određivanje broja vaskularnih prostora u dijelu tkiva po kvadratnom milimetru površine, na skeniranim preparatima obojenim imunohistohemijskim metodama. Ova metoda uključuje početno skeniranje čitavog odjeljka pod mikroskopskim poljem male snage da bi se identifikovalo nekoliko mjesta sa najvećom gustinom krvnih sudova, nakon čega se sprovodi brojanje

pojedinačnih novih mikrosudova pod mikroskopskim poljem velike snage. Svaki pozitivan klaster endotelnih ćelija imunoreaktivnosti u odabranom polju se računa kao pojedinačni sud, pored morfološki identifikovanih sudova sa lumenom [130]. Intenzitet bojenja CD31 i CD34 je procijenjen kao odsustvo bojenja - vrijednost 0, slab intenzitet - vrijednost 1, umjeren intenzitet - vrijednost 2 i jak intenzitet – vrijednost 3.

5.6. Statistička analiza

Dobijeni podaci su analizirani pomoću Shapiro-Vilkovog testa. Studentov t-test za nezavisne uzorke i One-way ANOVA test je korišćen za procjenu razlika u starosnoj dobi pacijenata. One-way ANOVA je korišćena za ispitivanje razlika između grupa pacijenata u odnosu na vrijednosti njihovih rezultata kliničkih parametara, nakon čega je uslijedilo post-hoc testiranje korišćenjem Tukey's testa. Da bi se ispitala razlike u distribuciji intenziteta bojenja tkiva između grupa pacijenata, korišćeni su Hi-kvadrat test i Fišerov egzaktni test. Testiranje korelacije između ovih parametara je urađeno korišćenjem Spearmanov koeficijenta korelacije (Spearman's rank correlation coefficient) p vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom. Rezultati koji se odnose na kliničke parametre na slikama i tabelama su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

6. Rezultati

6.1. Demografske karakteristike

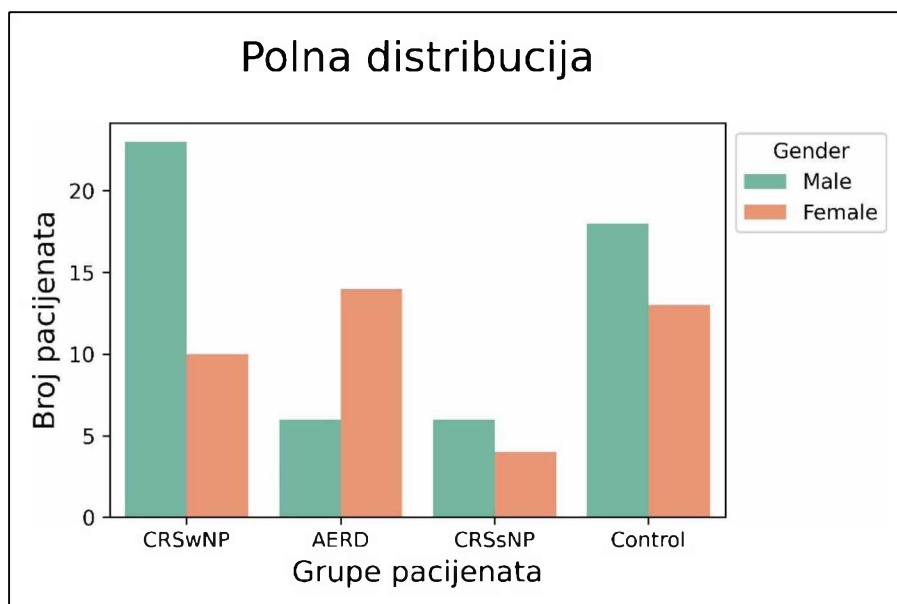
Devedeset i četiri pacijenta koji su uključeni u ovu studiju su podijeljeni u četiri grupe na slijedeći način: CRSwNP (bez osetljivosti na NSAIL) (n = 33; 35,1%), AERD (n = 20; 21,3%), CRSsNP (n = 10; 10,6%) i kontrolna (C) grupu koju čine ispitanici sa nazalnom opstrukcijom, bez inflamatorne bolesti nazalne sluzokože, kod kojih je hirurški liječena nosna pregrada i/ili pneumatizovana nosna školjka (n = 31; 33%). Od devedeset i četiri pacijenta, pedeset i tri (56,4%) su bili muškarci, a četrdeset i jedan (43,6%) su bile žene. Prosječna starost pacijenata muškog pola bila je statistički viša od pacijenata ženskog pola [43,9 \pm 12,8 naspram 38,8 \pm 8,6; t = 2,299, p < 0,05]. Nije pronađena statistička

razlika u srednjoj starosnoj dobi pacijenata između različitih grupa pacijenata ($F(3,90) = 1,6, p > 0,05$). Utvrđena je statistička razlika u polnoj distribuciji između četiri grupe pacijenata [$\chi^2(3) = 8,128, p < 0,05$] (Slika 8), pri čemu su pacijenti muškog pola preovladavali u CRSwNP i C grupi, a pacijenti ženskog pola u grupi sa AERD.

6.2. Klinički parametri

Poređenje kliničkih parametara (VAS, SNOT-22 i LMS), između eksperimentalnih grupa pacijenata i kontrolne grupe, pokazalo je značajnu razliku za sva tri ispitivana parametra koja je određena One-way ANOVA [VAS: $F(3, 90) = 9,495, p < 0,001$; SNOT-22: $F(3, 90) = 5,471, p < 0,01$; LMS: $F(2, 60) = 12,603, p < 0,001$] (Slika 9).

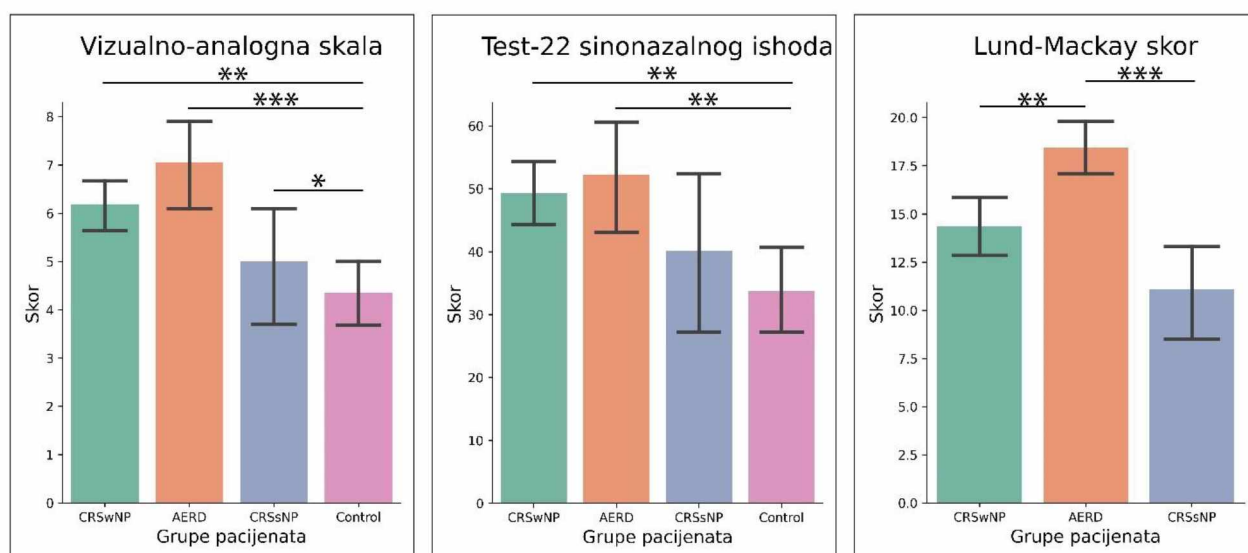
Post-hoc testiranje je bilo urađeno za svaki od tri testirana parametra, što je dalo razlike između grupa. U slučaju VAS detektovana je značajna statistička razlika između C i CRSwNP ($p < 0,01$), C i AERD ($p < 0,001$), C i CRSsNP ($p < 0,05$). U slučaju SNOT-22, otkrivena je značajna statistička razlika između C i CRSwNP ($p < 0,01$), C i AERD ($p < 0,01$). U slučaju LMS-a, otkrivena je značajna statistička razlika između CRSwNP i AERD ($p < 0,01$) i CRSsNP i AERD ($p < 0,001$). Vrijednost LMS ima značajnu statističku korelaciju sa vrijednostima SNOT 22 i VAS skora kod pacijenta sa sinonazalnom polipozom i kod pacijenta sa preosjetljivosti sa NSAIL što ukazuje da stepen u kojem su ispoljeni simptomi, verifikovan kroz vrijednost skale/ testa korelira na objektivnim nalazom/ patološkim supstratom evidentiranim u okviru CT pregleda paranazalnih šuplina. Vrijednost SNOT 22 je u značajnoj statističkoj korelaciji sa vrijednostima VAS kod kontrolne grupe ispitanika kao i kod pacijenta sa sinonazalnom polipozom i preosjetljivosti na NSAIL što ukazuje da je nivo ispoljenosti simptoma bolesti/ anatomskih varijacija odgovarajući anatomskom / patološkom supstratu, odnosno indikaciji za učinjeno hirurško liječenje (slika 12.).



Slika 8. Distribucija između grupa pacijenata na osnovu pola

Pacijenti muškog pola su bili dominantni u grupi CRSwNP (n = 23; 69,7%) kao i u kontrolnoj grupi (n = 18; 58,1%), dok su pacijentkinje bile dominantan pol u grupi sa AERD (n = 14; 70%). CRSwNP - hronični rinosinuzitis sa nazalnom polipozom ; AERD - respiratorna bolest izazvana aspirinom; CRSsNP - hronični rinosinuzitis bez nazalnih polipa.

U nazalnoj polipozi mastociti ekspiriraju estrogenske i progesteronske receptore (ER/PR). To može upućivati na odnos između hormonalnog statusa pacijenata i nazalne polipoze. Estradiol utiče na aktivnost eozinofila, uključujući njihovu preživljavanje, obzirom da eozinofili izražavaju ER-alfa receptore. Takođe ispoljava antiinflamatorni efekat inhibicijom TNF-alfa, interferona- γ i NK ćelija, sprečavajući ćelijsku apoptozu [114].

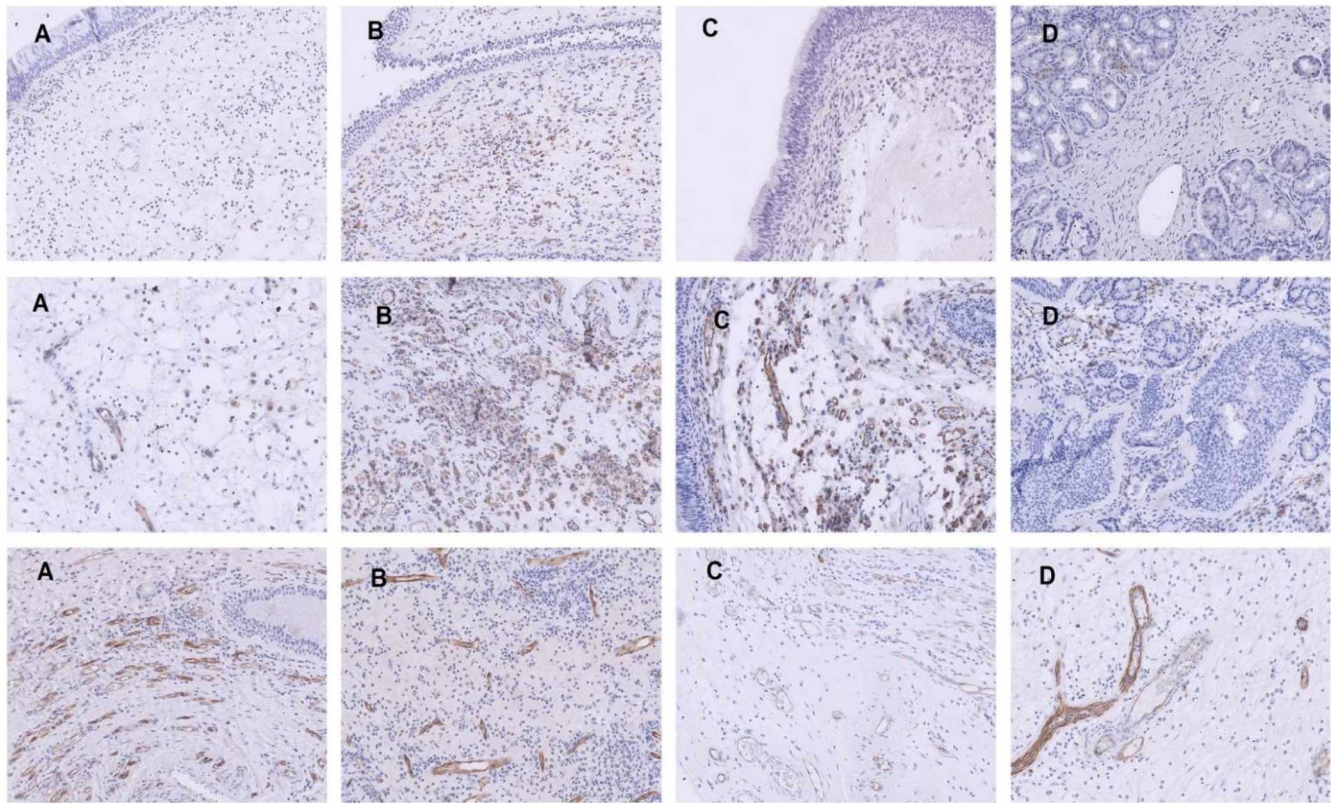


Slika 9. Poređenje rezultata ispitivanih kliničkih parametara između grupa pacijenata.

VAS i SNOT-22 su upoređeni između sve četiri grupe koje su uključene u ovu studiju, dok je LMS procijenjen samo u eksperimentalnim grupama pacijenata. Statistička razlika je prikazana za sva tri parametra. Skor za VAS i SNOT-22 je bio značajno veći u grupama CRSwNP i AERD, u poređenju sa pacijentima iz C grupe. Što se tiče LMS-a, uočena je statistička razlika između AERD i CRSwNP/CRSsNP grupa. Pacijenti iz grupe AERD imali su najveći rezultat za sva tri klinička parametra. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * - označava $p < 0,05$; ** - označava $p < 0,01$; *** - označava $p < 0,001$. VAS- vizuelno analognna skala, SNOT-22 - Sino-nazalni test ishoda-22, LMS - Lund-Mackay skor, CRSwNP - hronični rinosinuzitis sa nazalnom polipozom, AERD - respiratorna bolest izazvana aspirinom, CRSsNP - hronični rinosinuzitis bez nazalnih polipa.

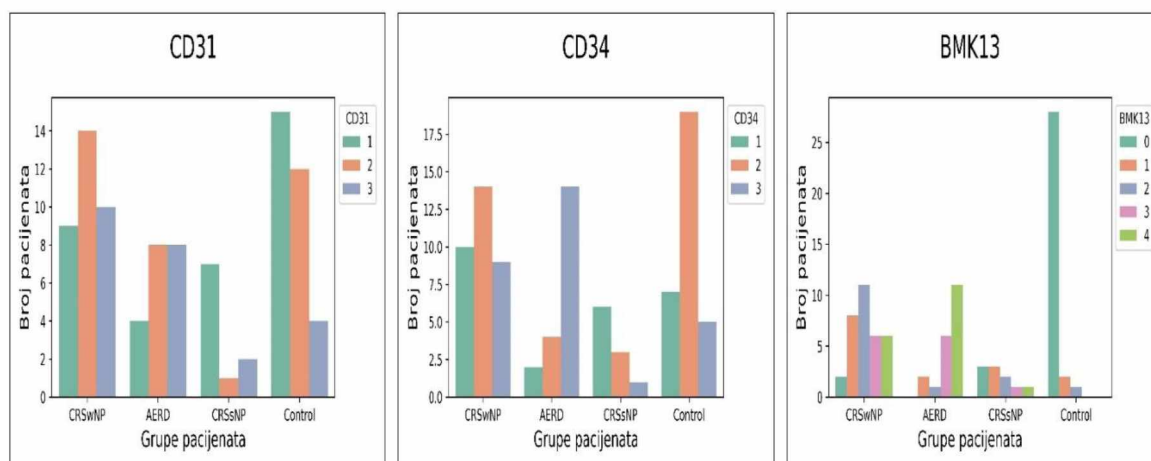
6.3. Imunohistohemijske karakteristike

Reprezentativni primjeri imunohistohemijskog bojenja za sve četiri grupe pacijenata prikazani su na slici 10. Sve tri grupe pacijenata sa CRS su pokazale značajnu statističku razliku u vrijednostima ispitivanih imunohistohemijskih markera: CD31 ($p < 0,05$); CD34 ($p < 0,01$); BMK13 ($p < 0,001$). Imunoreaktivnost za CD31 i CD34 nije bila u potpunosti odsutna ni kod jednog ispitanika.



Slika 10. Reprezentativni primjeri imunohistohemijskog bojenja za BMK13 (gornji red), CD31 (srednji red) i CD34 (donji red) za sve četiri grupe ispitanika. A- ispitanici oboljeli od CRSwNP, B – pacijenti sa AERD, C – ispitanici oboljeli od CRSsNP, D- kontrolna grupa ispitanika.

Najveća učestalost, najjačeg bojenja za CD 31 je primjećena u uzorcima tkiva dobijenim od pacijenata sa CRSwNP, dok je najjači obrazac bojenja CD34 pronađen kod pacijenata sa AERD. Ekspresija BMK13 je skoro u potpunosti izostala u C grupi pacijenata, što je u potpunoj suprotnosti sa pacijentima iz grupe CRSwNP, koji su pokazali različite nivoe bojenja BMK13. Najviši nivo ekspresije BMK13 (skor 4) je otkriven kod pacijenata sa AERD (slika 11. i tabela 1).



Slika 11. Raspodjela imunohistohemijjskih markera između grupa pacijenata.

CD31, CD34 i BMK13 su procjenjeni u uzorcima tkiva dobijenim iz sve četiri grupe pacijenata. Koristeći Fišerov egzaktni test, otkrivena je značajna statistička razlika u distribuciji intenziteta bojenja za sva tri imunohistohemijjska markera između četiri grupe pacijenata. Odnos između imunohistohemijjskih markera i rezultata kliničkih parametara pacijenata uključenih u ovu studiju pokazao je umjerenu pozitivnu korelaciju između BMK13 i SNOT-22 ($r_s = 0,46$) i između BMK13 i LMS ($r_s = 0,58$) u grupi CRSwNP (Slika 11).

CRSwNP- hronični rinosinuzitis sanazalnom polipozom; AERD- respiratorna bolest izazvana aspirinom; CRSsNP- hronični rinosinuzitis bez nazalnih polipa.

Numerički podaci kliničkih i imunohistohemijjskih parametara prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Klinički i imunohistohemijski parametri kod različitih kliničkih fenotipova hroničnog rinosinuzitisa (CRS) i kontrolne grupe.

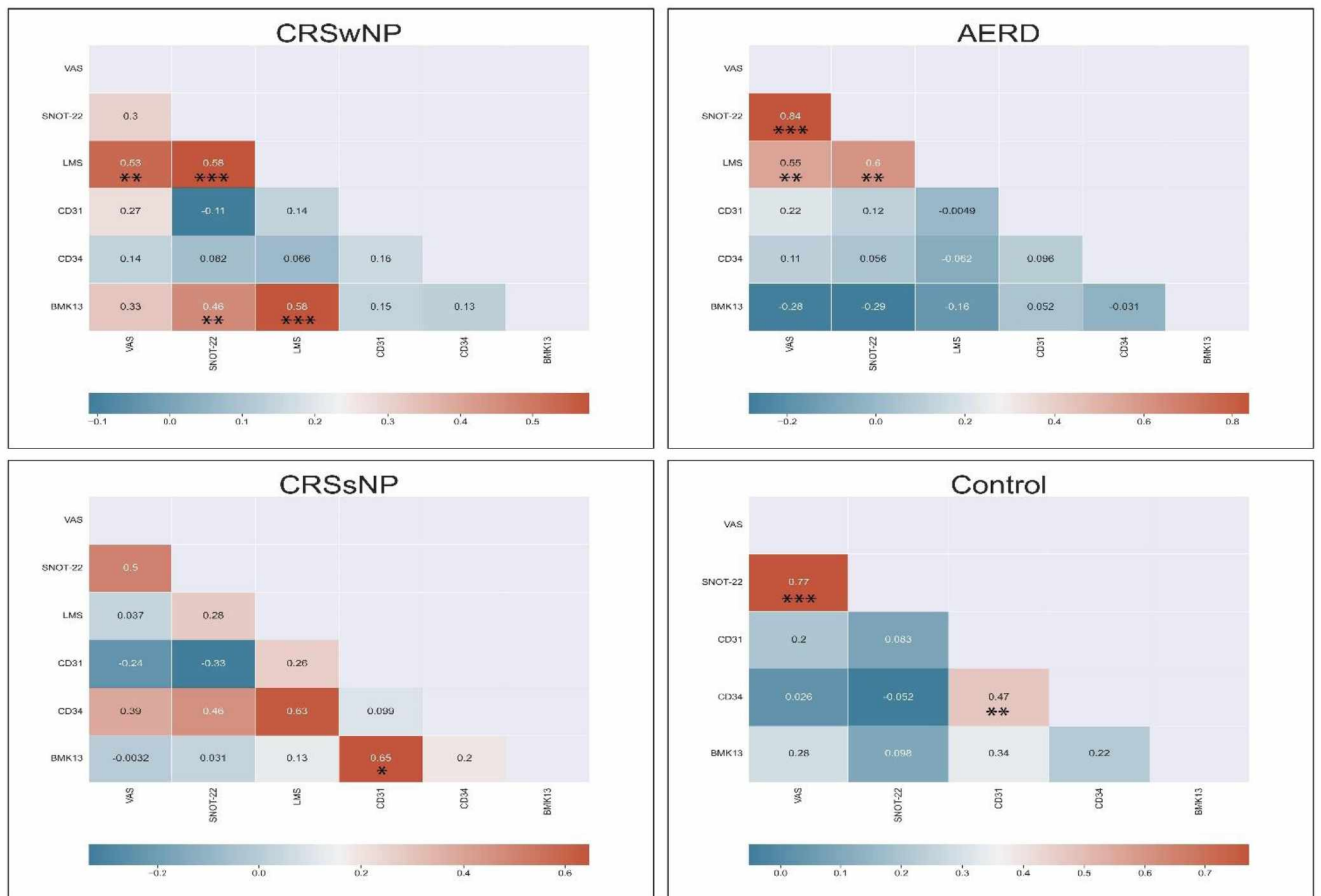
Parametri	CRSwNP	AERD	CRSsNP	Controlna grupa
VAS *	6.2 ± 1.6	7.1 ± 2.2	5.0 ± 2.1	4.3 ± 1.9
SNOT-22 *	49.3 ± 15.3	52.25 ± 20.6	40.1 ± 21.9	33.7 ± 19.4
LMS *	14.36 ± 4.4	18.45 ± 3.1	11.1 ± 4.1	/
BMK13 vrijednosti	0 – 6.1% 1 – 24.2% 2 – 33.3% 3 – 18.2% 4 – 18.2%	0 – 0.0% 1 – 10.0% 2 – 5.0% 3 – 30.0% 4 – 55.0%	0 – 30.0% 1 – 30.0% 2 – 20.0% 3 – 10.0% 4 – 10.0%	0 – 90.3% 1 – 6.5% 2 – 3.2% 3 – 0.0% 4 – 0.0%
CD34 vrijednosti	1 – 30.3% 2 – 42.4% 3 – 27.3%	1 – 10.0% 2 – 20.0% 3 – 70.0%	1 – 60.0% 2 – 30.0% 3 – 10.0%	1 – 22.6% 2 – 61.3% 3 – 16.1%
CD31 vrijednosti	1 – 27.3% 2 – 42.4% 3 – 30.3%	1 – 20.0% 2 – 40.0% 3 – 40.0%	1 – 70.0% 2 – 10.0% 3 – 20.0%	1 – 48.4% 2 – 38.7% 3 – 12.9%

*Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija)

U grupi CRSsNP, granična statistička značajnost u korelaciji je prikazana samo za CD31 i BMK13, koji su pokazali umerenu pozitivnu korelaciju ($r_s = 0,65$). Pokazano je da LMS korelira sa VAS i SNOT-22 u grupama pacijenata sa CRSwNP ($r_s = 0,53$; $r_s = 0,58$) i AERD ($r_s = 0,55$; $r_s = 0,6$). Kod kontrolne grupe ispitanika smo pronašli pozitivnu korelaciju između SNOT-22 i VAS ($r_s = 0,77$) i između CD31 i CD34 ($r_s = 0,47$) (Slika 12.)

Skraćenice: VAS- vizuelni analogni skor, SNOT-22- Sino-nazalni skor, CRSwNP- hronični rinosinuzitis sa nazalnom polipozom; AERD- respiratorna bolest izazvana aspirinom; CRSsNP- hronični rinosinuzitis bez nazalnih polipa.

Toplotna mapa korelacije



Slika 12. Mapa korelacije između imunohistohemijskih markera i kliničkog skora parametara. Boje u mapi odgovaraju jačini i pravcu korelacije, gdje crvena boja označava pozitivnu korelaciju, plava boja negativnu, a bijela boja označava koeficijent korelacije 0. Vrijednosti u poljima karte predstavljaju Spearmanov koeficijent korelacije.

* - označava p vrijednost od $< 0,05$; ** - označava p vrijednost od $< 0,01$; *** - označava p vrijednost od $< 0,001$.

Skraćenice: CRSwNP - hronični rinosinuzitis sa sinonazalnom polipozom AERD - respiratorna bolest pogoršana aspirinom; CRSsNP - hronični rinosinuzitis bez sinonazalne polipoze; VAS- vizuelni analogni skor, SNOT-22- Sino-nazalni skor, LMS- Lund-Mackay Score.

7. Diskusija

Prevalenca oboljelih od AERD u opštoj populaciji je oko 0,3–2,5%. Prevalencija je značajno veća u populaciji oboljenih od bronhijalne astme. Procijenjeno je da je 7,15% oboljelih među odraslima koji su astmatičari, a 14,89% među onima sa teškom astmom. Početak simptoma može se ispoljiti od adolescencije do 40. godine života, sa prosječnom starošću od oko 30 godina. AERD se češće javlja kod žena nego kod muškaraca (57% naspram 43%). Većina pacijenata ima negativnu porodičnu anamnezu za AERD. 1–6% oboljelih ima pozitivnu porodičnu anamnezu. AERD je zastupljeniji kod ljudi koji su izloženi agensima koji dovode do inflamacije disajnih puteva [44, 131]. Prvi napad astme u AERD mogu izazvati virusne infekcije respiratornog trakta (45%), unos aspirin/NSAIL (14%) i izloženost alergenima ili faktorima spoljašnje sredine-zagađivačima(14%). Kod 30% pacijenata koji su ispitivani, faktor koji izaziva prvi napad astme u evropskoj populaciji je nepoznat. Atopija i pozitivan PRICK test na inhalatorne alergene su prisutni od 30% - 34% do 64–66% pacijenata sa AERD. Prva klinička manifestacija koja se javlja u kod pacijenata sa AERD je rinitis, koji se manifestuje kao nazalna kongestija, pojačana sekrecija iz nosa, anosmija/hiposmija. Prisustvo anosmije/hiposmije je često do 89% [132].

Hronični rinitis se manifestuje kao hronični hiperplastični eozinofilni sinuzitis. Klinička manifestacija astme se obično javlja dvije godine nakon pojave rinitisa, a netolerancija na NSAIL se može ispoljiti u bilo kom stadijumu bolesti. Sinonazalnoj polipozi prethodi hronični rinosinuzitis. Promjene u metabolizmu arahidonske kiseline dovode do neravnoteže između proinflammatoryh i antiinflammatoryh supstanci, a manifestuju se kao prekomjerna proizvodnja cisteinil leukotriena (CysLTs) i nedovoljna proizvodnja prostaglandina E2 (PGE2). Osnovna karakteristika AERD je prisustvo eozinofilnih infiltrata u respiratornom traktu. CysLTs ispoljavaju važan proinflammatory i profibrotički efekat na respiratornom traktu. Oni indukuju bronhokonstrikciju, povećanu produkciju nazalnog sekreta, eozinofilni inflamatorni infiltrat u interakciji sa svojim specifičnim receptorima [133]. Oboljeli od AERD imaju povišenu ekspresiju CysLTs receptora (CysLTR1 i CysLTR2) u sluznici, u poređenju sa pacijentima tolerantnim na aspirin. Prostaglandini su lipidni molekuli, produkt arahidonske kiseline nastali djelovanjem

ciklooksigenaze (COX). PGD2, PGE2 i TKSA2 su značajni za patogenezu AERD. TKSA2 je proinflamatorni prostanoid, snažan vazokonstriktor, uključen u agregaciju i aktivaciju trombocita, koji olakšava regrutaciju leukocita. Potiče iz trombocita, a nakon hidrolize prelazi u stabilan tromboksan B2 (TKSB2) [134].

Hronična inflamacija i angiogeneza su dva procesa koji teku paralelno tokom remodelovanja tkiva u CRS, uz brojne međusobne interakcije. Mnogi medijatori, koji se akumuliraju na mjestu hronične inflamacije stimulišu proangiogene signalne molekule, uključujući faktore rasta, adhezione molekule, citokine i hemokine. Ovi proangiogeni medijatori stimulišu endotelne ćelije da proliferišu i formiraju nove krvne sudove. Izražena eozinofilna infiltracija je obilježje CRSwNP, dok pacijenti sa CRSsNP mogu u okviru inflamatornog infiltrata imati prisutne eozinofile, ali u značajno manjem broju u odnosu na oboljele od CRSwNP. Regrutovanje eozinofila u okviru CRS omogućavaju IL-5, RANTES i eotaksin, ali i prisustvo *Staphylococcus aureus*, čiji antigen akumulira eozinofile u subepitelu oboljelih od CRSwNP. Eozinofili imaju značajan uticaj na patofiziologiju CRS zbog njihovog produženog preživljavanja u tkivu, koje je omogućeno povišenim nivoima IL-5, IL-33 i timusnim stromalnim limfopoetinom, koji onemogućavaju apoptozu eozinofila [135].

Pacijenti sa CRSwNP imaju veće nivoe IL-5, eotaksina, IL-33 i TSLP, kao i upornu kolonizaciju *Staphylococcus aureus*. Ekstracelularne eozinofilne zamke (EET) su pronađene u eozinofilnom infiltratu nazalne sluznice i značajno korelaraju sa težinom hroničnog rinosinuzitisa, bez obzira na prisustvo polipa u nosu [136]. U CRSwNP, EET se pretežno nalaze u subepitelnim regionima sa defektima epitelne barijere, što može biti posljedica kolonizacije *Staphylococcus aureus*. EET su takođe visoko prisutni u nazalnom sekretu pacijenata sa eozinofilnim CRS, povećavajući viskozitet sluzi [137].

Osim proteinskih medijatora koje oslobađaju iz svojih granula, eozinofili proizvode proinflamatorne lipide kao cisteinil leukotriene koji dalje promovišu regrutaciju eozinofila, sekreciju mukusa i povećanu vaskularnu permeabilnost u CRSwNP. Produkt aktivacije eozinofila su i povećani nivoi proinflamatornog prostaglandina D2, kao i smanjeni antiinflamatorni prostaglandin E2. EET se sastoje od ekstracelularne DNK i sadrže velike količine proteinskih granula, što olakšava eliminaciju patogena. EET je prisutno u tkivu pacijenata oboljelih od CRSsNP kao i kod pacijenata oboljelih od CRSwNP, kada dovode do povećenog viskoziteta nazalnog sekreta. Osnovu formiranja

EET čini formiranje CLC koji predstavlja oblik galektina-10. CLC se nalaze u sluzokoži i sekretu pacijenta oboljelih od CRSsNP i CRSwNP, pri čemu kristalizovani oblik galektina-10 ima proinflamatorne efekte u CRSwNP, dok rastvorljivi galektin-10 ima antiinflamatorne efekte. Prisustvo EET u tkivu pacijenata sa CRS je povezano sa smanjenom olfaktornom funkcijom i većim Lund-Mackay skorom, bez obzira na prisustvo nazalnih polipa. Aktivacija eozinofila je ključna za kliničku manifestaciju u CRSsNP i CRSwNP. Kod sinonazalne polipoze uslijed oštećenja epitela, formiranje EET ima protektivni efekat u okviru inflamacije posredovane eozinofilima. Kolonizacija *Staphylococcus aureusom* stimuliše T2 inflamatorni odgovor u okviru CRSwNP.

Eozinofili aktivirani IL-5 su stimulirani *Staphylococcus aureusom* na dalje oštećenje epitela indukujući oslobađanje glavnog bazičnog proteina, koji je toksičan za epitel putem ekstracelularnih zamki eozinofila. Sa oslobađanjem EET-a, galektin 10 se oslobađa u epitelni sloj, formirajući Charcot-Leiden kristale (CLC), koji dalje doprinose održavanju perzistentnog inflamatornog odgovora [138]. Povećana produkcija IL-8 izazvana CLC ukazuje na njihovu ulogu u formiranju neutrofilnog inflamatornog infiltrata. Povećana aktivnost elastaze i katepsina G, koji predstavljaju produkt aktiviranih neutrofila, dovode do stimulacije sekrecije i aktivacije citokina IL-1 i IL-33. Neutrofilne proteaze ispoljavaju dejstvo na kolagenu, elastinu ekstracelularnog matriksa i dovode do remodelovanja tkiva. Neutrofilne serinske proteaze narušavaju integritet nazalne epitelne barijere i podstiču metaplaziju peharastih ćelija kao i povećanu produkciju sekreta. Neutrofilne ekstracelularne zamke (NET), koje se uglavnom sastoje od DNK neutrofila povezane sa proteinima granula, prisutne su u subepitelu pacijenata oboljenih od CRSsNP i pacijenta sa CRSwNP. NET povećavaju viskozitet sluzi, što dovodi do smanjenog mukocilijarnog klirensa uz remodelovanje ekstracelularnog matriksa.

Uprkos brojnim studijama u vezi sa hroničnim inflamatornim procesima u tijelu, samo mali broj njih se bavi ovim složenim procesima kod pacijenta sa CRS. Angiogeneza koja je posljedica inflamacije karakteriše se neoangiogenezom, povećanjem vaskularne permeabilnosti. Khurana i saradnici [139] su ukazali na povećanu ekspresiju proangiogenih gena koji definišu neoangiogenezu, izražene morfološke promjene i povećanu vaskularnu permeabilnost u sinonazalnom tkivu kod pacijenata sa CRS u poređenju sa kontrolnom populacijom. Kvantifikacija mikrosudova je pokazala veću

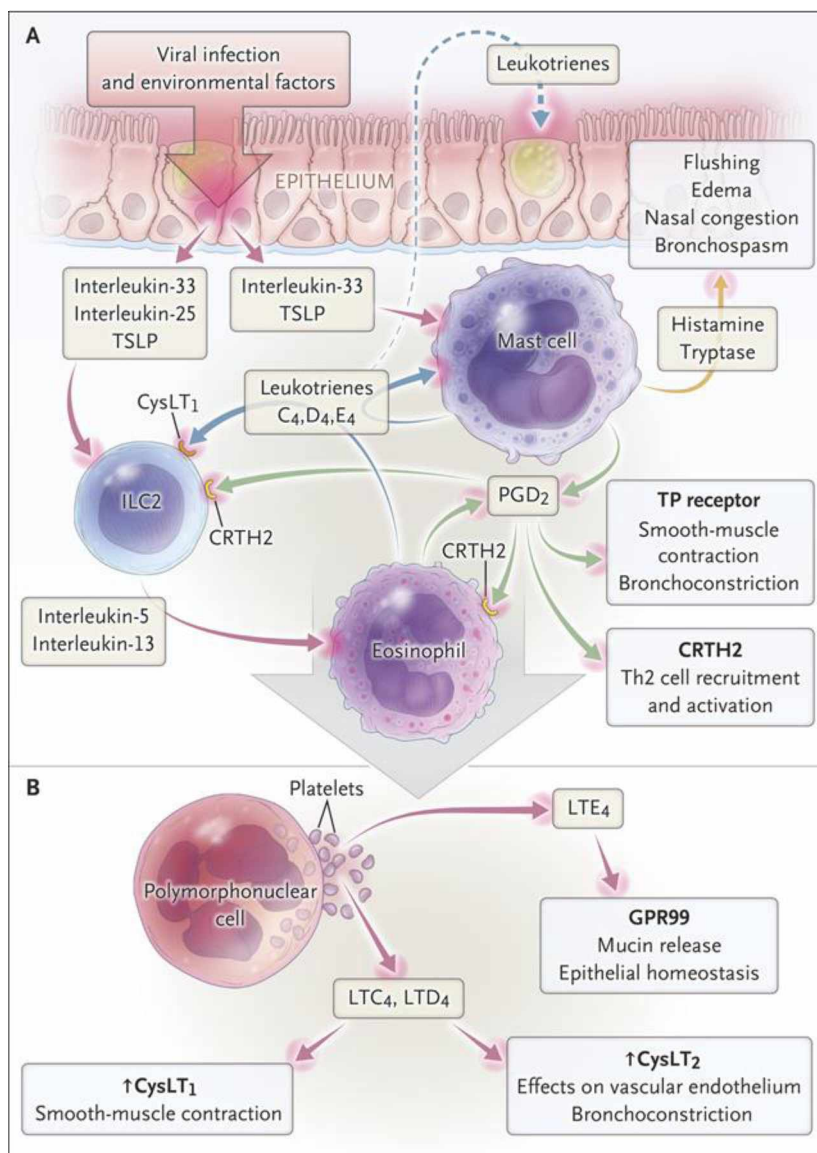
ekspresiju CD34 markera kod inflamacije tip 2 u okviru CRS u odnosu na CRS bez inflamatornog odgovora tip 2 [140].

Međutim, tokom pregleda literature, nismo pronašli studije koje bi istraživale odnos između eozinofilne infiltracije i vaskularizacija subepitela nazalne sluznice, posebno kod pacijenata sa AERD. Naša studija je prva koja je istražila odnos eozinofilne infiltracije i vaskularizacije u sinonazalnoj sluzokoži pacijenata sa AERD, kao različitog kliničkog fenotipa unutar CRS. Prema rezultatima našeg istraživanja, pacijenti sa AERD i CRSwNP bez osetljivosti na NSAIL imaju više izražene simptome i značajnije narušen kvalitet života u poređenju sa pacijentima sa CRSsNP i ispitanicima bez inflamacije nosne sluznice, kod kojih se hirurškom korekcijom anatomskih struktura i varijacija liječi nazalna opstrukcija. Takođe, kod pacijenta sa AERD prisutna je intenzivnija inflamacija sluznice paranazalnih šupljina, evidentirana na CT snimku u poređenju sa pacijentima sa CRSwNP i CRSsNP. BMK13 kao marker eozinofilne infiltracije i CD34 kao marker proliferacije endotela najviše su bili izraženi u grupi pacijenata sa AERD. CD31, takođe marker angiogeneze, bio je najbolje izražen u grupi sa CRSwNP bez preosjetljivosti na aspirin. Korelacija BMK13 sa kliničkim parametrima najbolje se manifestuje u grupi pacijenata sa CRSwNP, što sugerise da je intenzitet eozinofilne infiltracije sinonazalne sluznice direktno povezan sa intenzitetom inflamacije i progresijom bolesti. Neobično je da kod pacijenata sa AERD ova korelacija nije značajna, iako je eozinofilna infiltracija je u toj sluznici bila najgušća. Jedan od najznačajnijih rezultata ovoga istraživanja je nedostatak korelacije između BMK13, kao markera infiltracije nazalne sluzokože aktiviranim eozinofilima i CD31 i CD34, markerima angiogeneze kod pacijenata sa nazalnom polipozom. Mada CD31 i CD34 imaju ulogu molekula adhezije, važnih u procesu transendotelne migracije eozinofila, oni nisu glavni adhezivni molekuli u toj fazi života eozinofila. Osim što su molekuli adhezije za eozinofile, važni su i za migraciju leukocita između endotelnih ćelija. Poslije faze privlačenja i aktivacije eozinofila, gdje glavne uloge imaju eozinofilni hemokini eotaksin i RANTES (regulisano pri aktivaciji, normalno T-ćelije eksprimirane i izlučene), kao i citokini IL-4, IL-5 i IL-13, najvažniju ulogu u transendotelnoj migraciji eozinofila ima adhezioni molekul vaskularnih ćelija-1 (VCAM-1). Bez vezivanja eozinofila za VCAM-1, nije moguće njihovo nakupljanje u stromi i epitelu sluzokože nosa i sinusa, gdje zatim oslobađaju svoje enzime tokom hronične inflamacije, uključujući MBP.

MBP je bazni protein od 13,8 kDa bogat argininom, koji je lokalizovan u kristaloidnom jezgru sekundarne granule. MBP je prisutan u eozinofilima i bazofilima, a izoforma MBP2 je do sada identifikovana samo u eozinofilima, što ga čini biomarkerom za eozinofilnu degranulaciju. MBP-1 oštećuje ćelije bakterija, helminta i sisara narušavanjem dvoslojne membrane lipida ili mijenjanjem aktivnosti enzima unutar tkiva. MBP-1 stimuliše oslobađanje histamina iz bazofila i mastocita, aktivira neutrofile i trombocite i povećava generisanje superoksida u alveolarnim makrofagima [141]. Monoklonsko antitijelo (BMK-13) prepoznaje glavni osnovni protein eozinofila (MBP), protein od 117 aminokiselina, kao izoformu specifičnu za eozinofile.

Epitelne ćelije (EpC) imaju mogućnost remodelovanja što je neophodno za obnavljanje integriteta epitelne barijere pod uticajem mikrookruženje tkiva. Integritet endotelne vaskularne barijere je omogućen međucelijskim spojevima koje omogućavaju molekuli adhezije, kao što je adhezioni molekul endotelnih ćelija trombocita (PECAM-1.) Inflamacija stimuliše proangiogeni efekat preko molekula adhezije, inflamatornih citokina i faktora rasta. Narušavanje međucelijskih spojeva omogućava ekstravazaciju leukocita, povećava vaskularnu permeabilnost [139]. Proangiogeni faktori, angiostatin, endostatin i faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) dovode do formiranja novih krvnih sudova iz postojeće mikrovaskulature. VEGF utiče na proliferaciju endotelnih ćelija, reguliše kapilarnu propustljivost i permeabilnost bazalne membrane u sinonazalnoj polipozi, što dovodi do edema i rasta polipa. Endostatin i angiostatin indukuju apoptozu endotelnih ćelija, onemogućavajući proliferaciju i migraciju, ispoljavajući antiangiogeni efekat. Endostatin smanjuje proizvodnju proinflamatornog citokina, faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) [142]. Bazalne ćelije proizvode urođeni T2 citokin – timusni stromalni limfopoetin (TSLP), koji je disregulisan kod CRSwNP kao i u AERD. Nivoi TSLP su veći u tkivu polipa pacijenata sa AERD nego kod pacijenata sa CRS. TSLP indukuje stvaranje prostaglandina D2 mastocita, što iziskuje aktivaciju mastocita u tkivu polipa. IL-33 se takođe generiše u bazalnim ćelijama, a njegovi nivoi su povećani u bazalnim ćelijama kod pacijenata sa CRSwNP i AERD naspram bazalnih ćelija pacijenata sa CRSsNP [143,144]. Hemosenzorne epitelne ćelije su prisutnije kod pacijenta CRSwNP i mjesto su ekspresije IL-25. Ove ćelije takođe imaju kapacitet da generišu cisteinil leukotriene, koji promovišu vaskularnu permeabilnost i inflamaciju [145]. ALOX 15, lipooksigenaza reguliše ekspresiju CCL26 i CCL27 obezbjeđujući mehanizam pomoću

kojih epitelne ćelije mogu regrutovati eozinofile i promovisati mataplaziju peharastih ćelija [146]. IL-13 ima efekte na epitelne ćelije disajnih puteva koji stimulišu nazalnu polipozu putem smanjenja proizvodnje prostaglandina E2, smanjenje ekspresije proteina čvrstog spoja potrebnih za integritet barijere. Ovi defekti imaju ulogu u kolonizaciji mikroba, kao što je *Staphylococcus aureus* i virusne partikule koje su dio etioloških faktora u patogenezi bolesti. ILC2 ćelije, mastociti, makrofagi, eozinofili, i bazofili proizvode interleukin 13 (IL-13). Interleukin-13 je prvobitno otkriven 1993. godine. Ima molekularnu težinu od 13 kDa i sastoji se od četiri alfa spiralna snopa, A, B, C i D. Promoviše regrutovanje eozinofila i aktivaciju u inflamaciji, podstiče preživljavanje eozinofila sprečavanjem apoptoze. IL-13 indukuje hiperplaziju peharastih ćelija i hipersekreciju sekreta, proliferaciju fibroblasta i miofibroblasta [147]. Povećava aktivnost adhezionih molekula vaskularnih ćelija, kao što su b-integrin, VACM-1 i ICAM-1, koji promovišu eozinofilnu migraciju i regrutovanje, promovišući na taj način eozinofilnu inflamaciju. Regrutovani aktivirani eozinofili oslobađaju više citotoksičnih katjonskih proteina, citokina, hemokina i reaktivnih vrsta kiseonika, koji intenziviraju inflamaciju disajnih puteva i remodelovanje sluznice. IL-13 indukuje ekspresiju faktora rasta vaskularnih endotelnih ćelija (VEGF-A, B, C, D, E, F). VEGF-A (VEGF) je jedan od mitogena endotelnih ćelija. Promoviše angiogenezu, šireći vaskularnu mrežu disajnih puteva, što doprinosi remodelovanju disajnih puteva [147,148]. Pacijenti sa AERD imaju veći nivo CysLT-a, posebno LTE4, koji uglavnom potiču inflamatornih ćelija, uključujući neutrofile, monocite i bazofile, eozinofile i mastocite. PGE2/PGD2 indukuje patogenezu AERD. Povećani nivoi PGD2, oslobođenog iz mastocita i eozinofila, nakon vezivanja za receptore dovodi do bronhokonstrikcije. Vezivanjem za homologni molekul hemoatraktantnog receptora eksprimiranog na T2 ćelijama (CRTH2) aktivira urođene limfoidne ćelije (ILC2) - slika 13.



Slika 13. Inflamacija kod pacijenata sa AERD (panel A). Alergeni, virusna infekcija i faktori životne sredine imaju sposobnost da iniciraju oštećenje epitela i oslobađanje interleukina-33, timusnog stromalnog limfopoetina (TSLP) i interleukina-25. Urođene limfoidne ćelije tipa 2 (ILC2) i mastociti u AERD-u dovode do eozinofilije. Neutrofili adherentni na trombocitima (panel B) dodatno povećavaju opterećenje leukotrijena kod AERD. Prekomjerna sinteza prostaglandina D2 (PGD2) je rezultat aktivacije mastocita i eozinofila preko tromboksanskih (TP) receptora. PGD2 receptori stimulišu regrutovanje pomoćnih T ćelija tipa 2. Cisteinil leukotrieni C4 (LTC4) i D4 (LTD4) djeluju i na cisteinil leukotrien receptor 1 (CysLT1) i cisteinil leukotrien receptor 2 (CysLT2). Leukotrien E4 (LTE4) ima minimalni efekat na CysLT1 i CysLT2, ali vezuje receptor 99

spojen sa G proteinom (GPR99), što dovodi do oslobađanja mucina i submukoznog otoka. CRTH2 označava homologni molekul hemoatraktantnog receptora eksprimiran na T2 ćelijama [149].

VEGF je izražen u tkivu respiratornih organa u okviru inflamatornog odgovora i procesa remodelovanja. VEGF proizvode mastociti čime se stimuliše migracija mastocita na mjesta angiogeneze. Otok nazalne sluznice, hipertrofija sluznice infundibuluma i drugih otvora sinusa, kao i rast nazalnih polipa dovodi do okluzije ušća sinusa, što posljedično smanjuje koncentraciju kiseonika u sluznicama. Hipoksija proizvodi visoko proinflamatorno stanje, koje je uzrokovano aktivacijom HIF-1 hypoxic-inducible factors (HIFs) HIF-1 alpha and HIF-2 alpha [150]. Smanjena koncentracija kiseonika omogućava akumulaciju faktora indukovano hipoksijom (HIF), dok je ekspresija HIF-1a izražena u nazalnim polipima [151]. Hipoksija povećava permeabilnot epitela, narušava motilitet cilija epitela. Pod dejstvom štetnih agenasa iz okoline epitelne ćelije proizvode IL-25, IL-33 [152]. Citokini produkovani iz epitela stimulišu urođene limfoidne ćelije tipa 2 (ILC2) u pravcu sekrecije IL-4, IL-5 i IL- 13 čime se stimuliše eozinofilna infiltracija [153,154]. Hipoksija stimuliše epitelne ćelije da produkuju IL-8, koji je glavni hemokin za regrutovanje i aktivaciju neutrofila [155]. Hipoksija je takođe snažan proinflamatorni stimulus putem indukcije proinflamatornih citokina i hemokina (CCL11 [eotaksin-1], CKSCL8 [IL-8], CCL2 [MCP1], CCL4 [MIP-1 β] i CKSCL12 [SDF-1]) čime dovodi do remodelovanja tkiva [156]. Sam VEGF ima proinflamatorni efekat, preko akumulacije mononuklearnih fagocitnih ćelija. Pored VEGF, remodelovanje tkiva kao odgovor na hipoksiju omogućavaju transformišući faktor rasta- β , IL-11 i nekoliko matriksnih metaloproteinaza, odlaganjem prokolagena i fibronektina [157].

Zanimljivo je da je značajna korelacija BMK13 i CD31 bila je pronađena samo kod pacijenata sa CRSsNP, dok se pozitivna korelacija markera angiogeneze CD31 i CD34 manifestovala samo u sluzokoži pacijenata koji su činili kontrolu grupu. Ovi nalazi bi mogli da ukazuju na činjenicu da u nosnoj sluzokoži gdje eozinofilna inflamacija nije značajno izražena i proces remodelovanja tkiva nije tako intenzivan, proces fiziološke angiogeneze nije značajno izmijenjen. Međutim, naša studija ima ograničenja. Broj pacijenata sa CRSsNP i AERD je bio relativno mali. S druge strane, taj broj je odražavao stvarni priliv pacijenata koji su indikovani i hospitalizovani za hirurško liječenje.

Pacijenti sa CRSsNP se ređe upućuju na hirurško liječenje obzirom da se u većini slučajeva dobri rezultati postižu konzervativnim liječenjem. Samo pacijenti sa AERD i blagim oblikom astme su uključeni u našu studiju, obzirom da teži oblici astme zahtijevaju upotrebu sistemskih kortikosteroida u okviru terapije, koja može uticati na manifestaciju bolesti i modifikovati inflamatorni proces u sluzokoži nosa i paranazalnih šupljina kod tih pacijenata. To znači da bi intenzitet BMK13, CD31 i CD34 imunoekspresije kod pacijenata sa težim oblikom AERD bi bio čak i veći od onoga što je primjećeno kod naših pacijenata.

8. Zaključci

1. Rezultati su pokazali gotovo potpuno odsustvo aktiviranih eozinofila u sluznici ispitanika koji nisu imali inflamaciju nosne sluznice.
2. Imunoekspresija BMK13 kao markera eozinofilne infiltracije je ekstremno visoka u sinonazalnoj sluznici oboljelih od nosne polipoze, a naročito u grupi pacijenata sa AERD.
3. Marker angiogeneze CD31 i CD34 su značajno više ispoljeni u sluznici pacijenata sa AERD i CRSwNP u odnosu na pacijente sa CRSsNP i zdrave ispitanike.
4. Mada priroda istraživanja to nije omogućila, s obzirom da se radilo o studiji presjeka, povećani markeri angiogeneze kod pacijenata sa nosnim polipima bi mogli da nagovjeste brže širenje bolesti i veću učestalost recidiva CRS.
5. Među različitim fenotipima CRS, intenzitet eozinofilne infiltracije bolje korelira sa kliničkim parametrima (radiološki procjenjen stepen proširenosti bolesti, narušavanje kvaliteta života) nego intenzitet vaskularizacije lamine proprije.
6. Nalaz gušće eozinofilne infiltracije u tkivu sluznice paranazalnih sinusa tokom patohistološke anize može ukazati na težu kliničku sliku bolesti.
7. Rezultati nisu pokazali postojanje korelacije između markera eozinofilne infiltracije i vaskularne proliferacije u lamini propriji pacijenata sa nosnom polipozom, kako kod onih sa, tako i kod onih bez preosjetljivosti na NSAIL.

9. Reference

1. Bath K, Aggarwal S, Sharma V. Sushruta: Father of plastic surgery in Benares. *J Med Biogr.* 2019;27(1):2-3.
2. Mudry A. An octopus in the nostrils. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2020;137(3):211-212.
3. Benmoussa N, Hansen K, Charlier P. Hippocrates the otolaryngologist: an epidemiological analysis of ear-throat-nose diseases in the Corpus Hippocraticum. *Acta Otolaryngol.* 2018;138(3):194-197.
4. Jankowski R, Rumeau C, Gallet P, Nguyen DT. Nasal polyposis (or chronic olfactory rhinitis). *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2018;135(3):191-196.
5. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, 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, Douglas RG, Gevaert PH, Hafner A, Harvey RJ, Joos GF, Kalogjera L, Knill A, Kocks JH, Landis BN, Limpens J, Lebeer S, Lourenco O, Meco C, Matricardi PM, O'Mahony L, Philpott CM, Ryan D, Schlosser R, Senior B, Smith TL, Teeling T, Tomazic PV, Wang DY, Wang D, Zhang L, Agius AM, Ahlstrom-Emanuelsson C, Alabri R, Albu S, Alhabash S, Aleksic A, Aloulah M, Al-Qudah M, Alsaleh S, Baban MA, Baudoin T, Balvers T, Battaglia P, Bedoya JD, Beule A, Bofares KM, Braverman I, Brozek-Madry E, Richard B, Callejas C, Carrie S, Caulley L, Chussi D, de Corso E, Coste A, El Hadi U, Elfarouk A, Eloy PH, Farrokhi S, Felisati G, Ferrari MD, Fishchuk R, Grayson W, Goncalves PM, Grdnic B, Grgic V, Hamizan AW, Heinichen JV, Husain S, Ping TI, Ivaska J, Jakimovska F, Jovancevic L, Kakande E, Kamel R, Karpischenko S, Kariyawasam HH, Kawauchi H, Kjeldsen A, Klimek L, Krzeski A, Kopacheva Barsova G, Kim SW, Lal D, Letort JJ, Lopatin A, Mahdjoubi A, Mesbahi A, Netkovski J, Nyenbue Tshipukane D, Obando-Valverde A, Okano M, Onerci M, Ong YK, Orlandi R, Otori N, Ouennoughy K, Ozkan M, Peric A, Plzak J, Prokopakis E, Prepageran N, Psaltis A, Pugin B, Raftopoulos M, Rombaux P, Riechelmann H, Sahtout S,

Sarafoleanu CC, Searyoh K, Rhee CS, Shi J, Shkoukani M, Shukuryan AK, Sicak M, Smyth D, Sindvongs K, Soklic Kosak T, Stjarne P, Sutikno B, Steinsvag S, Tantilipikorn P, Thanaviratananich S, Tran T, Urbancic J, Valiulius A, Vasquez de Aparicio C, Vicheva D, Virkkula PM, Vicente G, Voegels R, Wagenmann MM, Wardani RS, Welge-Lussen A, Witterick I, Wright E, Zabolotniy D, Zsolt B, Zwetsloot CP (2020) European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020. *Rhinology* 58 Suppl 29: 1-464.

6. Dietz de Loos D, Lourijzen ES, Wildeman MAM, Freling NJM, Wolvers MDJ, Reitsma S, Fokkens WJ. Prevalence of chronic rhinosinusitis in the general population based on sinus radiology and symptomatology. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(3):1207-1214.
7. Miller JE, Taylor-Cousar JL, Beswick DM. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis in People with Cystic Fibrosis. *Sinusitis.* 2023; 7(2):27-37.
8. Di Cicco ME, Bizzoco F, Morelli E, Seccia V, Ragazzo V, Peroni DG, Comberiat P. Nasal Polyps in Children: The Early Origins of a Challenging Adulthood Condition. *Children (Basel).* 2021;8(11):997.
9. Hu D.L, Li S, Fang R, Ono K.H . Update on molecular diversity and multipathogenicity of staphylococcal superantigen toxins. *Animal Diseases.* 2021;1(1): 7.
10. Chegini Z, Didehdar M, Khoshbayan A, Karami J, Yousefimashouf M, Shariati A. The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Cell Commun Signal.* 2022 ;20(1):29.
11. Boyce JA. Mast cells can be commandeered for staphylococcal pathogenicity in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(1):103-104.
12. Ha JG, Cho HJ. Unraveling the Role of Epithelial Cells in the Development of Chronic Rhinosinusitis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18):14229.
13. Thammasit P, Sripetchwandee J, Nosanchuk JD, Chattipakorn SC, Chattipakorn N, Youngchim S. Cytokine and Chemokine Responses in Invasive Aspergillosis Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Past Evidence for Future Therapy of Aspergillosis. *J Fungi (Basel).* 2021;7(9):753.

14. Zhang J, Chen J, Robinson C. Cellular and Molecular Events in the Airway Epithelium Defining the Interaction Between House Dust Mite Group 1 Allergens and Innate Defences. *Int J Mol Sci.* 2018 ;19(11):3549.
15. Červený K, Janoušková K, Vaněčková K, Zavázalová Š, Funda D, Astl J, Holy R. Olfactory Evaluation in Clinical Medical Practice. *Journal of Clinical Medicine.* 2022; 11(22):6628.
16. Scherzad A, Hagen R, Hackenberg S. Current Understanding of Nasal Epithelial Cell Mis-Differentiation. *J Inflamm Res.* 2019;12:309-317.
17. Schuster R, Younesi F, Ezzo M, Hinz B. The Role of Myofibroblasts in Physiological and Pathological Tissue Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2023;15(1):a041231.
18. Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Paw M, Wnuk D, Koczurkiewicz P, Sanak M, Pękala E, Madeja Z. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(21):3943-3961.
19. Samitas K, Carter A, Kariyawasam HH, Xanthou G. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy.* 2018 ;73(5):993-1002.
20. Widdicombe JH. Early studies on the surface epithelium of mammalian airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2019;317(4):L486-L495.
21. Shang Y, Inthavong K, Tu J. Development of a computational fluid dynamics model for mucociliary clearance in the nasal cavity. *J Biomech.* 2019;85:74-83.
22. An MH, Lee PH, Choi SM, Hwang D, Kim JH, Park MC, Park S, Baek AR, Jang AS. Impact of the Junction Adhesion Molecule-A on Asthma. *Yonsei Med J.* 2023;64(6):375-383.
23. Klimek L, Hagemann J, Welkoborsky HJ, Cuevas M, Casper I, Förster-Ruhrmann U, Klimek F, Hintschich CA, Huppertz T, Bergmann C, Tomazic PV, Becker S. Epithelial immune regulation of inflammatory airway diseases: Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). *Allergol Select.* 2022;6:148-166.
24. Tomazic PV, Darnhofer B, Birner-Gruenberger R. Nasal mucus proteome and its involvement in allergic rhinitis. *Expert Rev Proteomics.* 2020 ;17(3):191-199.
25. Murdaca G, Paladin F, Gangemi S. Role of Vitamin D in the Clinical Course of Nasal Polyposis. *Biomedicines.* 2021;9(8):855.

26. Viksne RJ, Sumeraga G, Pilmane M. Antimicrobial and Defense Proteins in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(7):1259.
27. Vanderpool EJ, Rumbaugh KP. Host-microbe interactions in chronic rhinosinusitis biofilms and models for investigation. *Biofilm*. 2023;6:100160.
28. Xia Y, Wang H, Yin J. The Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Chronic Rhinosinusitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2022;183(10):1029-1039.
29. Bochner BS, Stevens WW. Biology and Function of Eosinophils in Chronic Rhinosinusitis With or Without Nasal Polyps. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2021;13(1):8-22.
30. Kato A, Schleimer RP, Bleier BS. Mechanisms and pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(5):1491-1503.
31. Imoto Y, Kato A, Takabayashi T, Stevens W, Norton JE, Suh LA, Carter RG, Weibman AR, Hulse KE, Harris KE, Peters AT, Grammer LC, Tan BK, Welch K, Shintani-Smith S, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP. Increased thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(6):1566-1574.e6.
32. Feng X, Payne SC, Borish L, Steinke JW. Differential Expression of Extracellular Matrix Components in Nasal Polyp Endotypes. *Am J Rhinol Allergy*. 2019;33(6):665-670.
33. Hong SY, Jiang HC, Xu WC, Zeng HS, Wang SG, Qin BL. Bioinformatics analysis reveals the potential role of matrix metalloproteinases in immunity and urolithiasis. *Front Immunol*. 2023;14:1158379.
34. Chen X, Chang L, Li X, Huang J, Yang L, Lai X, Huang Z, Wang Z, Wu X, Zhao J, Bellanti JA, Zheng SG, Zhang G. Tc17/IL-17A Up-Regulated the Expression of MMP-9 via NF- κ B Pathway in Nasal Epithelial Cells of Patients With Chronic Rhinosinusitis. *Front Immunol*. 2018;9:2121.
35. Lygeros S, Danielides G, Grafanaki K, Riga M. Matrix metalloproteinases and chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. Unravelling a puzzle through a systematic review. *Rhinology*. 2021;59(3):245-257.

36. Duan C, Yu X, Feng X, Shi L, Wang D. Expression Profiles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Nasal Polyps. *J Inflamm Res.* 2024;17:29-39.
37. Zhang L, Li Q, Liu Z, Liu W, Zhao M. Protective Effects of a Rho Kinase Inhibitor on Paraquat-Induced Acute Lung Injuries in Rats. *Inflammation.* 2018;41(6):2171-2183.
38. Huang Q, Le Y, Li S, Bian Y. Signaling pathways and potential therapeutic targets in acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Respir Res.* 2024;25(1):30.
39. Park SK, Jin SY, Yeon SH, Lee SB, Xu J, Yoon YH, Rha KS, Kim YM. Role of Toll-like receptor 9 signaling on activation of nasal polyp-derived fibroblasts and its association with nasal polypogenesis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018;8(9):1001-1012.
40. Gelardi M, Giancaspro R, Cassano M, Ribatti D. Nasal cytology and histology in CRSwNP: Two sides of the same coin. *Front Med (Lausanne).* 2023;10:1143351.
41. Upadhyya IB, Rao K. Sinonasal Inverted Papilloma: A Narrative Review. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022;74(Suppl 2):1017-1022.
42. Awosusi B. L, Rahman A. T. Inverted Sinonasal Papilloma: Update and Literature Review. *Asian Journal of Medicine and Health.* 2023; 21(11): 115-121.
43. Sehanobish E, Asad M, Barbi M, Porcelli SA, Jerschow E. Aspirin Actions in Treatment of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease. *Front Immunol.* 2021;12:695815.
44. Shin JM, Yang HW, Park JH, Kim TH. Role of Nasal Fibroblasts in Airway Remodeling of Chronic Rhinosinusitis: The Modulating Functions Reexamined. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 16;24(4):4017.
45. Zhao R, Guo Z, Zhang R, Deng C, Xu J, Dong W, Hong Z, Yu H, Situ H, Liu C, Zhuang G. Nasal epithelial barrier disruption by particulate matter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ via tight junction protein degradation. *J Appl Toxicol.* 2018;38(5):678-687.
46. Wang X, Wang W, Wang X, Wang M, Zhu L, Garba F, Fu C, Zieger B, Liu X, Liu X, Yao X. The septin complex links the catenin complex to the actin cytoskeleton for establishing epithelial cell polarity. *J Mol Cell Biol.* 2021;13(6):395-408.

47. Zhang R, Zhang L, Li P, Pang K, Liu H, Tian L. Epithelial Barrier in the Nasal Mucosa, Related Risk Factors and Diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2023;184(5):481-501.
48. Karki P, Birukov KG. Rho and Reactive Oxygen Species at Crossroads of Endothelial Permeability and Inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2019;31(13):1009-1022.
49. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):291. Karki P, Birukova AA. Microtubules as Major Regulators of Endothelial Function: Implication for Lung Injury. *Front Physiol.* 2021;12:758313.
50. Bissonnette EY, Lauzon-Joset JF, Debley JS, Ziegler SF. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Front Immunol.* 2020;11:583042.
51. Zhu Y, Sun X, Tan S, Luo C, Zhou J, Zhang S, Li Z, Lin H, Zhang W. M2 macrophage-related gene signature in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Front Immunol.* 2022;13:1047930.
52. Kardas G, Daszyńska-Kardas A, Marynowski M, Brząkalska O, Kuna P, Panek M. Role of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Asthma as an Immunoregulatory Factor Mediating Airway Remodeling and Possible Pharmacological Target. *Front Pharmacol.* 2020;11:47.
53. Piliponsky AM, Romani L. The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity. *Immunol Rev.* 2018;282(1):188-197.
54. Bachert C, Zhang N, Cavaliere C, Weiping W, Gevaert E, Krysko O. Biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(3):725-739.
55. Borish L. Aspirin-exacerbated Respiratory Disease: A Syndrome of Mast Cell-mediated PgD2 Overproduction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(6):651-652.
56. Stevens WW, Kato A. Group 2 innate lymphoid cells in nasal polyposis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021;126(2):110-117.
57. Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, Saito H, Honda K, Fukuchi M, Konno Y, Takeda M, Yamamoto Y, Hirokawa M, Fujieda S, Spencer LA, Weller PF. Charcot-Leyden

- crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood*. 2018;132(20):2183-2187.
58. Thompson-Souza GA, Vasconcelos CRI, Neves JS. Eosinophils: Focus on DNA extracellular traps. *Life Sci*. 2022;311(Pt B):121191.
 59. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, Ciceri F, Castagna A, Colombo G, Dagna L. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9095275.
 60. Gevaert P, Han JK, Smith SG, Sousa AR, Howarth PH, Yancey SW, Chan R, Bachert C. The roles of eosinophils and interleukin-5 in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2022;12(11):1413-1423.
 61. Enache I, IoniȚĂ E, Mitroi M, Anghelina F, MogoantĂ C, Ciolofan S, CăpitĂnescu A, Stepan A, Simionescu C. Histopathological Features of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Allergic Polyps. *Curr Health Sci J*. 2020;46(1):66-71.
 62. Carsuzaa F, Béquignon É, Dufour X, de Bonnecaze G, Lecron JC, Favot L. Cytokine Signature and Involvement in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):417.
 63. Patruno R, Passantino G, Laface C, Tinelli A, Zito A, Ruggieri R, Luposella F, Gadaleta P, Laforgia M, Lacitignola L, Ammendola M, Ranieri G, Zizzo N. Microvascular Density, Endothelial Area, and Ki-67 Proliferative Index Correlate Each Other in Cat Post-Injection Fibrosarcoma. *Cells*. 2020;10(1):31.
 64. Liu W, Liu X, Zhang N, Li J, Wen Y, Wei Y, Li Z, Lu T, Wen W. Microvessel quantification by fully convolutional neural networks associated with type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2022;128(6):697-704.e1.
 65. Marien KM, Croons V, Waumans Y, Sluydts E, De Schepper S, Andries L, Waelput W, Fransen E, Vermeulen PB, Kockx MM, De Meyer GR. Development and Validation of a Histological Method to Measure Microvessel Density in Whole-Slide Images of Cancer Tissue. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161496.
 66. Shukla RH, Nemade SV, Shinde KJ. Comparison of visual analogue scale (VAS) and the Nasal Obstruction Symptom Evaluation (NOSE) score in evaluation of post septoplasty patients. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2020;6(1):53-58.

67. Al-Ahmad M, Alsaleh S, Al-Reefy H, Al Abduwani J, Nasr I, Al Abri R, Alamadi AMH, Fraihat AA, Alterki A, Abuzakouk M, Marglani O, Rand HA. Expert Opinion on Biological Treatment of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in the Gulf Region. *J Asthma Allergy*. 2022;15:1-12.
68. Khan AH, Reaney M, Guillemin I, Nelson L, Qin S, Kamat S, Mannent L, Amin N, Whalley D, Hopkins C. Development of Sinonasal Outcome Test (SNOT-22) Domains in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Laryngoscope*. 2022;132(5):933-941.
69. Navid S, Fan C, O Flores-Villanueva P, Generali D, Li Y. The Fibroblast Growth Factor Receptors in Breast Cancer: from Oncogenesis to Better Treatments. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):2011.
70. Ribatti D. The discovery of the fundamental role of VEGF in the development of the vascular system. *Mech Dev*. 2019;160:103579.
71. Discoveries Interview: Professor Harold F. Dvorak on the discovery of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Discoveries (Craiova)*. 2016;4(3):e62.
72. Mohammadi M, Soltani M, Aghanajafi C, Kohandel M. Investigation of the evolution of tumor-induced microvascular network under the inhibitory effect of anti-angiogenic factor, angiostatin: A mathematical study. *Math Biosci Eng*. 2023;20(3):5448-5480.
73. Rüdiger D, Kick K, Goychuk A, Vollmar AM, Frey E, Zahler S. Cell-Based Strain Remodeling of a Nonfibrous Matrix as an Organizing Principle for Vasculogenesis. *Cell Rep*. 2020;32(6):108015.
74. Dudley AC, Griffioen AW. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*. 2023;26(3):313-347.
75. Zhang M, Tang B, Huang L, Xiong Y, Tu J, Jia Y, Jiang F, Shen L, Luo Q, Ye J. Hypoxia induces the production of epithelial-derived cytokines in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Immunopharmacol*. 2023;121:110559.
76. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev*. 2018;98(3):1591-1625.
77. Pasquini S, Contri C, Borea PA, Vincenzi F, Varani K. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7685.

78. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-1264.
79. Rosiek V, Janas K, Kos-Kudła B. Association between Biomarkers (VEGF-R2, VEGF-R3, VCAM-1) and Treatment Duration in Patients with Neuroendocrine Tumors Receiving Therapy with First-Generation Somatostatin Analogues. *Biomedicines*. 2023;11(3):842.
80. Zhou M, Tan KS, Guan WJ, Jiang LJ, Deng J, Gao WX, Lee YM, Xu ZF, Luo X, Liu C, Shi JB, Lai Y. Proteomics profiling of epithelium-derived exosomes from nasal polyps revealed signaling functions affecting cellular proliferation. *Respir Med*. 2020;162:105871.
81. Shimizu S, Tojima I, Nakamura K, Arai H, Kouzaki H, Shimizu T. Nasal polyp fibroblasts (NPFs)-derived exosomes are important for the release of vascular endothelial growth factor from cocultured eosinophils and NPFs. *Auris Nasus Larynx*. 2022;49(3):407-414.
82. Park SA, Jeong MS, Ha KT, Jang SB. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Rep*. 2018;51(2):73-78.
83. Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res*. 2020;127(2):310-329.
84. Hong T.U, Park S.K. The Roles of Vascular Endothelial Growth Factor, Angiostatin, and Endostatin in Nasal Polyp Development. *J Rhinol*. 2022;29(2):82-87.
85. Cho SW, Kim DY. Lessons From Localized Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2021;13(6):827-829.
86. Dżaman K, Czerwaty K. Roles of Exosomes in Chronic Rhinosinusitis: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11284.
87. Bequignon E, Mangin D, Bécaud J, Pasquier J, Angely C, Bottier M, Escudier E, Isabey D, Filoche M, Louis B, Papon JF, Coste A. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction. *J Transl Med*. 2020;18(1):136.
88. You K, Gu H, Yuan Z, Xu X. Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:727075.

89. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1057.
90. Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clin Chim Acta.* 2023;548:117487.
91. Vermot A, Petit-Härtlein I, Smith SME, Fieschi F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(6):890.
92. Shin JM, Yang HW, Park JH, Kim TH. Role of Nasal Fibroblasts in Airway Remodeling of Chronic Rhinosinusitis: The Modulating Functions Reexamined. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):4017.
93. Du K, Wang M, Zhang N, Yu P, Wang P, Li Y, Wang X, Zhang L, Bachert C. Involvement of the extracellular matrix proteins periostin and tenascin C in nasal polyp remodeling by regulating the expression of MMPs. *Clin Transl Allergy.* 2021;11(7):e12059.
94. Cho SW, Kim DY. Lessons From Localized Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2021;13(6):827-829.
95. Kim HJ, Park JH, Shin JM, Yang HW, Lee HM, Park IH. TGF- β 1-induced HSP47 regulates extracellular matrix accumulation via Smad2/3 signaling pathways in nasal fibroblasts. *Sci Rep.* 2019 ;9(1):15563.
96. Vigne J, Bay S, Aid-Launais R, Pariscoat G, Rucher G, Sénémaud J, Truffier A, Anizan N, Even G, Ganneau C, Andreato F, Le Borgne M, Nicoletti A, Le Guludec D, Caligiuri G, Rouzet F. Cleaved CD31 as a target for in vivo molecular imaging of inflammation. *Sci Rep.* 2019;9(1):19560.
97. Caligiuri G. CD31 as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2020;126(9):1178-1189.
98. Aulakh GK, Maltare S, Singh B. Lack of CD34 delays bacterial endotoxin-induced lung inflammation. *Respir Res.* 2021;22(1):69.
99. Aoki A, Hirahara K, Kiuchi M, Nakayama T. Eosinophils: Cells known for over 140 years with broad and new functions. *Allergol Int.* 2021;70(1):3-8.

100. Gigon L, Yousefi S, Karaulov A, Simon HU. Mechanisms of toxicity mediated by neutrophil and eosinophil granule proteins. *Allergol Int.* 2021;70(1):30-38.
101. Hughes MR, Canals Hernaez D, Cait J, Refaeli I, Lo BC, Roskelley CD, McNagny KM. A sticky wicket: Defining molecular functions for CD34 in hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2020 ;86:1-14.
102. Bachert C, Humbert M, Hanania NA, Zhang N, Holgate S, Buhl R, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* and its IgE-inducing enterotoxins in asthma: current knowledge. *Eur Respir J.* 2020 ;55(4):1901592.
103. Ferrari D, Vuerich M, Casciano F, Longhi MS, Melloni E, Secchiero P, Zech A, Robson SC, Müller T, Idzko M. Eosinophils and Purinergic Signaling in Health and Disease. *Front Immunol.* 2020 ;11:1339.
104. Simon HU, Yousefi S, Germic N, Arnold IC, Haczku A, Karaulov AV, Simon D, Rosenberg HF. The Cellular Functions of Eosinophils: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2020. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(1):11-23.
105. Son K, Small M, Sehmi R, Janssen L. The eosinophil actin cytoskeleton undergoes rapid rearrangement in response to fluid shear stress. *J Leukoc Biol.* 2020;108(1):129-137.
106. Vatrella A, Maglio A, Pelaia C, Ciampo L, Pelaia G, Vitale C. Eosinophilic inflammation: An Appealing Target for Pharmacologic Treatments in Severe Asthma. *Biomedicines.* 2022;10(9):2181.
107. Ueda Y, Nakagome K, Kobayashi T, Noguchi T, Soma T, Ohashi-Doi K, Tokuyama K, Nagata M. *Dermatophagoides farinae* Upregulates the Effector Functions of Eosinophils through α M β 2-Integrin and Protease-Activated Receptor-2. *Int Arch Allergy Immunol.* 2019;178(4):295-306.
108. Chegini Z, Didehdar M, Khoshbayan A, Karami J, Yousefimasouf M, Shariati A. The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):29.
109. Jo-Watanabe A, Okuno T, Yokomizo T. The Role of Leukotrienes as Potential Therapeutic Targets in Allergic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3580.

110. Lee J, Aoki T, Thumkeo D, Siriwach R, Yao C, Narumiya S. T cell-intrinsic prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling is critical in pathogenic TH17 cell-driven inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 ;143(2):631-643.
111. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, Racca F, Pelaia G, Canonica GW, Heffler E. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Front Physiol*. 2019;10:1514.
112. Li KL, Lee AY, Abuzeid WM. Aspirin Exacerbated Respiratory Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Med Sci (Basel)*. 2019 ;7(3):45.
113. Ueda Y, Nakagome K, Kobayashi T, Noguchi T, Soma T, Ohashi-Doi K, Tokuyama K, Nagata M. Effects of β 2-adrenergic agonists on house dust mite-induced adhesion, superoxide anion generation, and degranulation of human eosinophils. *Asia Pac Allergy*. 2020 ;10(2):e15.
114. Espersen J, Weber U, Römer-Franz A, Lenarz T, Stolle SRO, Warnecke A. Level of sex hormones and their association with acetylsalicylic acid intolerance and nasal polyposis. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243732.
115. Hussain M, Liu G. Eosinophilic Asthma: Pathophysiology and Therapeutic Horizons. *Cells*. 2024;13(5):384.
116. Dominas C, Gadkaree S, Maxfield AZ, Gray ST, Bergmark RW. Aspirin-exacerbated respiratory disease: A review. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2020;5(3):360-367.
117. Fettelet T, Gigon L, Karaulov A, Yousefi S, Simon HU. The Enigma of Eosinophil Degranulation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7091.
118. Peterson KA, Gleich GJ, Limaye NS, Crispin H, Robson J, Fang J, Saffari H, Clayton F, Leiferman KM. Eosinophil granule major basic protein 1 deposition in eosinophilic esophagitis correlates with symptoms independent of eosinophil counts. *Dis Esophagus*. 2019;32(11):doz055.
119. Zhang S, Wang Z. An Emerging Role of Extracellular Traps in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2023;23(12):675-688.
120. Meng Z, Zhang S, Li W, Wang Y, Wang M, Liu X, Liu CL, Liao S, Liu T, Yang C, Lindholt JS, Rasmussen LM, Obel LM, Stubbe J, Diederichsen AC, Sun Y, Chen Y, Yu PB, Libby P, Shi GP, Guo J. Cationic proteins from eosinophils bind bone

morphogenetic protein receptors promoting vascular calcification and atherogenesis. *Eur Heart J.* 2023;44(29):2763-2783.

121. Inglesby DC, Antonucci MU, Spampinato MV, Collins HR, Meyer TA, Schlosser RJ, Shimada K, Roberts DR. Spaceflight-Associated Changes in the Opacification of the Paranasal Sinuses and Mastoid Air Cells in Astronauts. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;146(6):571-577.
122. Zhu M, Gao X, Zhu Z, Hu X, Zhou H, Liu J. The roles of nasal nitric oxide in diagnosis and endotypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;49(1):68.
123. Gholam ADK, Gharibi R. Studying the relationship between the Lund Mackay score and response to medical treatment in patients with chronic sinusitis. *Int Tinnitus J.* 2021;24(2):96-101.
124. Brooks SG, Trope M, Blasetti M, Doghramji L, Parasher A, Glicksman JT, Kennedy DW, Thaler ER, Cohen NA, Palmer JN, Adappa ND. Preoperative Lund-Mackay computed tomography score is associated with preoperative symptom severity and predicts quality-of-life outcome trajectories after sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018 ;8(6):668-675.
125. Stupar M, Špreng D, Perić A. Application of questionnaires in the assessment of clinical severity of chronic rhinosinusitis. *Vojnosanitetski pregled.* 2020; 77(2): 182-188.
126. Taheri A, Hasani S, Saberi Esfeedvajani M, Saeedi M, Abolghasemi R. Sino-nasal outcome Test-22 and Lund–Mackay CT score to select endoscopic sinus surgery in chronic rhinosinusitis. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2023;1-6.
127. Plath M, Sand M, Cavaliere C, Plinkert PK, Baumann I, Zaoui K. Normative data for interpreting the SNOT-22. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2023 ;43(6):390-399.
128. Lou H, Zhang N, Bachert C, Zhang L. Highlights of eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps in definition, prognosis, and advancement. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018;8(11):1218-1225.
129. Yi F, Yang L, Wang S, Guo L, Huang C, Xie Y, Xiao G. Microvessel prediction in H&E Stained Pathology Images using fully convolutional neural networks. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):64.

130. Kowalski ML, Agache I, Bavbek S, Bakirtas A, Blanca M, Bochenek G, Bonini M, Heffler E, Klimek L, Laidlaw TM, Mullol J, Nizankowska-Mogilnicka E, Park HS, Sanak M, Sanchez-Borges M, Sanchez-Garcia S, Scadding G, Taniguchi M, Torres MJ, White AA, Wardzyńska A. Diagnosis and management of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (N-ERD)-a EAACI position paper. *Allergy*. 2019 ;74(1):28-39.
131. Scott WC, Cahill KN, Milne GL, Li P, Sheng Q, Huang LC, Dennis S, Snyder J, Bauer AM, Chandra RK, Chowdhury NI, Turner JH. Inflammatory heterogeneity in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1318-1328.e5.
132. Lyly A, Laidlaw TM, Lundberg M. Pathomechanisms of AERD-Recent Advances. *Front Allergy*. 2021;2:734733.
133. Rhyou HI, Nam YH, Park HS. Emerging Biomarkers Beyond Leukotrienes for the Management of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID)-Exacerbated Respiratory Disease. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2022 ;14(2):153-167.
134. Mullur J, Buchheit KM. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Updates in the era of biologics. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2023;131(3):317-324.
135. Hwang CS, Park SC, Cho HJ, Park DJ, Yoon JH, Kim CH. Eosinophil extracellular trap formation is closely associated with disease severity in chronic rhinosinusitis regardless of nasal polyp status. *Sci Rep*. 2019;9(1):8061.
136. Zhang S, Wang Z. An Emerging Role of Extracellular Traps in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2023;23(12):675-688.
137. Bachert C, Humbert M, Hanania NA, Zhang N, Holgate S, Buhl R, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* and its IgE-inducing enterotoxins in asthma: current knowledge. *Eur Respir J*. 2020;55(4):1901592.
138. Khurana N, Pulsipher A, Jedrzkiewicz J, Ashby S, Pollard CE, Ghandehari H, Alt JA. Inflammation-driven vascular dysregulation in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2021;11(6):976-983.
139. Liu W, Liu X, Zhang N, Li J, Wen Y, Wei Y, Li Z, Lu T, Wen W. Microvessel quantification by fully convolutional neural networks associated with type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2022;128(6):697-704.e1.

140. Mussad S, Dourra M, Thandra KC. Physiology, Major Basic Protein. 2023 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 33085271.
141. Hong T. U, Park S. K. The Roles of Vascular Endothelial Growth Factor, Angiostatin, and Endostatin in Nasal Polyp Development. *Journal of Rhinology*. 2022; 29.2: 82-87.
142. Woo SD, Luu QQ, Park HS. NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (NERD): From Pathogenesis to Improved Care. *Front Pharmacol*. 2020;11:1147.
143. Sokolowska M, Rovati GE, Diamant Z, Untersmayr E, Schwarze J, Lukasik Z, Sava F, Angelina A, Palomares O, Akdis CA, O'Mahony L, Sanak M, Dahlen SE, Woszczek G. Current perspective on eicosanoids in asthma and allergic diseases: EAACI Task Force consensus report, part I. *Allergy*. 2021;76(1):114-130.
144. Ualiyeva S, Hallen N, Kanaoka Y, Ledderose C, Matsumoto I, Junger WG, Barrett NA, Bankova LG. Airway brush cells generate cysteinyl leukotrienes through the ATP sensor P2Y2. *Sci Immunol*. 2020 ;5(43):eaax7224.
145. Stevens WW, Staudacher AG, Hulse KE, Carter RG, Winter DR, Abdala-Valencia H, Kato A, Suh L, Norton JE, Huang JH, Peters AT, Grammer LC, Price CPE, Conley DB, Shintani-Smith S, Tan BK, Welch KC, Kern RC, Schleimer RP. Activation of the 15-lipoxygenase pathway in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(2):600-612.
146. Syabbalo N. Targeting interleukin-4 and interleukin-13 in the treatment of severe eosinophilic asthma. *Arch Pulmonol Respir Care*. 2023; 9(1): 001-011.
147. Jaén M, Martín-Regalado Á, Bartolomé RA, Robles J, Casal JI. Interleukin 13 receptor alpha 2 (IL13R α 2): Expression, signaling pathways and therapeutic applications in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2022;1877(5):188802.
148. White AA, Stevenson DD. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(11):1060-1070.
149. Borish L, Eschenbacher W. Nasal polyposis: A neovascularization disorder? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2022;129(1):9-10.
150. Zhang M, Tang B, Huang L, Xiong Y, Tu J, Jia Y, Jiang F, Shen L, Luo Q, Ye J. Hypoxia induces the production of epithelial-derived cytokines in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Immunopharmacol*. 2023;121:110559.

151. Borowczyk J, Shutova M, Brembilla NC, Boehncke WH. IL-25 (IL-17E) in epithelial immunology and pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(1):40-52.
152. Ryu G, Kim DW. Th2 inflammatory responses in the development of nasal polyps and chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2020;20(1):1-8.
153. Ahern S, Cervin A. Inflammation and Endotyping in Chronic Rhinosinusitis-A Paradigm Shift. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(4):95.
154. Cho HJ, Kim CH. Oxygen matters: hypoxia as a pathogenic mechanism in rhinosinusitis. *BMB Rep.* 2018;51(2):59-64.
155. Korbecki J, Kojder K, Kapczuk P, Kupnicka P, Gawrońska-Szklarz B, Gutowska I, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. The Effect of Hypoxia on the Expression of CXC Chemokines and CXC Chemokine Receptors-A Review of Literature. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):843.
156. Yuan Z, Li Y, Zhang S, Wang X, Dou H, Yu X, Zhang Z, Yang S, Xiao M. Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. *Mol Cancer.* 2023;22(1):48.
157. Gevaert E, Delemarre T, De Volder J, Zhang N, Holtappels G, De Ruyck N, Persson E, Heyndrickx I, Verstraete K, Aegerter H, Nauwynck H, Savvides SN, Lambrecht BN, Bachert C. Charcot-Leyden crystals promote neutrophilic inflammation in patients with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(1):427-430.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Tijana Vukadinović, rođena je 26.12.1980. godine u Kragujevcu u Republici Srbiji, gdje je završila osnovnu školu „21. oktobar“. 1999. godine je završila Prvu kragujevačku gimnaziju, prirodno- matematički smjer, kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Nakon prepisa na Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, diplomirala je 2009. godine sa prosječnom ocjenom 9,58. Školske 2005/2006 godine bila je stipendista Crnogorske akademije nauka i umjetnosti. Stipendijom Univerziteta Crne Gore za postignute rezultate tokom studiranja nagrađena je školske 2006/2007 godine. Akademske 2009/2010 godine postala je saradnik na predmetu Anatomija, na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore. 2010. godine počinje da radi kao ljekar u Zavodu za hitnu medicinsku pomoć Crne Gore. Specijalizaciju iz otorinolaringologije je započela 2014. godine. Specijalistički ispit je položila 2018. godine pred komisijom Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu sa ocjenom odličan. Kao specijalista otorinolaringologije zaposlena je u Kliničkom Centru Crne Gore i angažovana kao saradnik na predmetu Anatomija Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore. Od 2019. godine nosilac je stipendije Ministarstva nauke Crne Gore za doktorska istraživanja.

2022. godine prijavila je polazna istraživanja pred komisijom na doktorskim studijama Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore pod nazivom „Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom“.

Kao rezultat istraživanja doktorske disertacije objavila je naučni rad „Angiogenesis and eosinophilia in the nasal mucosa of patients with different clinical phenotypes of chronic rhinosinusitis“ - Vukadinović T, Vuksanović Božarić A, Vukomanović Đurđević B, Radunović M, Perić A. *J Infect Dev Ctries.* 2023 Oct 31;17(10):1480-1488. doi: 10.3855/jidc.18166.

U toku studiranja učestvovala je na više stručnih i međunarodnih studentskih kongresa sa autorskim radovima, od kojih je rad „The most frequent causes of lethal outcome of patients with craniocerebral injuries“ osvojio prvo mjesto na „I Arkhangelsk International Medical student Conference“ 2008. godine u Rusiji.

Naučni radovi:

- Vukadinović T, Labus M, Spasić S, Đurđević BV, Perić A. Maxillary Sinus Lobular Capillary Hemangioma in a 15-Year-Old Boy. *Ear Nose Throat J.* 2023 Feb;102(2):117-120. doi: 10.1177/0145561321993597.
- Perić A, Matković S, Barać A, Vukadinović T, Čvorović L, Vojvodić D. Evaluation of substance P and bradykinin levels in nasal secretions of patients with nasal polyposis with and without sensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2022 Jun 29;7(4):928-934. doi: 10.1002/lio2.851.
- Perić A, Vukadinović T, Kujundžić T, Labus M, Stoiljkov M, Đurđević BV. Choanal polyps in children and adults: 10-year experience from a tertiary care hospital. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019 Jan;276(1):107-113. doi: 10.1007/s00405-018-5208-9.
- Radunovic M, Vukanovic-Bozanic A, Radojevic N, Vukadinovic T. A new anatomical variation of the musculocutaneous and the median nerve anastomosis. *Folia Morphol (Warsz).* 2013 May;72(2):176-9. doi: 10.5603/fm.2013.0030.

Ime i prezime _____

SINO-NASAL OUTCOME TEST (SNOT 22)

Ispod ćete naći listu socio-emocionalnih posledica Vašeg rinosinuzitisa. Molimo Vas da rangirate vaše probleme koje ste imali u prethodne dve nedelje.

	Bez problema	Veoma blag problem	Blag ili lagan problem	Umeren problem	Ozbiljan problem	Izuzetno ozbiljan problem
1. Potreba da izduvate nos						
2. Kijanje						
3. Curenje iz nosa						
4. Zapušenost nosa						
5. Gubitak čula mirisa i ukusa						
6. Kašalj						
7. Slivanje sekreta u ždrelo						
8. Gust nosni sekret						
9. Osecaj punoće u uvu						
10. Vrtoglavica						
11. Bol u uvu						
12. Bol ili pritisak u predelu lica						
13. Problemi sa nesanicom						
14. Buđenje u toku noći						
15. Manjak sna						
16. Umor nakon buđenja						

	Bez problema	Veoma blag problem	Blag ili lagan problem	Umeren problem	Ozbiljan problem	Izuzetno ozbiljan problem
17. Umor						
18. Smanjena produktivnost						
19. Smanjena koncentracija						
20. Frustriranost/ Nadraženost/ Uznemirenost						
21. Tuga						
22. Postiđenost						

Ime i prezime _____

VIZUELNA ANALOGNA SKALA (VAS)

Molimo Vas da na skali označite koliko su teški Vaši simptomi u ovom trenutku.

Glavobolja

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Zapušenost nosa

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Curenje iz nosa

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Slivanje sekreta iz nosa u ždreló

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Osećaj punoće u nosu i/ili sinusima

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Oslabljen osećaj za mirise

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Bol u predelu lica

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Bol u zubima

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Suzenje

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Kašljanje

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Krvarenje iz nosa

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Taloženje sasušenog sekreta u nosu

Bez tegoba |-----| Najgore tegobe

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tijana Vukadinović

Broj indeksa/upisa 20/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja,
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedio/la autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

Potpis doktoranda

U Podgorici, 09.12.2024. godine _____

Tijana Vukadinović

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tijana Vukadinović_____

Broj indeksa/upisa 20/09_____

Studijski program Medicina _____

Naslov rada **Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom**_____

Mentor Prof. dr Aleksandra Vuksanović-Božarić_____

Potpisani/a Tijana Vukadinović_____

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti, kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

Potpis doktoranda

U Podgorici, 09.12.2024. godine_

Vukadinović Tijana

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Imunohistohemijske karakteristike vaskularizacije i inflamatorne infiltracije nosne sluznice kod pacijenata sa hroničnim rinosinuzitisom

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Podgorici, 09.12.2024. godine

Veljko Petrović Stjara