

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Stjepan Grga Milanković

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

Doktorski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Stjepan Grga Milanković

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

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

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Doktorski rad

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

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

Stjepan Grga Milanković

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

Mentor 1: doc.dr.sc. Hrvoje Mihalj

Mentor 2: izv.prof.dr.sc. Stana Tokić

Kratki sažetak doktorskog rada: Metodom protočne citometrije zabilježena je povećana distribucija $\gamma\delta$ T-limfocita i subpopulacija $\delta 2+$ i $\delta 1-\delta 2-$ u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP. Također, metodom RT-PCR zabilježena je povećan genski izražaj IL-4 i IL-13 u tkivu polipa u odnosu na tkivo srednje nosne školjke (SNS) bolesnika eKRSsNP i kontrola. U ovom istraživanju dokazana je važna uloga $\gamma\delta$ T-limfocita u nastanku alergijskog KRSsNP, kao i snažna veza između opisanih stanica i najvažnijih citokina upale tipa 2 (IL-4 i IL-13).

Broj stranica: 99

Broj slika: 41

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 137

Jezik izvornika: hrvatski

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

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

PhD thesis

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science

Scientific Fields: Basic Medical Sciences and Biology

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

Stjepan Grga Milanković

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

Supervisors:

Menthor 1: Assistant. Prof. Hrvoje Mihalj, MD, PhD

Menthor 2 Assoc. Prof. Stana Tokić, PhD

Short abstract: An increased distribution of $\gamma\delta$ T-lymphocytes and $\delta 2+$ and $\delta 1-\delta 2-$ subpopulations in the polyp tissue of patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (eCRSwNP) was detected using the flow cytometry method. Also, using the RT-PCR method, increased gene expression of IL-4 and IL-13 was recorded in the polyp tissue compared to the tissue of the middle nasal turbinate of eCRSwNP patients and controls. In this research, we proved the importance of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in the development of eCRSwNP, as well as the strong connection between the described cells and the most important cytokines of type 2 inflammation (IL-4 and IL-13).

Number of pages: 99

Number of figures: 41

Number of tables: 15

Number of references: 137

Original in: Croatian

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

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

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

ZAHVALE

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

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

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

Zahvaljujem i prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. na stručnim savjetima i prijedlozima u samom istraživanju.

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

Hvala svima od srca.

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

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Fiziologija respiratorne sluznice u nosu i paranasalnim sinusima	1
1.2. Kronični rinosinitis.....	2
1.3. Epidemiologija kroničnog rinosinitisa	4
1.4. Etiologija kroničnog rinosinitisa	5
1.5. Dijagnostika i liječenje kroničnog rinosinitisa	6
1.6. Mikrobiom nosne sluznice u kroničnom rinosinitisu	10
1.7. Th2 upala.....	11
1.7.1. Signalni put Th2 upale na nosnoj sluznici	11
1.8. $\gamma\delta$ T-limfociti.....	14
1.9. Uloga $\gamma\delta$ T-limfocita u eKRS.....	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	17
3. Materijali i metode	18
3.1. Bolesnici i klinička evaluacija proširenosti eKRSsNP.....	18
3.2. Rutinska laboratorijska obrada.....	18
3.3. Uzorkovanje tkiva sinonazalne sluznice i nosnog polipa.....	22
3.4. Izolacija i kriokonzervacija mononuklearnih stanica iz tkiva	22
3.5. Imunofenotipizacija $\gamma\delta$ T-limfocita metodom protočne citometrije.....	24
3.5.1. Izrada kompenzacijske matrice	25
3.5.2. Isključivanje nevjabilnih stanica iz analize	26
3.5.3. Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela i imunofenotipizacija PBMC stanica.....	26
specifičnim fluorescentno obilježenim protutijelima od interesa i protočna citometrija	26
3.6. Izolacija ukupne RNA iz tkivnih mononuklearnih stanica.....	27
3.6.1. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)	27
3.7. Kvantitativna analiza transkriptoma mononuklearnih stanica izoliranih iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa primjenom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR)..	28
3.7.1. Priprema standardnih krivulja	30
3.7.2. Kvantifikacija genske ekspresije metodom 2-$\Delta\Delta$Ct	31
3.8. Uzorkovanje obrisaka sluznice sinusa i nosne šupljine za mikrobiološku analizu	32
3.9. Patohistološka analiza na prisutnost eozinofila u uzorcima sluznice srednje nosne školjke i nosnog polipa	32
3.10. Statističke metode.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta ($\gamma\delta$) T-limfocita u nosnim polipima eKRSsNP bolesnika te sluznici srednje nosne školjke (SNS) eKRSsNP i kontrolnih ispitanika.....	36

4.2. Usporedba izražaja gena između skupina.....	49
4.3. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1,TRDV2, IL-4 u uzorcima polipa s kliničkim (udio eozinofila, Lund Mackey, Malm, ukupni IgE, SNOT 22) i upalnim (hsCRP) pokazateljima težine oboljenja u eKRSsNP bolesnika.....	50
4.4. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1,TRDV2, IL-4 u uzorcima srednje nosne školjke (SNŠ) s kliničkim (udio eozinofila, Lund Mackey, Malm, ukupni IgE i SNOT22) i upalnim (hsCRP) pokazateljima težine oboljenja eKRSsNP skupine.....	54
4.5. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorcima srednje nosne školjke (SNŠ) s kliničkim (udio eozinofila, ukupni IgE i SNOT22) i upalnim (hsCRP) pokazateljima težine oboljenja u kontrolnih ispitanika	56
4.6. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku polipa kod eKRSsNP bolesnika sa $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2-.....	57
4.7. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP s $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2-	60
4.8. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika s $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2-	63
4.9. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku polipa s δ 1- δ 2+, δ 1+ δ 2+, δ 1+ δ 2- u bolesnika sa eKRSsNP.....	64
4.10. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ s δ 1- δ 2+, δ 1+ δ 2+, δ 1+ δ 2- u bolesnika sa eKRSsNP.....	65
4.11. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ s δ 1- δ 2+, δ 1+ δ 2+, δ 1+ δ 2- kod kontrolnih ispitanika	66
4.12. Međugenska povezanost u uzorku polipa kod bolesnika s alergijskim kroničnim rinosinitisom s nosnom polipozom (eKRSsNP).....	68
4.13. Međugenska povezanost u uzorku srednje nosne školjke (SNŠ) kod bolesnika sa eKRSsNP. 69	
4.14. Međugenska povezanost u uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika	70
5. RASPRAVA.....	72
5.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta T stanica u tkivu polipa bolesnika sa eKRSsNP i tkivu SNŠ bolesnika s eKRS te kontrolnih ispitanika značajno se razlikuje.....	72
5.2. Povezanost kliničkih i upalnih biljega sa subpopulacijom gamma delta T-limfocita	74
5.3. IL-4 i IL-13 izražaj i povezanost s $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima	75
5.4. GATA3 genski izražaj i povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima	77
5.5. Genski izražaj TRDV1 i TRDV2 te povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima.....	77
5.6. Međugenska povezanost između ispitivanih gena.....	78
5.7. Ograničenje istraživanja.....	78
6. ZAKLJUČAK	80
7. Reference.....	81
8. SAŽETAK.....	91
9. SUMMARY	93
10. Životopis.....	95

KRATICE:

ARS – akutni rinosinitis

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

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

KRSsNP – kronični rinosinitis s nosnom polipozom

KRSbNP – kronični rinosinitis bez nosne polipoze

CT PNS – kompjutorizirana tomografija paranazalnih šuplina

neKRS – neozinofilni kronični rinosinitis

eKRS – eozinofilni kronični rinosinitis

AR – alergijski rinitis

TGF – *engl. transforming growth factor*

TCR – *engl. T cell receptor*

MHC – *engl. Major histocompatibility complex*

TLR – *engl. Toll like receptor*

NK – *engl. Natural killer*

hsCRP – *engl. High sensitive C reactive protein*

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

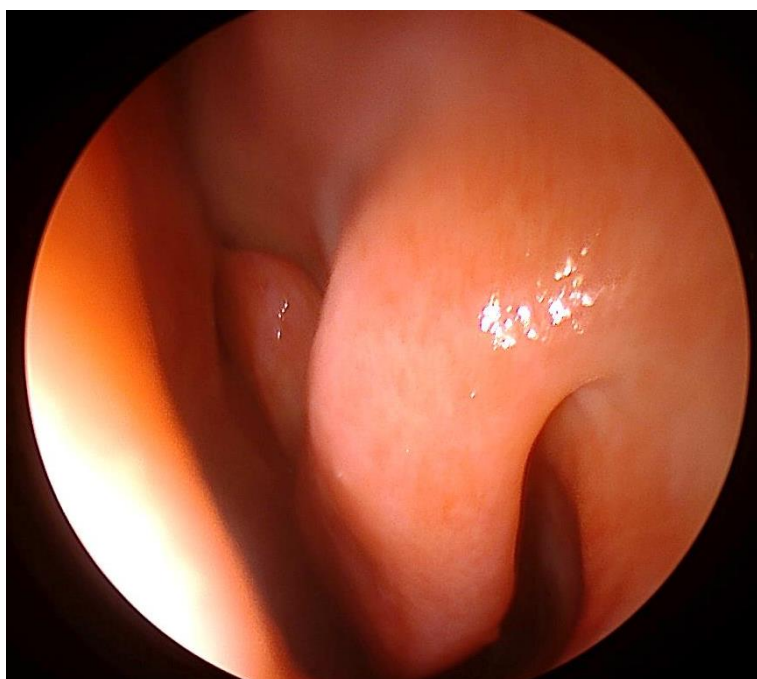
SHH – *engl. sonic hedgehog*

1. UVOD

1.1. Fiziologija respiratorne sluznice u nosu i paranazalnim sinusima

Uloga je nosa u disanju višestruka. U minuti udahnemo između 12 i 24 puta, i to u prosjeku 12000 litara zraka na dan različite temperature i vlažnosti, pomiješanog s prašinom i mikroorganizmima. Funkcije su nosa: osjet njuha, imunološka uloga, mukocilijarni transport, filtracija zraka, zagrijavanje i ovlaživanje zraka, nosni ciklus i dinamika protoka zraka. U području etmoidne kosti nalaze se specijalizirane stanice za osjet njuha – završeci olfaktornoga živca koji su dio živčanoga sustava. Donji dio nosne šupljine prekriven je sluznicom, nosnim dlačicama i cilijama s pomoću kojih nos obavlja svoje funkcije (slika 1). Nosne dlačice sprečavaju prolazak većih čestica prema plućima dok cilije i mukozni sekret prašinu i patogene transportiraju do ždrijela gdje dalje bivaju uništeni u probavnom traktu. Osim čišćenja zraka, nos zagrijava i vlaži udahnuti zrak i time ga priprema za prolazak do pluća. Šupljine paranazalnih sinusa prekrivene su respiratornim epitelom (jednoslojni cilindrični epitel s cilijama). Iako funkcija paranazalnih sinusa nije do danas u potpunosti razjašnjena, poznato je da im je uloga stvaranje i drenaža stvorenog sekreta prema nosnoj šupljini i nazofarinksu kako bi se regulirao tlak u nosnoj šupljini. Također, čine i imunološku barijeru stvarajući antimikrobne proteine i s pomoću mukoznog sekreta nakupljene mikrobe na sluznici nosa transportiraju prema nazofarinksu. Osim imunološke uloge, smatra se da imaju ulogu u rezonanciji glasa, potpori neurokranija i viscerokranija, zagrijavanju i ovlaživanju zraka (Beule, 2010).

Nosna sluznica predstavlja prvu barijeru obrane i kontakta sa svim inhaliranim česticama i antigenima (Himi T, 2011). Jedan od uzroka nastanka kroničnog rinosinuitisa, alergijskog rinitisa, ali i astme i atopijskog dermatitisa jest narušavanje epitelne barijere, tijesnih spojeva (*eng. tight junction – TJ*) i adherirajućih spojeva u epitelu, čime je patogenima i alergenima put prema unutarnjem tkivu slobodan (Steelant, 2018). U nosnoj sluznici imunološku barijeru čine T i B-limfociti, dentritičke stanice, makrofazi i antigen prezentirajuće stanice koje čine nosno limfoidno tkivo (*engl. Nasal lymphoid tissue – NALT*) (Heritage, 1997) (Mutoh M, 2016). Inhalirani antigeni transportiraju se do NALT-a s pomoću antigen prezentirajućih stanica i obrađuju se s pomoću dentritičkih stanica za predodjenje T-limfocitima. Aktivacijom T-limfocita i produkcijom citokina stvara se mikrookolina za IgA protutijela koja se pojačano stvaraju radi imunološke obrane od patogena (Himi T, 2011).



Slika 1. Endoskopski prikaz zdrave nosne sluznice. Vlastiti izvor

1.2. Kronični rinosinitis

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

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

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

Kronični rinosinitis složena je heterogena upalna bolest s različitim fenotipovima i endotipovima. Prema EPOS smjernicama, klinička definicija kroničnog rinosinitisa u odraslih definirana je kao upala nosa i paranazalnih sinusa karakteriziranih s dvama ili više simptoma

od kojih vodeći simptom mora biti jedno od sljedećeg: nosna opstrukcija, nosna kongestija ili nosna sekrecija (prednji ili postnazalni drip), uz prisutnost ili pritiska/boli u licu ili gubitak ili poremećaj osjeta njuha uz trajanje opisanih simptoma duže od 12 tjedana uzastopno.

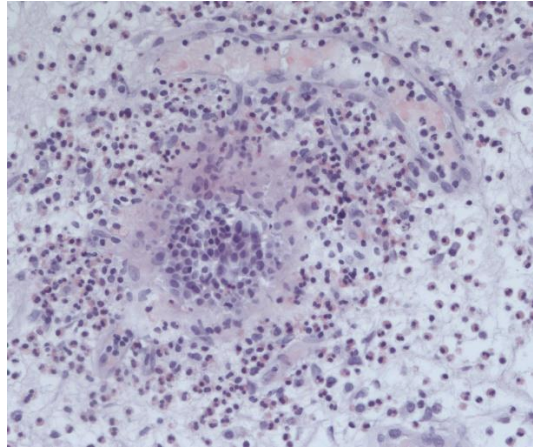
Akutni i kronični rinosinuitis povezani su sa značajno lošijom kvalitetom života, što je dokazivo ispunjavanjem različitih upitnika od koji je najpoznatiji SNOT-22 (*engl. sinonasal outcome score*) koji bolesnici samostalno ispunjavaju i subjektivno procijenjuju intenzitet različitih simptoma.

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

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

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

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



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

1.3. Epidemiologija kroničnog rinosinitisa

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

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

1.4. Etiologija kroničnog rinosinuitisa

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

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

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

1.5. Dijagnostika i liječenje kroničnog rinosinuitisa

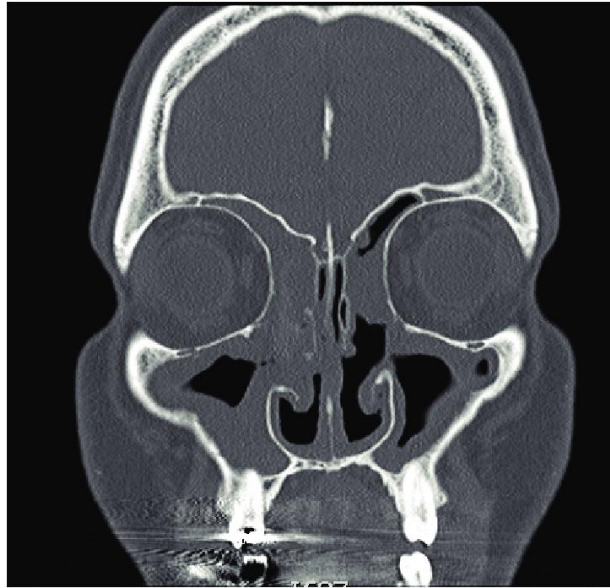
Dijagnostikom i liječenjem KRS bavi se otorinolaringolog, koji obradu i dijagnostiku započinje anamnezom i kliničkim pregledom. Potrebno je prikupiti važne informacije o duljini, težini i vrsti simptoma povezanih s nosom i paranazalnim sinusima. Klinička dijagnoza kroničnog rinosinuitisa može se postaviti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

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

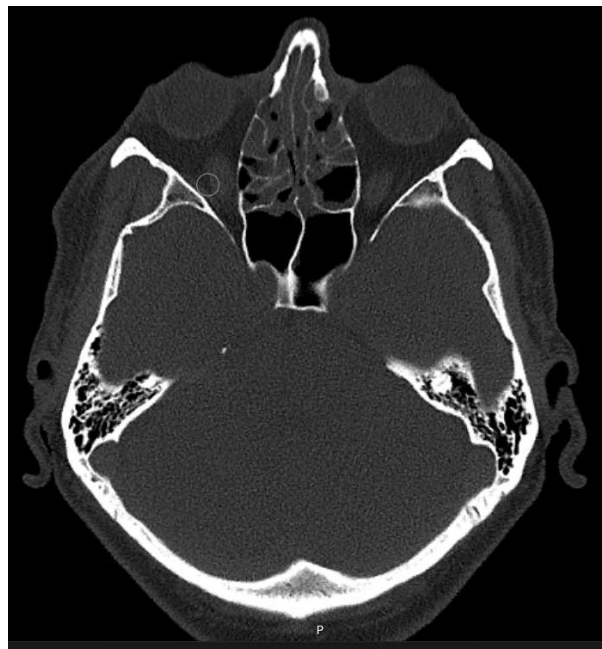
Tablica 1. Klasifikacija endoskopskog nalaza nosne polipoze po Malmu. Izvor: (Malm, 1997).

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

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



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



Slika 3b. CT PNŠ - transverzalni presjek kroz prednje i stražnje etmoidne sinuse ispunjene nosnom polipozom. Vlastiti izvor.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ako kirurško liječenje u kombinaciji s optimalnom medikamentoznom terapijom ne ostvari zadovoljavajuće rezultate, potrebno je razmotriti i dodatnu terapiju, u prvome redu biološku terapiju. Kirurško liječenje KRS-a samo je jedan korak u kroničnom liječenju te bolesti, gdje se pripremaju bolji uvjeti za lokalnu terapiju koju će bolesnik nastaviti nakon operativnog zahvata.

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

- 1) dokazani eKRS (≥ 10 tkivnih eozinofila na preparatu ili ≥ 250 eozinofila u krvi ili \geq ukupni IgE u krvi)
- 2) potreba za barem 2 ciklusa sistemskih kortikosteroida ili kontinuirana primjena sistemskih kortikosteroida (≥ 2 ciklusa godišnje ili dugoročna (>3 mjeseca) primjena niskih doza kortikosteroida ili kontraindikacija primjene sistemskih kortikosteroida)

- 3) značajno loša kvaliteta života prema SNOT 22 (≥ 40)
- 4) anosmija na olfaktometrijskom testu
- 5) dijagnosticirana astma i potreba za inhalacijskim kortikosteroidima (Fokkens, 2020).

1.6. Mikrobiom nosne sluznice u kroničnom rinosinuitisu

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

Usporedbom mikrobiote prije i nakon medikamentozne terapije KRS značajno se smanjuje raznolikost i rasprostranjenost bakterija na sluznici nosa. Također, u presječnoj studiji dokazano je da kirurško liječenje utječe na mikrobiotu u sinusima smanjujući količinu bakterija (Feazel L.M., 2012). Kirurško liječenje jednak utjecaj ima i na gljivičnu floru koja se značajno smanjuje u sinusnim šupljinama nakon endoskopske operacija sinusa.

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

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

1.7. Th2 upala

Stanice Th2 upalnog odgovora (*engl. type 2 helper T cells – Th2*) podvrsta su CD4+ T stanica karakteriziranih stvaranjem Th2 citokina – interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5) i interleukin 13 (IL-13). Th2 stanice prisutne su često u tkivu ka od alergije i poznato je da imaju važnu ulogu u patogenezi alergijskih bolesti.

Poznato je da Th2 stanice izražavaju i receptor za interleukin 33 (IL-33) koji se otpušta tijekom ozljede tkiva. Th2 stanice uključene su u proces popravka tkiva koje je ozlijeđeno parazitskom infekcijom, kućnom prašinom i zračnim česticama. Proizvodnjom IL-4 i IL-13 aktiviraju se makrofazi i epitelne stanice koje pojačavaju stvaranje ekstracelularnog matriksa (*engl. Extracelullar matrix – ECM*), koji je ključan za popravak tkiva. Nakon što popravak tkiva postane kroničan proces, pretjeran i nekontroliran, može doći do patološke fibroze u različitim organskim sustavima. Popravak tkiva uključuje stvaranje i razgradnju ECM u tkivu polipa i predstavlja važan proces u patogenezi KRSsNP (Du K, 2021).

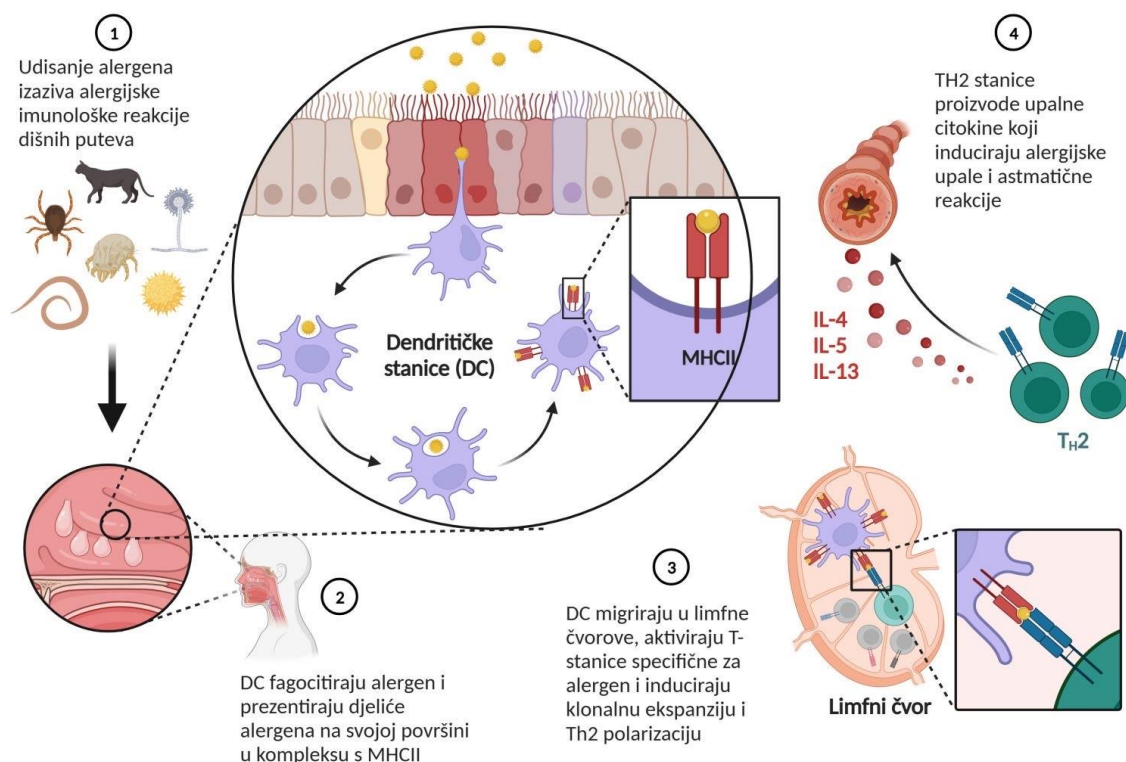
Smatra se da je Th2 adaptivni upalni odgovor najznačajniji u nastajanju nosne polipoze (Ryu G, 2020), međutim nepoznati su okidači upale, a i uloga prirođenih limfocitnih linija u inicijaciji i održavanju alergijske reakcije u sinonazalnoj sluznici.

Disfunkcijom respiracijskog epitela u nosnoj sluznici dolazi do olakšanog pristupa antigena do podsluznice, a time i do sistemske cirkulacije. Inhalacijom alergena dolazi do izravne degranulacije mastocita zbog oštećenja respiracijskog epitela nosa. Medijatori mastocita, a ujedno i Th2 citokini IL-4 i IL-13 otpuštaju se u podsluznici kao odgovor na alergene u senzibiliziranog domaćina i doprinose disfunkciji epitelne barijere. Od ranije je poznato da su KRS i alergijski rinitis (AR) rizični čimbenici za obolijevanje od astme, a djelomično je za taj rizik odgovorna disfunkcija epitelne barijere koja je zajednička tim kroničnim stanjima (Hellings, 2020). U KRS dolazi do oštećenja respiracijskog epitela s pločastom metaplazijom, destrukcijom cilija, povećanjem broja mukoznih žlijezda i hiperplazijom vrčastih stanica. U donjem dišnom putu, u remodeliranju strome sudjeluju stanice Th2 upale koje stvaraju subepitelijalnu fibrozu. Kroz IL-13 ovisnu indukciju transformirajućeg čimbenika rasta – β (TGF- β) stvaraju se proteini ekstracelularnog matriksa (ECM) (Richter, 2001).

1.7.1. Signalni put Th2 upale na nosnoj sluznici

U bolesnika s AR i eKRS, ulaskom alergena poput peludi i grinja u nosnu sluznicu, dendritičke stanice prepoznaju ih i prezentiraju do nezrelih CD4⁺ T stanica koje se pod utjecajem IL-4 diferenciraju u Th2 limfocite fosforilacijom STAT6 (*engl. Signal transducer and activator of transcription 6*) i povećanim izražajem GATA3. IL-4 važan je u diferencijaciji B limfocita u alergijski specifične B-limfocite koji produciraju IgE (Fujieda, 2019), dok je GATA3 važan za funkciju Th2 limfocita jer je uključen u remodelaciju kromatina na genskim lokusima Th2 citokina (Kokubo, 2022). GATA3 također ima važnu ulogu u razvoju fenotipa Th2 limfocita istodobno inhibirajući stvaranje Th1 limfocita (Ouyang W, 1998). Nakon oštećenja nosnog epitela parazitskom infekcijom, česticama kućne prašine ili zračnim česticama, unutarnji imunološki sustav aktivira citokine, poput timusnog stromalnog limfoidnog neoplastičnog faktora (*engl. thymic stromal lymphoid neoplastic factor -TSLP*), IL-25, IL-33 koji se luče iz oštećenih epitelnih stanica. TSLP aktivira lokalne dendritičke stanice na sekreciju kemokinskog liganda 22 (CCL22) i CCL17, što potiče diferencijaciju Th2 limfocita. IL-25 potiče stvaranje IL-4, IL-5 i IL-13 iz antigen prezentirajućih stanica i također pospješuje diferencijaciju Th2 limfocita (Roan, 2019). Sinteza IL-5 i diferencijacija CD4⁺ limfocita izraženija je u polipima oboljelih od eKRS (Inuma T, 2015). Slijed događaja i Th2 upale u sinonazalnoj sluznici prikazan je na slici 4.

Alergijska senzibilizacija dišnih puteva



Slika 4. Shematski prikaz slijeda događaja Th2 upale u sinonazalnoj sluznici. Vlastiti izvor, kreirano pomoću Biornder programskog alata.

Uspoređujući perenijalni alergijski rinitis (PAR) s kroničnim infektivnim rinitisom (KIR), dokazan je veći izražaj IL-4 i IL-5 u oboljelih od PAR. (Pawankar, 1996). IL-4 i IL-13 citokini potiču izražaj SHH (*engl. Sonic Hedgehog*) puta koji pridonosi preoblikovanju sinonazalnog epitela u alergiji dišnog puta. U preoblikovanju sluznice u astmi, IL-13 potiče metaplaziju sluznice, hipersekreciju sluzničnih žlijezda te proliferaciju fibroblasta, miofibroblasta i glatkih mišićnih stanica u bronhima. Istovremeno, IL-4 potiče stvaranje kolagena i fibronektina u podsluznici i doprinosi dugoročnom preoblikovanju sluznice u bolesnika s teškom astmom. IL-13 se veže na podjedinicu IL-13R α 1 i zajedno s IL-4R α stvara složeni receptor IL-13R α 1/IL-4R α koji aktivira brojne signalne puteve, poput tirozin kinaze 2 i Janus kinaze (JAK). Aktivacijom JAK-a izravno se fosforilira i aktivira STAT6 koji potiče izražaj gena odgovornih za staničnu proliferaciju, upalu, sintezu IL-4 i IL-13 citokina, kemokina, kolagena, mucina i hiperreaktivnost dišnog epitela. Suprotno tome, inhibicija STAT6 smanjuje izražaj SHH, ali i metaplaziju vrčastih stanica i hiperaktivnost dišnih puteva (Wang X, 2020). Više studija zabilježilo je prisutnost i $\gamma\delta$ T-limfocita u Th2 upali (Li X. W., 2019) (Born, 2010). Limfociti $\gamma\delta$ T pronađeni su u mišjim i humanim modelima tijekom

trudnoće u dišnim putevima bolesnika s astmom te, u jetri miševa inficiranih s *Leishmania major*, ali i u ranim stadijima melanoma u miševa. Nije jasno zbog čega su $\gamma\delta$ T-limfociti u značajnim količinama u tim upalama Th2 (Born, 2010).

1.8. $\gamma\delta$ T-limfociti

T-limfociti koji se pojavljuju u respiratornoj i gastrointestinalnoj sluznici imaju važnu ulogu u regulaciji sluzničnog imunološkog odgovora na strane antigene koji dolaze na površinu sluznice. T-limfociti prepoznaju antigene preko heterodimernog površinskog receptora (*engl. T-cell receptor, TCR*). Većina T-limfocita veže $\alpha\beta$ TCR, koji prepoznaju peptidne antigene u kompleksu s molekulama glavnog sustava histokompatibilnosti (*engl. major histocompatibility complex, MHC*). Kasnije, otkriven je i drugi oblik heterodimernih receptora, poznat kao $\gamma\delta$ TCR. Kao i kod α i β TCR lanaca, raznolikost γ i δ lanaca ovisi o rekombinaciji različitih V (14 za γ -lanac, 8 za δ -lanac), D (3 samo za δ -lanac) i J (5 za γ -lanac, 4 za δ -lanac) genskih varijanti smještenih unutar lokusa TRG (7p15-p14) i TRD (14q11.2) (Hirata, 2000). Limfociti $\gamma\delta$ T koji čine do 5 % limfocita T u krvi i čak 10-100 % T-limfocita naseljavaju sluznice i epitelne površine pluća, crijeva i kože (Nielsen, 2017). U ljudi je opisano više $\gamma\delta$ T subpopulacija čiji je biološki značaj nejasan. Prema repertoaru δ lanaca, $\gamma\delta$ stanice najčešće se dijele u tri razreda ($\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$), od kojih $\delta 2^+$ stanice dominantno prebivaju u perifernoj krvi najčešće izražavaju i $\gamma 9$ lanac, a $\delta 1/\delta 3$ linije uglavnom nalazimo u tkivima i sluznicama te izražavaju raznolike γ -lanace ($\gamma 2, \gamma 3, \gamma 4, \gamma 5, \gamma 8, \gamma 9$) (Zarobkiewicz, 2021). T-limfociti V $\delta 1$ i V $\delta 2$ izražavaju i receptore TLR (*engl. toll like receptor*) i NK (*engl. Natural killer*), što im omogućava odgovor na mnoge mikrobne antigene te transformirane i inficirane stanice domaćina. Jednom aktivirani $\gamma\delta$ T-limfociti izražavaju brzi efektorski odgovor lučenjem citokina, kemokina, antiviralnih i antimikrobnih čimbenika, a mogu djelovati citotoksično i prema tumorskim stanicama (Caccamo N, 2006) (Agrati C C. E., 2009). Periferni udjeli $\gamma\delta$ T-limfocita značajno se smanjuju u starijoj dobi, ponajviše odjeljak $\delta 2^+$ stanica. Ove promjene su štoviše, izraženije u ispitanika muškog spola u odnosu na ženske ispitanike iste dobi. Osim dobi i spola, udjeli $\gamma\delta$ T-limfocita variraju i u odnosu na rasu, pa tako bijelci posjeduju dvostruko manje $\gamma\delta$ T stanica u usporedbi sa Zapadnim Afrikancima. Zanimljivo, Europljana oko 70% $\gamma\delta$ T-limfocita sadrži $\gamma 9$ lanac u perifernoj krvi (Bank, 2014). Ovisno o izražaju upalnih citokina i površinskih biljega, $\gamma\delta$ T-limfociti mogu se podijeliti u više funkcionalnih podtipova nalik različitim inačicama adaptivnih T-limfocitnih linija, stoga se često nazivaju $\gamma\delta$ T-limfocitima

nalik na Th1, -Th2, -Th9, - Th17, -Tfh, -Treg (*od engl. regulatory T*) ili antigen-prezentirajuće stanice. Različiti podtipovi $\gamma\delta$ T-limfocita razlikuju se prema V genima zbog čega i mogu prepoznati različite antigene i prezentirajuće molekule. Npr, humani $\gamma\delta$ TCR koji se koristi genima V γ 9 i V δ 2 često prepoznaju butyrophilin 3A1 združen s fosforiliranim metaboličkim produktima sinteze izoprenoida u ciljnim stanicama (Yang, i dr., 2019). Drugi butirofilini, poput CD1d, mogu biti meta drugih podskupina humanih $\gamma\delta$ T-limfocita, koji su definirani lancem V δ 1 (Melandri, i dr., 2018) (Adams, Gu, & Luoma, 2015). Većina $\gamma\delta$ T-limfocita uz $\gamma\delta$ TCR, izražavaju CD8 koreceptorske molekule ili CD8- CD4- (dvostruko negativni) koreceptorski profil, a vrlo rijetko izražavaju CD4. Velik broj $\gamma\delta$ T-limfocita diferencira se i mobilizira u fetalnom timusu, odakle migriraju u periferna tkiva, gdje posreduju brze, citotoksične učinke u obrani od brojnih virusnih i bakterijskih infekcija.

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

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

1.9. Uloga $\gamma\delta$ T-limfocita u eKRS

U mišjim modelima alergijskih upalnih bolesti dišnog sustava, otkriveno je da subpopulacija V γ 1+ $\gamma\delta$ T-limfocita potiče upalni odgovor tipa 2 i pojačanu eozinofilnu infiltraciju, dok V γ 4+ $\gamma\delta$ T-limfociti potiskuju upalu. Studije provedene na humanim uzorcima sinonazalne sluznice KRSsNP oboljelih također upućuju na pojačani izražaj V γ 1 mRNA (Lee W. C., 2017). U sinonazalnoj sluznici oboljelih od eozinofilnog oblika KRSsNP zabilježena je

pojačana sekrecija IL-4, IL-5, IL-13, GATA3 i eozinofilnog kationskog proteina (EKP) (Li X. W., 2019), dok je u studiji Babe i suradnika (Baba, 2015) značajno niži izražaj GATA3 u bolesnika s kroničnom polipozom. Li i suradnici također su zabilježili i povećani udio $\gamma\delta$ T-limfocita, što potvrđuje važnu ulogu $\gamma\delta$ T stanica i upalnog odgovora tipa 2 u KRSsNP. Mišje $V\gamma 6$ T stanice proizvode IL-17, dok $\gamma\delta$ T stanice nalik Th17 limfocitima, pojačavaju infiltraciju neutrofila i eozinofila u akutnoj fazi upale, ali imaju protuupalne učinke u kroničnoj fazi. Ljudske $V\gamma 9\delta 2$ T stanice mogu pokazivati karakteristike slične Th1 ili Th2 upali kao odgovor na određene vrste stimulacije (Hsu, 2023). Štoviše, u mišjim modelima, uočeno je da primjena anti- $V\gamma 1$ protutijela smanjuje upalni odgovor tipa 2 i eozinofilnu infiltraciju, ali je potencijalna uloga humanih $\delta 1$, $\delta 2$ i $\delta 3$ podvrsta u uvjetima upale eKRSsNP u potpunosti nepoznata.

U ovoj studiji istražila se pojavnost $\gamma\delta$ T stanica i njihovih podskupina u nosnim polipima u bolesnika s dokazanim eKRSsNP i usporedila se s uzorcima srednje nosne školjke istih bolesnika i srednje nosne školjke u kontrolnoj skupini. Također, uspoređivane su i istražene povezanosti između kliničkih pokazatelja bolesti eKRS s frekvencijom pojavnosti stanica $\gamma\delta$ T i njihovih podskupina.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti pojavnost $\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija ($V\delta1+$ $V\delta2-$, $V\delta1-$ $V\delta2+$, $V\delta1-$ $V\delta2-$) u sluznici srednje nosne školjke i nosnog polipa oboljelih od eKRSsNP te usporediti s pojavnošću istih staničnih populacija u sluznici srednje nosne školjke kontrolnih ispitanika.
2. Ispitati povezanost kliničkih pokazatelja težine bolesti (udio eozinofila u NP, ukupni IgE, Lund Mackeyjeva i Malmova klasifikacija), biokemijskih upalnih biljega (hsCRP) te kvalitete života (SNOT-22), s tkivnim udjelima i fenotipom $\gamma\delta$ T vrsta.
3. U populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz nosnih polipa i srednje nosne školjke eKRSsNP oboljelih i kontrolnih ispitanika, istražiti i usporediti izražaj i zastupljenost $V\delta1$, $V\delta2$, $V\delta3$ mRNA, transkripcijski profil gena u kontroli razvoja tip 2 imunskog odgovora (IL4, IL13, GATA3).

3. MATERIJALI I METODE

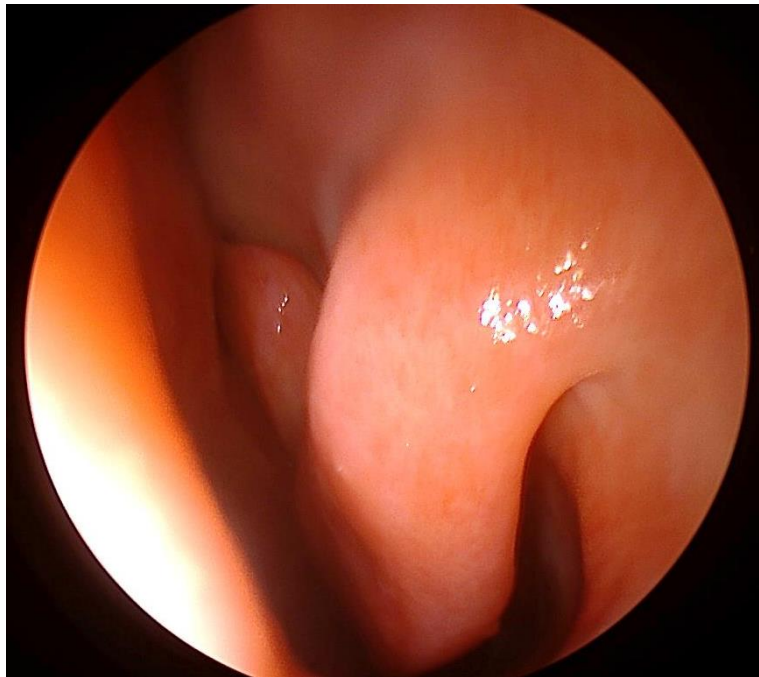
3.1. Bolesnici i klinička evaluacija proširenosti eKRSsNP

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

3.2. Rutinska laboratorijska obrada

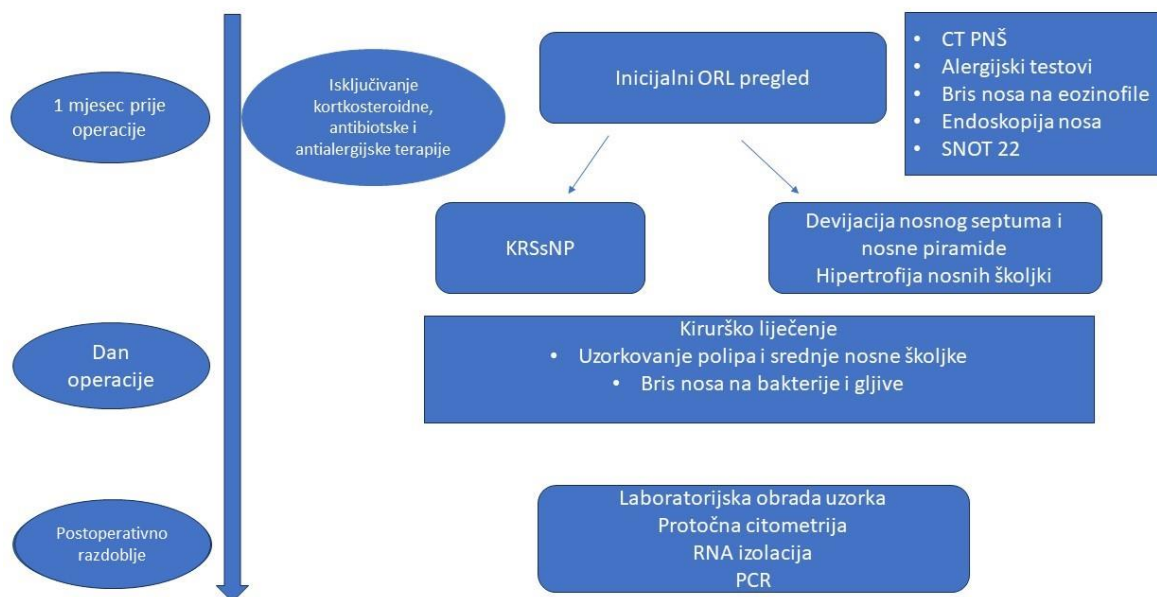
Unutar dijagnostičke obrade svih bolesnika uključenih u istraživanje učinjena je analiza visoko osjetljivog C- reaktivnog proteina (hsCRP, od *engl. high-sensitivity C reactive protein*), alergološka obrada (ukupni IgE, probir na nutritivne i inhalacijske alergene, obrisak nosa na eozinofile), endoskopski pregled, radiološka obrada (CT glave i paranazalnih šupljina). Stupanj proširenosti bolesti određen je na temelju endoskopskog pregleda (slika 5) (Malm klasifikacija) i nalaza CT glave i PNŠ (Lund Mackey). Osim toga, svi bolesnici ispunili su upitnik sinonazalnog ishoda 22 (*od engl. Sino-nasal Outcome Test 22, SNOT-22*), koji ispituje kvalitetu života bolesnika. Svi bolesnici ispunili su zdravstveni upitnik na kojem su se, osim

komorbiditeta, zabilježili i demografski te opći podaci, uključujući spol, dob, alergije na lijekove i pušenje.



Slika 5. Endoskopija nosa - nosna polipoza u nosnom kavumu. Vlastiti izvor.

Bolesnicima su dodijeljeni kodirani identifikacijski brojevi koji su se koristili tijekom prikupljanja i analize bioloških uzoraka te interpretacije rezultata. Svi primijenjeni postupci probira bolesnika i obrade uzoraka odobreni su odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Osijek (Broj: R2-7990/2021) te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (UR. BROJ: 2158-61-07-21-155). Cijeli postupak obrade bolesnika i uzoraka prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz odabira i pripreme bolesnika za istraživanje. Vlastiti izvor.

Tijekom istraživanja upotrijebile su se sljedeće kemikalije:

- Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada)
- LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- TRIZol™ Reagent Invitrogen™
- Human TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD)
- anti-human CD3εFITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma)
- Anti-human TCRγδ PE-Cy7 (BioLegend, klon B1)
- Anti-human TCRVδ1 APC (eBiosciences, klon TS8.2)
- Anti-human TCRVδ2 PerCP/CY5.5 (BioLegend, klon B6)
- Direct-zol RNA Microprep Kit – Zymo Research
- Qubit™ RNA HS Assay Kit
- PrimeScript™ RT Reagent Kit-a (Takara Bio, SAD)
- TaqMan probe (Tablica 3.)

Slijed nukleotida početnica i proba korištenih za određivanje izražaja ciljnih gena prikazani su u tablici 4.

Tablica 3. Popis TaqMan proba i veličina DNA odsječaka. Izvor: (Thermofisher, 2023)

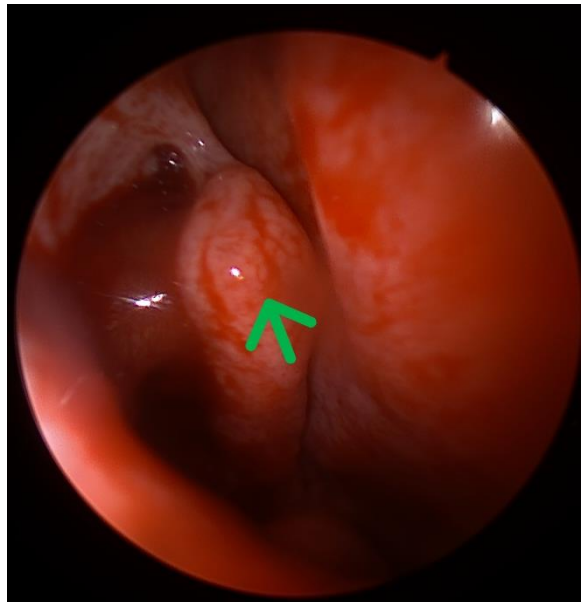
Broj u banci gena	ID test	Ime gena	Veličina pakiranja (broj PCR reakcija)	Veličina PCR rezultata (pb)
NM_001101.3	Hs99999903_m1	ACTB	S (250 rxn)	171
NM_000589.3	Hs00174122_m1	IL-4	S (250 rxn)	70
NM_002188.2	Hs00174379_m1	IL-13	S (250 rxn)	82
NM_001002295.1	Hs00231122_m1	GATA-3	S (250 rxn)	80
X06557.1	APGZPMN	TRDV1	(360 rxn)	212
X53849.1	APH6H7K	TRDV2	(360 rxn)	363
X13953.1	APNKZJG	TRDV3	(360 rxn)	393

Tablica 4. Slijed nukleotida početnice i probe. Izvor: (Thermofisher, 2023)

	Vodeća početnica (5'-3')	Suprotna početnica (5'-3')	Taqman probe (FAM-MGB) (5'-3')
TRDV1	ATGCAAAAAGTGGTC GCTATT	GGATGGTTTGGTATGA GGCTG	CTAGAAGATTCAGCA AAGTA
TRDV2	GCCATTGAGTTGGTG CCTGA	GGATGGTTTGGTATGA GGCTG	AAGCGATCGGTA ACTA
TRDV3	TGTGACAAAGTAACC CAGAG	ATGGTTTGGTATGAGG CTG	CGACACTGTATATTCA AATC

3.3. Uzorkovanje tkiva sinonazalne sluznice i nosnog polipa

Ispitanicima uključenima u studiju, uzorkovao se polip i sluznica srednje nosne školjke tijekom operativnog zahvata (slika 7). Kontrolnoj se skupini tijekom drugih rinoloških operacija (npr. septoplastika, rinoseptoplastika, dekompresija orbite) uzorkovala sluznica srednje nosne školjke. Nakon uzorkovanja, preparati su se pohranili u plastične bočice ispunjene transportnim medijem (DMEM sa stabilnim glutaminom, 10% FBS, 10 mM HEPES, 1% penicilin/Streptavidin, 1mM Na-piruvat, 1 x neesencijalne aminokiseline) i u roku od 1h transportirani su u Laboratorij za analizu DNA Medicinskog fakulteta Osijek, gdje se provela njihova daljnja obrada i analiza. Dio uzoraka poslan je na rutinsku analizu PHD.



Slika 7. Tijekom operativnog zahvata FESS - zelena strelica označava mjesto uzorkovanja srednje nosne školjke. Vlastiti izvor.

3.4. Izolacija i kriokonzervacija mononuklearnih stanica iz tkiva

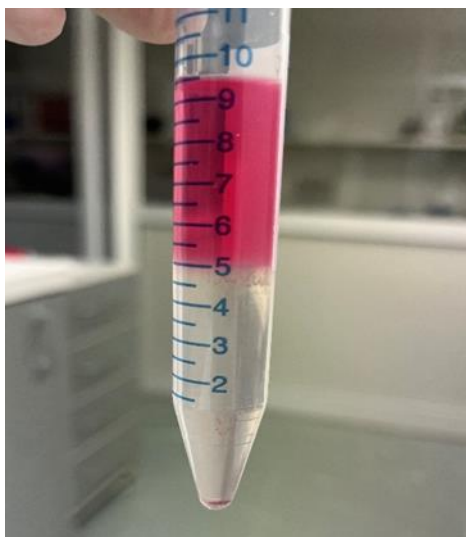
Svježi uzorci bioptata usitnili su se maceracijom tkiva (slika 8) u transportnom mediju i zatim inkubirali na rotatoru (LabRoller™ H5100), 30 minuta na 37 °C pri brzini od 50 rpm/min. Suspenzija usitnjenog tkiva u nastavku dodatno se homogenizirala s pomoću uređaja gentleMACS Dissociator (Milteny Biotec, Auburn, SAD) i profiltrirala preko filtera promjera 70 µm kako bi se oslobođene stanice odvojile od ostataka tkiva.



Slika 8. Uzorak polipa i maceracija tkiva u transportnom mediju. Vlastiti izvor.

Populacija tkivnih mononuklearnih stanica izdvojila se od eritrocita i granulocita postupkom centrifugiranja (800 g, 25 min, 25 °C) u gradijentu gustoće Lymphoprep medija (Axis Shield, Oslo, Norveška) (slika 9). Lymphoprep™ sterilni je gradacijski medij, gustoće 1,077 g/mL, koji se koristi za razdvajanje polimorfonuklearnih i mononuklearnih krvnih populacija na temelju razlike u gustoći.

U praznu epruvetu volumena 15 mL pipetirano je 5 mL medija Lymphoprep. Prethodno pripremljen macerirani uzorak tkiva s transportnim medijem pažljivo je nanesen na površinu medija Lymphoprep pazeći da se dvije otopine ne pomiješaju. Pripremljeni uzorci centrifugirani su na sobnoj temperaturi 25 minuta brzinom od 800 g, uz veličinu ubrzanja 5 i isključene kočnice. Po završetku centrifugiranja bjeličasti sloj PBMC stanica, smješten između plazme i medija Lymphoprep, pažljivo je skupljen i prebačen u novu epruvetu od 15 mL, bez dodirivanja taloženih eritrocita i granulocita. Prikupljeni volumen PBMC stanica nadopunjen je fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-buffered saline, PBS*) pH 7,5, do ukupnog volumena od 13 mL. Pripremljeni uzorci potom su centrifugirani na 25 °C, 10 minuta, brzinom od 800 g, uz najveće moguće vrijednosti ubrzanja i kočenja. Nastali je supernatant odbačen, a taložene stanice resuspendirane su u 2 mL pufera PBS. Brojnost vijabilnih mononukleara u konačnom izolatu utvrdila se brojenjem pomoću brojača stanica Luna.



Slika 9. Odvajanje mononuklearnih stanica od eritrocita postupkom centrifugiranja. Vlastiti izvor.

Za potrebe brojenja, 50 μ l suspenzije PBMC stanica pomiješano je s 100 μ l tripan plavila. Pripremljena suspenzija nanesa na komoricu te su se izbrojale vijabilne (nebojene) stanice. Ovisno o brojnosti izoliranih stanica, pripremili su se alikvoti za protočnu citometriju i alikvoti za RNA. Dio pohranjenih alikvota koristili su se za obilježavanje monoklonalnim protutijelima i analizu na protočnom citometru, a ostatak za izolaciju RNA.

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

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

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

unutarstaničnih i/ili nuklearnih proteina; deoksiribonukleinske kiseline (DNK), količine kalcija).

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

3.5.1. Izrada kompenzacijske matrice

Najčešće korišteni fluorokromi u protočnoj citometriji emitiraju polikromatsku svjetlost širokog raspona valnih duljina. Najveći se dio tog spektra filtrira i usmjerava na odgovarajući detektor FL no zbog širokog raspona valnih duljina pojedinih fluorokroma, mali dio te svjetlosti odlazi i u susjedne detektore FL. Prije početka pokusa neophodno je s pomoću jednobojnih kontrola (SS, od *engl. single stain control*) napraviti kompenzacijsku matricu, koja nam omogućava odgovarajuću analizu podataka. Kompenzacija predstavlja udio signala u susjednom detektoru koji se oduzima stanicama koje odašilju primarni signal za dotični

fluorokrom. Kompenzacije su specifične za kombinaciju napona u detektorima koje se koriste pri pojedinim mjerenjima.

3.5.2. Isključivanje nevijabilnih stanica iz analize

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

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

Imunološke stanice, poput B-limfocita i fagocita (monociti i granulociti), na svojoj površini izražavaju receptore za Fc segment imunoglobulina (FcR), koji im omogućava prepoznavanje opsoniziranih mikroorganizama. Tijekom obilježavanja stanica specifičnim protutijelima u svrhu analize na protočnom citometru stoga dolazi do nespecifičnog vezanja protutijela za Fc receptore i stvaranja lažno pozitivnih rezultata. Nespecifično bojenje posredovano vezanjem protutijela za Fc receptore (FcR) blokirano je dodavanjem 5 uL reagensa Human TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon 8 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorcima je dodana smjesa specifičnih fluorescentno obilježenih protutijela, kako slijedi: CD3εFITC (klon UCHT1 gamma, donacija prof. Peter Balogh, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu), TCRγδ PE-Cy7 (1:100, klon B1, BioLegend), TCRVδ1 APC (1:100, clone TS8.2, eBiosciences) i TCRVδ2 PerCP/CY5.5 (1:200, clone B6, BioLegend). U svim se koracima koristio fosfatni pufer (PBS) s dodatkom 0,5-1% goveđeg serumskog albumina (BSA) i 0.1% natrijevog azida (NaN₃) prilagođene pH vrijednosti (pH ~7,4). Kompenzacijska matrica izračunata je s pomoću komercijalno dostupnih

kompensacijskih kuglica BD™™ CompBeads mišji Igκ/negativne kontrol (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i jednobojnih kontrola.

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

3.6. Izolacija ukupne RNA iz tkivnih mononuklearnih stanica

Ukupna RNA izolirana je iz mononuklearnih stanica s pomoću komercijalno dostupnog kompleta Direct-zol™™ RNA Microprep (Zymo Research, Irvine, CA, SAD). Koristili su se protokoli koje je preporučio proizvođač, dostupni na <https://www.zymoresearch.com/collections/direct-zol-rna-kits/products/direct-zol-rna-microprep-kits>.

POSTUPAK: U suspenziju razvrstanih stanica najprije je dodano 300 µl reagensa TRIzol, a potom i jednaka količina 100%-tnog etanola. Uzorci su dobro promiješani na miješalici vortex, postavljeni u kolonu, a zatim centrifugirani na sobnoj temperaturi, 30 sekundi pri brzini od 15000 g. Pripremljena suspenzija propuštena je kroz filtersku kolonu, a vezani RNA materijal pročišćen je nizom susljednih ispiranja, najprije sa 400 µl otopine 1 PreWash, a zatim sa 700 µl otopine 2 Wash.. Prije završnoga centrifugiranja na filterske kolonice dodano je 7 µl vode DNase/RNase-Free. Nakon mjerenja koncentracije RNA, uzorci s koncentracijom RNA manjoj od 1ng/µl isključeni su iz analize PCR.

3.6.1. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)

Sinteza cDNA (od engl. complementary DNA) podrazumijeva prepisivanje mRNA u komplementarne cDNA molekule primjenom odgovarajućih oligonukleotidnih početnica i enzima reverzne transkriptaze (RT). Brojnost dobivenih cDNA kopija u ispitivanim uzorcima može se zatim odrediti metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR, od engl. quantitative polymerase chain reaction). Postupak cDNA sinteze učinjen je komercijalnim kompletom PrimeScript™™ RT Reagent (Takara Bio, SAD) prema uputama proizvođača.

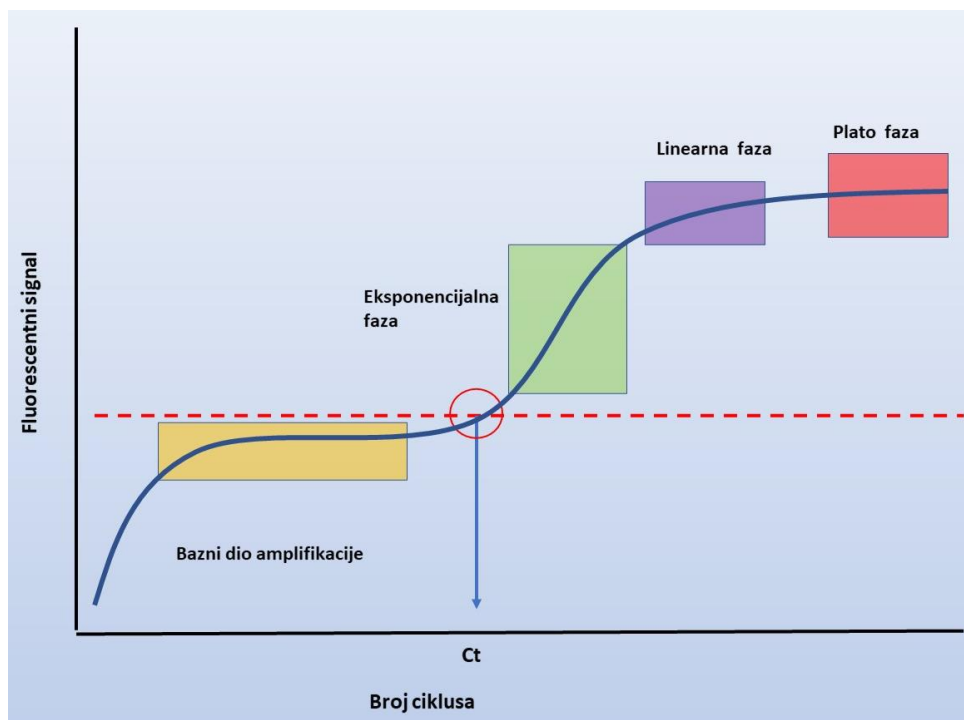
POSTUPAK: Reakcijska smjesa ukupnoga volumena 20 µl sadržavala je 4 µl pufera PrimeScript™™, 3 µl NFW, 1 µl oligo-dT početnica, 1 µl nasumičnih heksamernih oligonukleotida (5 µM), 1 µl enzimske smjese PrimeScript™™ RT te 10 µl ukupne RNA radne

koncentracije 1 ng/ μ L. Nakon pripreme reakcijske smjese uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C, nakon čega je reakcija reverzne transkripcije zaustavljena zagrijavanjem 5 s na 85 °C. Dobivenu cDNA razrijedili smo 5 puta na ukupni volumen od 100 μ l. Uzorci su alikvotirani, i do trenutka upotrebe pohranjeni na -20 °C.

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

Analiza transkriptoma izoliranih tkivnih mononuklearnih stanica učinjena su u Laboratoriju za analizu DNA Medicinskog fakulteta u Osijeku. Kolekcija uzoraka cDNA amplificirala se primjenom predizajniranih proba TaqMan i kompletirane smjese reagensa PCR(Universal TaqMan PCR Mastermix) metodom qPCR na uređaju Quant Studio 5 (Applied Biosystems, SAD). Relativni ekspresijski profili ispitivanih gena utvrđeni su u odnosu na ekspresiju prethodno validiranog referentnoga gena ACTB1 primjenom metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Metoda qPCR precizna je i pouzdana metoda za kvantifikaciju DNA isječaka od interesa. Ciljni dio DNA molekule koju se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama- primerima, koji su komplementarni krajevima ulomka DNA od interesa. Ti su primeri su pokretači serije reakcija s pomoću enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac, pri čemu veličina sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrani primeri. Tijekom reakcije prati se fluorescentni signal koji emitiraju ekscitirani fluorescentno obilježeni DNA produkti nastali kao rezultat vezanja fluorescentno obilježenih boja (nespecifična detekcija) ili fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba (specifična detekcija). Fluorescentni signal raste proporcionalno količini novonastale DNA, a promjene fluorescencije moguće je pratiti u obliku amplifikacijske krivulje (slika 10).



Slika 10. Krivulja amplifikacije isječka DNA. Izvor: (Rutledge RG, 2003)

Bazni dio amplifikacijske krivulje prikazuje razinu fluorescencije na početku reakcije PCR (okvirno 0-18 ciklusa) kada fluorescencija nastalih DNA produkata ne nadmašuje pozadinsku fluorescenciju. Intenzitet fluorescentnog signala naglo raste u ekspancijalnoj fazi kada se broj DNA kopija udvostručuje u svakom ciklusu PCR. U linearnoj fazi, amplifikacija usporava zbog iskorištenja jedne ili više sastavnica smjese te u konačnici reakcija staje, a fluorescencijski signal prestaje rasti, što predstavlja plato fazu. Ekspancijalna faza služi za kvantifikaciju fluorescencijskoga signala u ispitivanim uzorcima, pri čemu se vrijednost ciklusa PCR u kojem fluorescencijski signal prelazi prag fluorescencije definira kao vrijednost graničnog ciklusa ili Ct vrijednost (*engl. treshold cycle; Ct / Cq quantification cycle*). Fluorescentni signal raste proporcionalno početnoj količini kopija DNA u ispitivanom uzorku. Usporedbom vrijednosti Ct između uzoraka moguće je kvantificirati razlike u početnoj količini materijala DNA.

Za analizu razlike u količini materijala DNA mogu se koristiti metode apsolutne ili relativne kvantifikacije. Apsolutna kvantifikacija podrazumijeva usporedbu vrijednosti Ct u nepoznatim uzorcima, s vrijednostima Ct serije standarda poznate koncentracije ciljnih molekula DNA/RNA. U nedostatku apsolutnih standardnih uzoraka, provodi se relativna kvantifikacija usporedbom vrijednosti Ct ciljnih gena s vrijednostima Ct referentnih ili

„housekeeping“ gena. Procjena veličine razlike između normaliziranih vrijednosti Ct (*engl. fold difference ili fold change*) u uzorcima različitog podrijetla ili fenotipskog statusa može se provesti primjenom metode $2^{-\Delta\Delta CT}$ autora Livak i suradnika (Livak KJ, 2001).

Za optimalnu usporedbu vrijednosti Ct ciljnih i referentnih gena bitno je da učinkovitost reakcije PCR bude podjednaka. U suprotnom, značajna razlika u ekspresiji ciljnih u odnosu na referentne gene može izostati ili biti lažno naglašena. Učinkovitost PCR amplifikacije ciljnih i referentnih gena može se utvrditi pripremom standardne krivulje (dijagram dobivenih vrijednosti Ct u odnosu na logaritamske vrijednosti količine standarda) koja nastaje amplifikacijom najmanje 5 serijskih razrjeđenja uzoraka poznate koncentracije.

3.7.1. Priprema standardnih krivulja

Standardne krivulje ciljnih i referentnih gena pripremljene su analizom RT-qPCR 5 serijskih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije cDNA. Sva mjerenja provedena su na uređaju QuantStudio 5 real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, SAD), a podaci su se analizirali računalnim programom QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1.

POSTUPAK: Za pripremu standardne krivulje, odabrano je 6 uzoraka RNA radne koncentracije 7 ng/μl te je učinjena reverzna transkripcija u ukupnom volumenu od 20 μl onako kako je prethodno opisano u potpoglavlju Sinteza komplementarne DNA. Dobivena cDNA udružena je u jedinstveni uzorak volumena 72 μl koji je potom razrijeđen 3 puta dodatkom 216 μl RNase free H₂O na ukupni volumen od 288 μl. U sljedećem koraku pripremljeno je 5 serijskih razrjeđenja, pri čemu je svaki uzorak razrijeđen 4 puta u odnosu na prethodni. Pripremljeni standardi poznate koncentracije alikvotirani su i do trenutka upotrebe pohranjeni na -20 °C.

Razina mRNA ekspresije ciljnih (TRDV1, TRDV2, TRDV3, IL-4, IL-13, GATA3) i referentnog gena (ACTB1) određena je metodom RT-qPCR primjenom fluorescentno obilježenih TaqMan oligonukleotidnih proba i QuantStudio 5 PCR uređaja. U izvornom obliku, na 5' kraju probe TaqMan kovalentno je vezan fluorofor, čije fluorescentno zračenje apsorbira molekularni prigušivač (*engl. Q-quencher*) na 3' kraju. Pri sintezi novog DNA lanca, djelovanjem enzima Taq polimeraze, dolazi do cijepanja vezane probe TaqMan, posljedičnog razdvajanja fluorofora i prigušivača te emisije i detekcije fluorescentnog zračenja na kraju svakog ciklusa PCR.

POSTUPAK: Temperaturni uvjeti i raspored pipetiranja uzoraka i standarda dizajnirani su u računalnom programu QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1. Za pripremu reakcijske smjese ukupnog volumena 10 μ l, korišteno je 5 μ l komercijalnog kompleta TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), 0,5 μ l odgovarajuće probe TaqMan Expression i 4,5 μ l cDNA. Pripremljena reakcijska smjesa pazorno je pipetirana u mikrotitarske jažice ploče PCR koja je zatim prelijepljena prozirnom plastičnom folijom i centrifugirana 1 minutu pri brzini od 3000 rpm na 24 °C. Amplifikacija ciljnih i referentnih gena u svim uzorcima učinjena je u duplikatu prema unaprijed definiranom temperaturnom protokolu (Tablica 5). Standardi su bili dijelom svih pokusa qPCR i mjereni su u duplikatu.

Tablica 5. Program za qRT-PCR. Izvor: (Thermofisher, 2023)

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

3.7.2. Kvantifikacija genske ekspresije metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Relativna kvantifikacija genske ekspresije određena je u programu Microsoft Excel primjenom metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001). Mjerenja ciljnih i referentnih gena izvedena u duplikatu, najprije su korištena za izračun srednjih Ct vrijednosti. Srednje Ct vrijednosti ciljnih gena izmjerene u uzorcima polipa i srednje nosne školjke (SNŠ) normalizirane su u odnosu na srednje Ct vrijednosti referentnog ACTB1 gena, primjenom sljedećih formula:

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

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

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

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

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

Vrijednost kalibratora ΔCt dobivena je iz srednje vrijednosti ΔCt svih kontrolnih uzoraka.

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

3.8. Uzorkovanje obrisaka sluznice sinusa i nosne šupljine za mikrobiološku analizu

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

3.9. Patohistološka analiza na prisutnost eozinofila u uzorcima sluznice srednje nosne školjke i nosnog polipa

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

3.10. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U-testom, dok u slučaju 3 i više skupina testirane su Kruskal-Wallisovim testom (Dunnova korekcija). Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Sve su P vrijednosti dvostrane, razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički paket MedCalc Statistical Software version 19.0.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019) i SPSS (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Za grafički prikaz dodatno je korišten OriginPro Version 2023b. (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na ukupno 84 bolesnika od kojih je 59 (70 %) muškaraca i 25 (30 %) žena. Središnja vrijednost (medijan) dobi svih bolesnika jest 41,5 godina (interkvartilnog raspona od 28,25 do 50,75 godina). Bolesnici su podijeljeni u dvije osnovne skupine; bolesnici sa eKRSsNP i kontrolna skupina bez eKRS. Bolesnicima sa eKRSsNP (n=43) izuzeti su uzorci tkiva nosnog polipa i srednje nosne školjke pa su posljedični rezultati analize relativnih frekvencija gamma-delta ($\gamma\delta$) T-limfocita u sinonazalnoj sluznici i nosnom polipu grupirani ovisno o porijeklu uzorka. Na jednak način grupirani su i rezultati kvantitativne RT-PCR analize transkriptoma mononuklearnih stanica izoliranih iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa. U kontrolnoj skupini analizirani su uzorci srednje nosne školjke ukupno 41 ispitanika.

U odnosu na kontrolnu skupinu, bolesnici sa eKRSsNP imali su značajno veće -ukupne rezultate upitnika SNOT 22. Bolesnici sa eKRS bili su značajno starije dobi u odnosu na kontrolne ispitanike.-Prosječna vrijednost hsCRP u kontrolnih ispitanika iznosila je 1,4 mg/L, dok je u skupini sa eKRSsNP, hsCRP bio nešto viši(1,9 mg/L), ali statistički značajna razlika nije zabilježena. Uspoređujući koncentracije izolirane RNA iz uzoraka srednje nosne školjke (SNŠ) u obje skupine dobivena je statistički značajna razlika. Značajnih razlika u vrijednostima ukupnog IgE između skupine bolesnika sa eKRSsNP i kontrolnih ispitanika nije bilo (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba vrijednosti SNOT 22, hsCRP, ukupnog IgE i koncentracije RNA u SNŠ prema skupini bolesnika

	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	eKRSsNP (n = 43)	Kontrola (n = 41)	
SNOT22	42 (24 – 55)	31 (19,5 – 43,5)	0,03
hsCRP (mg/L)	1,9 (1,1 – 3)	1,4 (0,9 – 3,15)	0,49
Ukupni IgE (IU/ml)	91 (39 – 250)	57 (25 – 133,5)	0,12
Dob	49 (37 – 54)	35 (25 – 46)	<0,001
Koncentracija RNA u SNŠ	1,01 (0,36 – 3,5)	0,55 (0 – 1,56)	0,03

*Mann Whitney U test

Od bolesnika u skupini sa eKRSsNP njih 49 % imalo je pozitivan bris na eozinofile, dok je u kontrolnoj skupini 34 % ispitanika s pozitivnim brisom na eozinofile što ne predstavlja značajnu razliku između skupina (Tablica 7).

Tablica 7. Pozitivni i negativni brisevi nosa na eozinofile prema skupini bolesnika

	Broj (%) ispitanika prema skupini			<i>P</i> *
	eKRSsNP (n = 43)	Kontrola (n = 41)	Ukupno (n = 84)	
BRIS nosa na eozinofile				
Negativno	22 (51)	27 (66)	49 (58)	1,19
Pozitivno	21 (49)	14 (34)	35 (42)	
Ukupno	43 (100)	41 (100)	84 (100)	

*Fisherov egzakti test

Većina bolesnika u objema skupinama imala je pozitivan bris nosa na bakterije, bez značajne razlike između skupina (Tablica 8.)

Tablica 8. Pozitivni i negativni brisevi na bakterije prema grupi bolesnika

	Broj (%) ispitanika prema skupini			<i>P</i> *
	eKRSsNP (n = 43)	Kontrola (n = 41)	Ukupno (n = 84)	
BRIS nosa na bakterije				
Negativno	4 (9)	1 (2)	5 (6)	0,36
Pozitivno	39 (91)	40 (98)	79 (94)	
Ukupno	43 (100)	41 (100)	84 (100)	

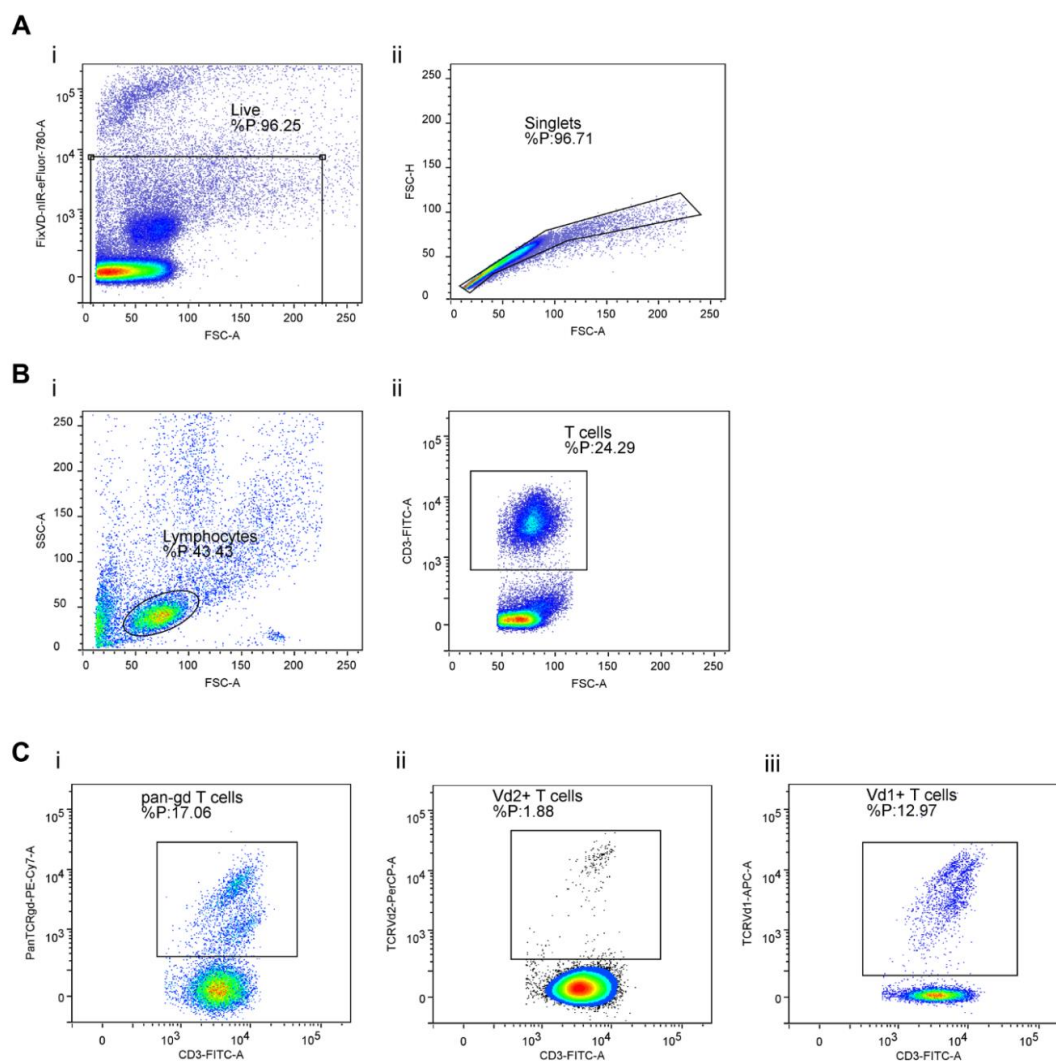
*Fisherov egzakti test

Svim sudionicima u istraživanju tijekom operacije uzorkovan je i bris nosa na gljive, no svi bolesnici uključeni u studiju imali su negativan nalaz test na prisutnost gljiva.

4.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta ($\gamma\delta$) T-limfocita u nosnim polipima eKRSsNP bolesnika te sluznici srednje nosne školjke (SNŠ) eKRSsNP i kontrolnih ispitanika

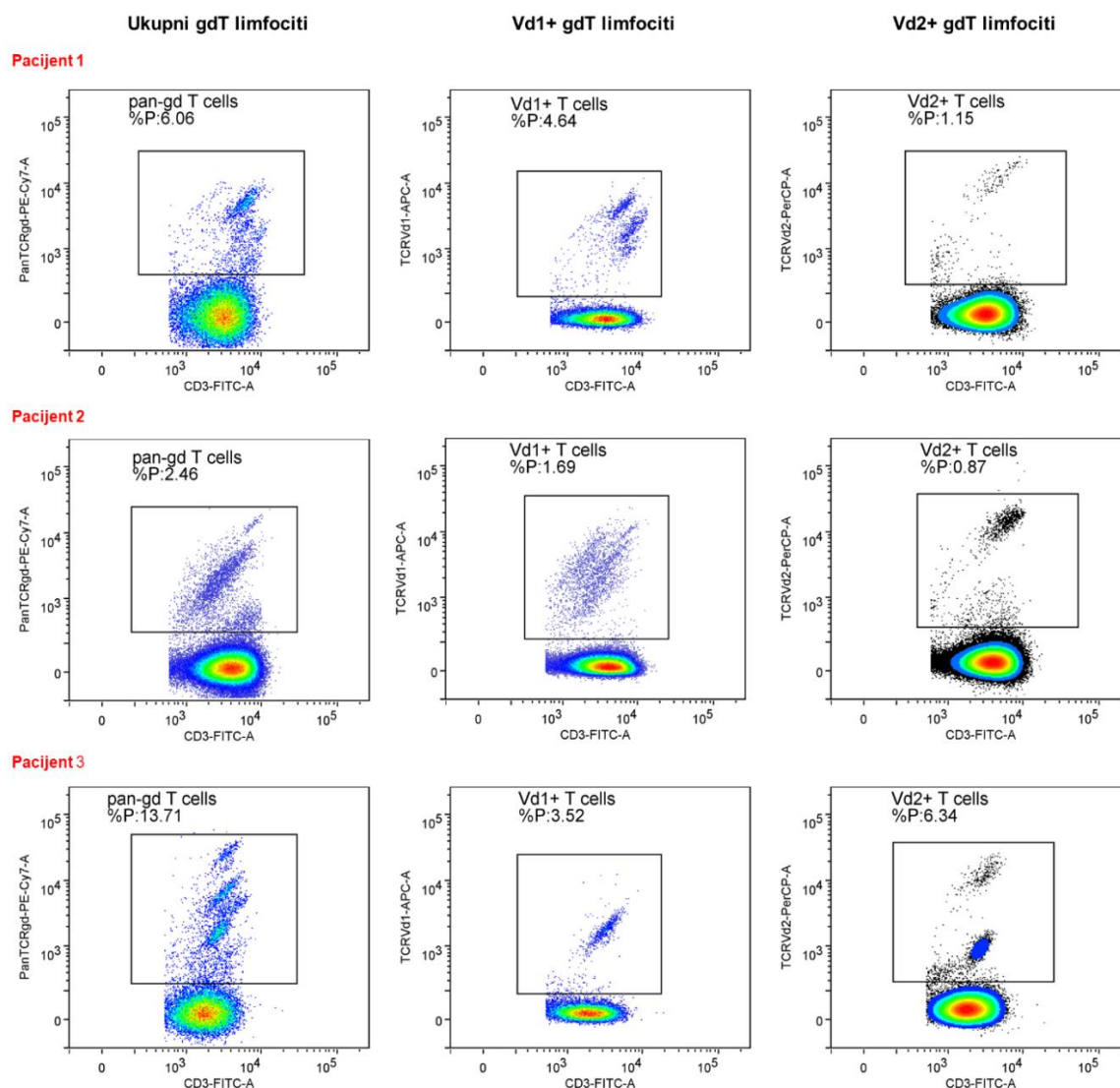
Uzorke SNŠ i polipa od eKRSsNP bolesnika razvrstali smo u dvije posebne skupine (eKRSsNP polip, eKRSsNP SNŠ) te ih usporedili međusobno, ali i s uzorcima SNŠ kontrolnih ispitanika.

Uzorci koji su na protočnoj citometriji imali manje od 500 ciljanih stanica isključeni su iz daljnjih analiza, a u statističku obradu uključeno je 19 uzoraka polipa eKRSsNP, 16 uzoraka srednje nosne školjke bolesnika sa eKRSsNP (eKRSsNP SNŠ) i 10 uzoraka SNŠ kontrolnih ispitanika. Zastupljenost $\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija pri analizi izražen je kao njihov udio (%) tj. relativna frekvencija u populaciji ukupnih živih leukocita (koja obuhvaća T-limfocite, B-limfocite, NK i ILC stanice, granulocite, monocite) te kao njihov udio u roditeljskoj populaciji CD3 pozitivnih T-limfocita ili ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita (pozitivnih za pany δ marker – slike 11 i 12). Ova potonja analiza predstavlja pouzdaniji parametar s obzirom na to da j u tom slučaju izuzet utjecaj interindividualnih razlika u zastupljenosti subpopulacija T/B/NK/ILC limfocita na konačni rezultat, dok razlike dobivene usporedbom udjela $\gamma\delta$ T-limfocita u ukupnoj populaciji T-limfocita govore u prilog veličine efekta. Značajne razlike u relativnim frekvencijama ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita nisu uočene usporedbom vrijednosti zabilježenih u uzorcima srednje nosne školjke bolesnika eKRSsNP, kontrolnih ispitanika i tkivu nosnih polipa oboljelih, neovisno o tome jesu li uspoređivani udjeli u ukupnoj populaciji vijabilnih leukocita ili unutar CD3+ odjeljka. Usporedbom relativnih frekvencija subpopulacija $\gamma\delta$ T-stanica u navedenim uzorcima, u tkivu nosnih polipa bolesnika sa eKRSsNP, zabilježena je značajno veća brojnost V δ 2+ stanica u roditeljskoj populaciji CD3+ T-limfocita u odnosu na oboljelu sluznicu SNŠ bolesnika sa eKRSsNP i zdravu sluznicu SNŠ kontrolnih ispitanika (Tablica 9 i slika 13).



Slika 11. Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija gamma delta T-limfocita

Prvotno su izdvojene žive stanice (FVD negativna populacija) (**Ai**) te potom jednostruke stanice (tzv. singlets) na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrnog raspršenja svjetlosti (*forward scatter area* (FSC-A) i *forward scatter height* (FSC-H)) (**Aii**). U sljedećem koraku definirana je populacija limfocita na temelju pravocrnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (*forward scatter area* (FSC-A) i *side scatter area* (SSC-A)) koje daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica (**Bi**). Na temelju prisutnosti glikoproteina CD3 definirana je populacija T-limfocita (**Bii**). Nadalje su na temelju izražaja pan-gd TCR markera, Vd1 TCR lanca i Vd2 TCR lanca određene frekvencije ukupnih (Ci), odnosno odgovarajućig subpopulacija delta 1 (**Cii**) i delta 2 (**Ciii**) $\gamma\delta$ T-limfocita. FVD - fiksabilna boja za vijabilnost (od *engl. fixable viability dye*); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (*engl. fluorescein isothiocyanate*); PE-Cy7 - od *engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye* (Cy7); PerCP - od *engl. peridinin chlorophyll protein*.

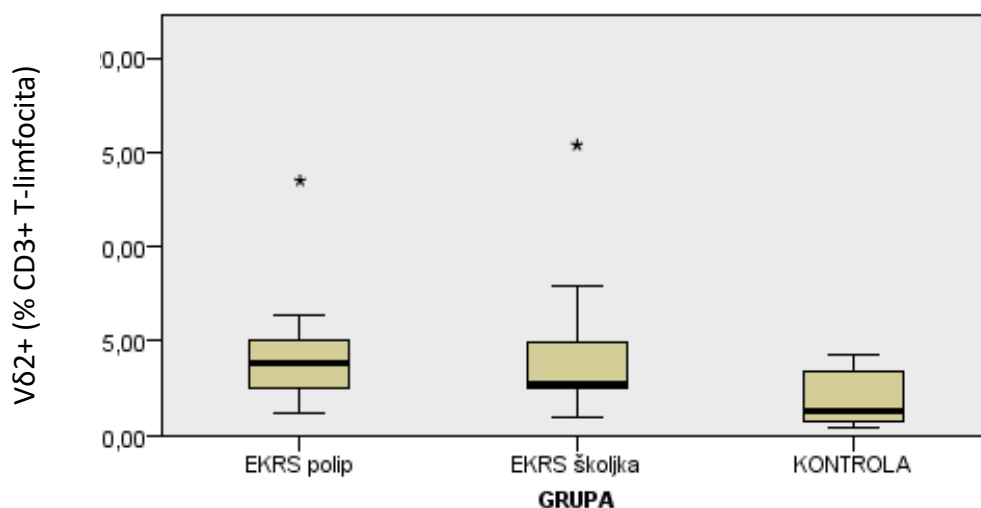


Slika 12. Prikaz individualnih razlika u distribuciji i zastupljenosti populacija gamma delta T-limfocita. Usporedbom analiza subpopulacija gama delta T-limfocita dobivenih iz uzoraka nosnih polipa od različitih bolesnika, zamijećene su značajne individualne razlike u broju i distribuciji subpopulacija gama delta T-limfocita. U ovom trenutku nisu poznate biološke i funkcionalne razlike pojedinih subpopulacija, a ni njihova uloga u (pato)fiziološkim procesima. FVD - fiksabilna boja za vijabilnost (od *engl. fixable viability dye*); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (*engl. fluorescein isothiocyanate*); PE-Cy7 - od *engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7)*; PerCP - od *engl. peridinin chlorophyll protein*. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II i analizirane primjenom programa Flow Logic.

Tablica 9. Usporedba vrijednosti $\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija (V δ 1+ , V δ 1-V δ 2+, V δ 1-V δ 2-) u sluznici srednje nosne školjke i polipa prema skupini bolesnika

CD3+ limfociti (%) [‡]	Medijan (interkvartilni raspon) (%)			P*
	eKRSsNP [§] (polipi) (n = 19)	eKRSsNP (SNŠ) (n = 16)	Kontrola (SNŠ) (n = 10)	
$\gamma\delta$ T-limfociti	6,87 (5,49 – 8,69)	7,36 (5,5 – 10,95)	3,93 (2,67 – 9,26)	0,27
V δ 1+	3,12 (2,45 – 4,1)	3,41 (2,83 – 6,72)	6,54 (2,25 – 8,87)	0,60
V δ 2+ [†]	3,83 (2,46 – 5,07)	2,75 (2,51 – 4,98)	1,24 (0,75 – 3,37)	0,02

*Kruskal Wallisov test (Post Hoc Conover); † na razini P < 0,05 značajne su razlike između eKRS (polip) vs. kontrola; § udio ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija u odjeljku CD3+ T-limfocita; § eozinofilni kronični rinosinuitis s nosnom polipozom; ||) srednja nosna školjka



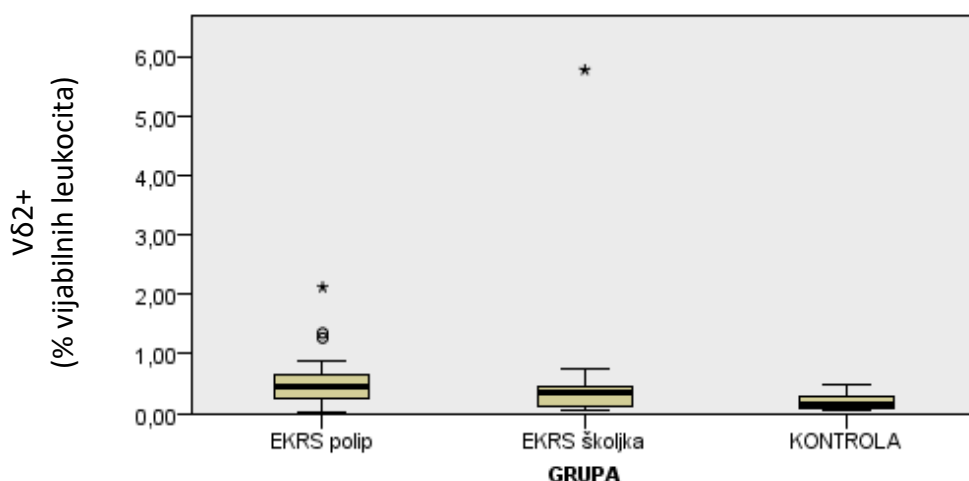
Slika 13. Boxplot graf središnjih vrijednosti (medijan) i interkvartilnog raspona V δ 2+ (parent) kod bolesnika. Razlika u središnjoj vrijednosti (medijanu) udjela V δ 2+ stanica u odjeljku CD3+T-limfocita između skupina (Kruskal Wallis test, p = 0,02). (% CD3+ T-limfocita)

Slično navedenim rezultatima, usporedbom udjela subpopulacija $\gamma\delta$ T-limfocita u ukupnoj populaciji živih leukocita, zabilježen je značajno veći udio ukupnih V δ 2+ limfocita u polipima oboljelih od eKRSsNP u odnosu na sluznicu SNŠ bolesnika sa eKRSsNP i kontrolnih ispitanika (Tablica 10 i Slika 14).

Tablica 10. Usporedba vrijednosti $\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija (V δ 1+ , V δ 2+, V δ 1-V δ 2-) u sluznici srednje nosne školjke i polipa prema skupini bolesnika

% ukupnih vijabilnih leukocita [‡]	Medijan (interkvartilni raspon) (%)			P*
	eKRSsNP [§] (polipi) (n = 19)	eKRSsNP (SNŠ) (n = 16)	Kontrola (SNŠ) (n = 10)	
$\gamma\delta$ T-limfociti	0,75 (0,41 – 2,16)	0,73 (0,28 – 1,56)	0,66 (0,18 – 1,5)	0,45
V δ 1+	0,41 (0,2 – 0,75)	0,45 (0,11 – 1,3)	0,86 (0,17 – 1,38)	0,64
V δ 2+ [†]	0,45 (0,27 – 0,66)	0,34 (0,11 – 0,44)	0,15 (0,08 – 0,28)	0,01

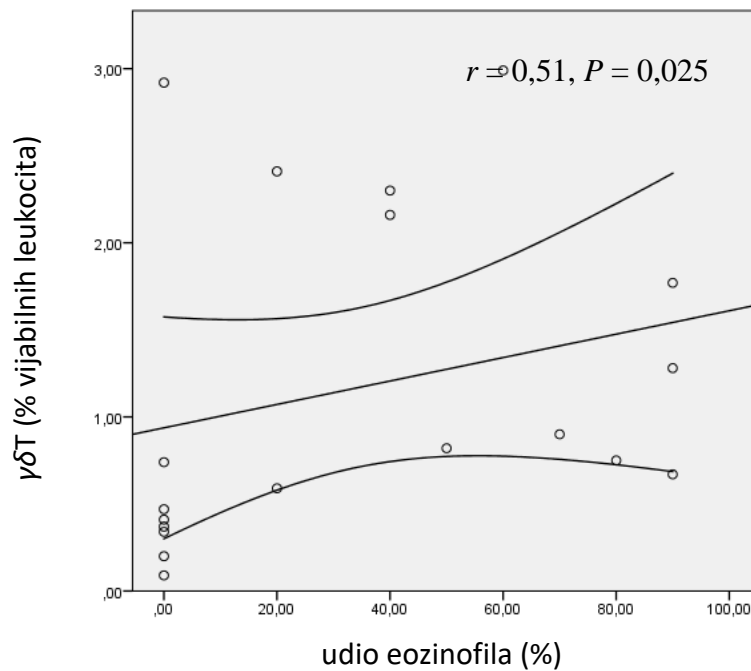
*Kruskal Wallisov test (Post Hoc Conover); † na razini P < 0,05 značajne su razlike između eKRS (polip) vs. kontrola; ‡ udio subpopulacija $\gamma\delta$ T limfocita u odjeljku vijabilnih leukocit; §eozinofilni kronični rinosinuitis s nosnom polipozom; || srednja nosna školjka



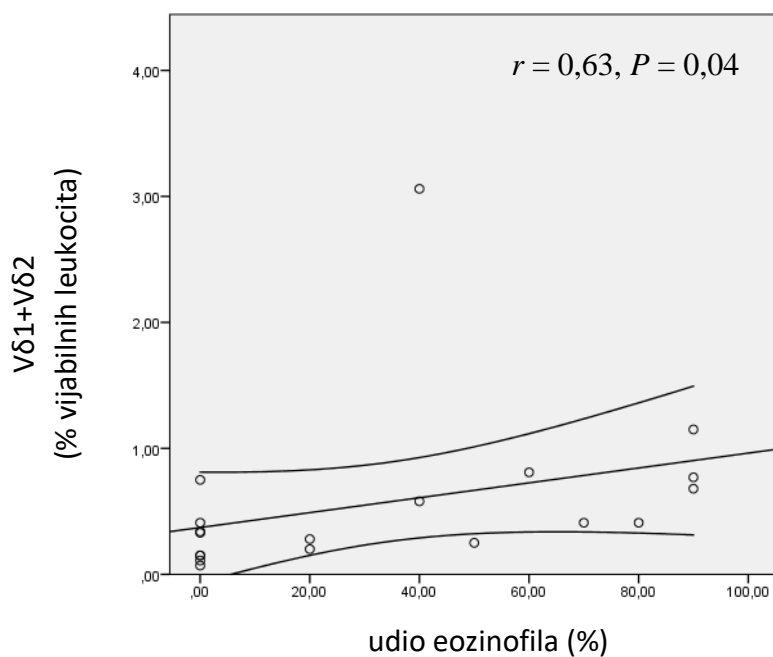
Slika 14. Boxplot graf središnjih vrijednosti (medijan) i interkvartilnog raspona V δ 2+ (ukupno) kod ispitanika. Razlika u središnjoj vrijednosti (medijanu) udjela V δ 2+ limfocita u odjeljku vijabilnih leukocita između skupina (Kruskal Wallis test, P = 0,01). (% vijabilnih leukocita)

Značajne povezanosti između udjela ukupnih $\gamma\delta$ T-stanica V δ 1+ te V δ 2+, subpopulacija unutar odjeljka CD3+ T-limfocita u uzorcima polipa i kliničkih (ukupni IgE, sustav Lund Mackey i klasifikacija Malm) te upalnih (hsCRP) pokazatelja bolesti kod oboljelih od eKRSsNP nisu zabilježene.

Međutim, zabilježena je značajna pozitivna korelacija između udjela eozinofila u obrisku nosa i udjela ukupnih $\gamma\delta$ T i V δ 1+ stanica u odjeljku vijabilnih leukocita zabilježenih u uzorku polipa oboljelih od eKRSsNP (slike 15 i 16). Jednak obrazac povezanosti eozinofila u obrisku i udjela V δ 2+ limfocita u odjeljku ukupnih leukocita u nosnim polipima nije zabilježen.



Slika 15. Povezanost udjela (%) eozinofila i udjela (%) ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita u odjeljku vijabilnih leukocita. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho), crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 % interval pouzdanosti. (% vijabilnih leukocita).



Slika 16. Povezanost udjela (%) eozinofila i subpopulacije Vδ1+ T-limfocita u odjeljku vijabilnih leukocita. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho), crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95% interval pouzdanosti. (% vijabilnih leukocita)

Za procjenu ovisnosti promjene relativnih frekvencija ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita, a i njihovih subpopulacija u uzorku tkiva polipa (% ukupnih T-limfocita i % vijabilnih leukocita) s ukupnim rezultatom upitnika SNOT 22, korišten je Spearmanov koeficijent korelacije (Rho), a rezultati su prikazani u Tablici 11. Prikazani rezultati pokazuju da rezultat upitnika SNOT 22 raste s porastom relativnih frekvencija ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita (u populaciji vijabilnih leukocita i populaciji CD3+ T-limfocita).

Tablica 11. Povezanost fenotipa $\gamma\delta$ T-limfocita u uzorku tkiva polipa s kvalitetom života (rezultat upitnika SNOT22) kod skupine sa eKRSsNP

	Spearmanov koeficijent korelacije ρ (<i>P</i> vrijednost)
	SNOT 22
$\gamma\delta$ T-limfociti (% ukupnih T-limfocita)	0,47 (0,04)
V δ 1+ (% ukupnih T-limfocita)	0,12 (0,63)
V δ 2+ (% ukupnih T-limfocita)	0,18 (0,45)
$\gamma\delta$ T-limfociti (% vijabilnih leukocita)	0,55 (0,01)
V δ 1+ (% vijabilnih leukocita)	0,29 (0,21)
V δ 2+ (% vijabilnih leukocita)	0,44 (0,06)

Spearmanovim koeficijentom korelacije (Rho) izražena je pozitivna i značajna povezanost udjela $\gamma\delta$ T-limfocita (u populaciji vijabilnih leukocita i populaciji CD3+ T-limfocita) u uzorku tkiva srednje nosne školjke s ukupnim rezultatom Lund Mackey kod bolesnika s eKRSsNP. Rezultati pokazuju da vrijednosti koeficijenta Lund Mackey rastu s porastom udjela ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita (Tablica 12.).

Tablica 12. Povezanost fenotipa $\gamma\delta$ T-limfocita u uzorku tkiva SNŠ s kliničkim pokazateljima bolesti (ukupni IgE, Lund Mackey i Malm rezultata) kod skupine sa eKRSsNP

	Spearmanov koeficijent korelacije ρ (<i>P</i> vrijednost)		
	Lund Mackey	Malm	Ukupni IgE
$\gamma\delta$ T-limfociti (% ukupnih T-limfocita)	0,67 (0,009)	0,17 (0,55)	0,05 (0,84)
V δ 1+ (% ukupnih T-limfocita)	0,23 (0,42)	0,08 (0,79)	0,10 (0,84)
V δ 2+ (% ukupnih T-limfocita)	0,16 (0,59)	0,09 (0,77)	0,15 (0,6)
$\gamma\delta$ T-limfociti (% vijabilnih leukocita)	0,54 (0,04)	0,01 (0,98)	0,39 (0,17)
V δ 1+ (% vijabilnih leukocita)	0,19 (0,52)	0,16 (0,98)	0,13 (0,64)
V δ 2+ (% vijabilnih leukocita)	0,35 (0,22)	0,02 (0,94)	0,36 (0,21)

Značajna povezanost između udjela $\gamma\delta$ T-limfocita te V δ 1+, V δ 2+ i V δ 1-V δ 2-subpopulacija u uzorku tkiva srednje nosne školjke s ukupnim rezultatom upitnika SNOT 22 i razinom hsCRP-a kod bolesnika sa eKRSsNP nije zabiježena. Također, nije uočena značajna povezanost između udjela eozinofila u obrisku nosa i relativne frekvencije $\gamma\delta$ T-limfocita, V δ 1+, V δ 2+ stanica u uzorku tkiva SNŠ oboljelih. Relativni udjeli $\gamma\delta$ T-limfocita, V δ 1+, V δ 2+ te V δ 1-V δ 2- u uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika također nisu korelirali s ukupnim rezultatom upitnika SNOT 22, razinom hsCRP-a, ukupnog IgE-a i udjelom eozinofila u obrisku nosa kontrolnih ispitanika.

Usporedbom udjela subpopulacija $\gamma\delta$ T-limfocita unutar odjeljka pan- $\gamma\delta$ + T-limfocita u tkivu polipa oboljelih od eKRSsNP uočen je značajno smanjeni udio δ 1+ δ 2- uz usporedno značajno povećan udio δ 1- δ 2- dvostruko negativnih T-limfocita, u odnosu na sluznicu SNŠ kontrolnih ispitanika (Tablica 13).

Tablica 13. Usporedba udjela subpopulacija $\gamma\delta$ T limfocita ($\delta 1-$ $\delta 2+$, $\delta 1-$ $\delta 2-$ i $\delta 1+$ $\delta 2-$) u sluznici SNŠ i polipa prema skupini bolesnika

% pan- $\gamma\delta$ +T- limfocita [§]	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	eKRSsNP (polipi) (n = 19)	eKRSsNP (SNŠ [¶]) (n = 16)	Kontrola (SNŠ) (n = 10)	
$\delta 1-$ $\delta 2+$	10,75 (6,59 – 20)	14,19 (6,54 – 30,5)	9,52 (2,9 – 16,6)	0,44
$\delta 1-$ $\delta 2-$ [‡]	42,06 (23,98 – 58,23)	30,8 (21,5-47,5)	14,61 (12,74 – 27,6)	0,02
$\delta 1+\delta 2-$ [†]	35,2 (19,04 – 60)	47,6 (23,1 – 55,2)	71,9 (57,8 – 79)	0,02

* Kruskal Wallisov test (Post Hoc Conover); † na razini P < 0,05 značajne su razlike između eKRS (polip) vs. kontrola; ‡ na razini P < 0,05 značajne su razlike između eKRS (polip) vs. kontrola; § udio subpopulacija $\gamma\delta$ limfocita u odjeljku ukupnih pan- $\gamma\delta$ T-limfocita; || eozinofilni kronični rinosinuitis; ¶ srednja nosna školjka

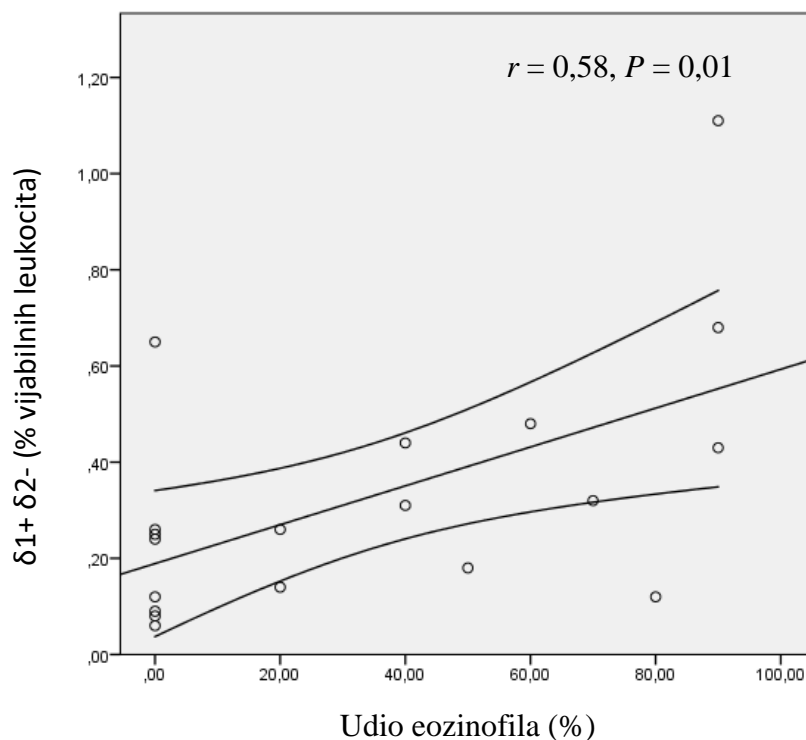
S druge strane, usporedbom udjela istih populacija unutar odjeljka ukupnih vijabilnih leukocita očuvana je značajna razlika za $\delta 1-\delta 2-$, dok razlika u relativnim frekvencijama $\delta 1+\delta 2-$ stanica između tkiva polipa i srednje nosne školjke obiju skupina bolesnika nije zabilježena (Tablica 14).

Tablica 14. Usporedba vrijednosti $\delta 1-$ $\delta 2+$, $\delta 1+$ $\delta 2+$ i $\delta 1+\delta 2-$ u sluznici SNŠ i polipa prema skupini bolesnika

% vijabilnih leukocita [†]	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	eKRSsNP [§] (polipi) (n = 19)	eKRSsNP (SNŠ) (n = 16)	Kontrola (SNŠ) (n = 10)	
$\delta 1-$ $\delta 2+$	0,09 (0,04 – 0,24)	0,06 (0,02 – 0,25)	0,04 (0,02 – 0,06)	0,12
$\delta 1-$ $\delta 2-$ [‡]	0,42 (0,12 – 0,64)	0,19 (0,08 – 0,42)	0,09 (0,02 – 0,22)	0,03
$\delta 1+\delta 2-$	0,26 (0,12 – 0,44)	0,21 (0,06 – 0,62)	0,5 (0,1 – 1,25)	0,56

*Kruskal Wallisov test (Post Hoc Conover); † udio subpopulacija $\gamma\delta$ T-limfocita u odjeljku vijabilnih leukocita; ‡ na razini P < 0,05 značajne su razlike između eKRS (polip) vs. kontrola; § eozinofilni kronični rinosinuitis s nosnom polipozom; || srednja nosna školjka

Značajne povezanosti u relativnim frekvencijama $\delta 1-$ $\delta 2+$ stanica (unutar odjeljka pan $\gamma\delta$ T-limfocita i ukupnih vijabilnih leukocita) u uzorku polipa i pokazatelja težine bolesti (udio eozinofila u obrisku nosa, ukupni IgE, Lund Mackey i Malm) kod bolesnika sa eKRSsNP nisu uočene. Suprotno tomu, u istim uzorcima uočena je značajna pozitivna povezanost relativnih udjela $\delta 1+\delta 2-$ T-limfocita u odjeljku ukupnih vijabilnih leukocita i udjela eozinofila u obrisku nosa (Slika 17), dok nisu zabilježene značajne povezanosti iste subpopulacije stanica s ostalim pokazateljima težine bolesti.

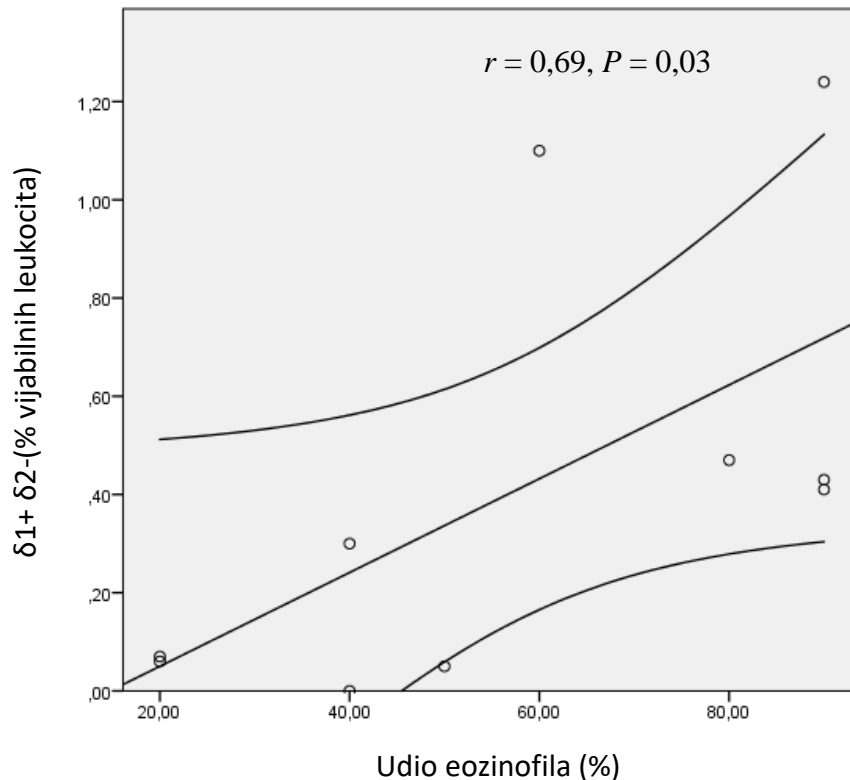


Slika 17. Povezanost udjela eozinofila (%) i $\delta 1+ \delta 2-$ (% vijabilnih leukocita). R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti. (% vijabilnih leukocita)

Također, u istim uzorcima polipa eKRSsNP bolesnika, nije zabilježena značajna povezanost udjela $\delta 1-\delta 2+$ kao niti $\delta 1+ \delta 2-$ populacije stanica s razinom upalnog biljega hsCRP-a i kvalitetom života, koja je određena s pomoću upitnika SNOT 22..

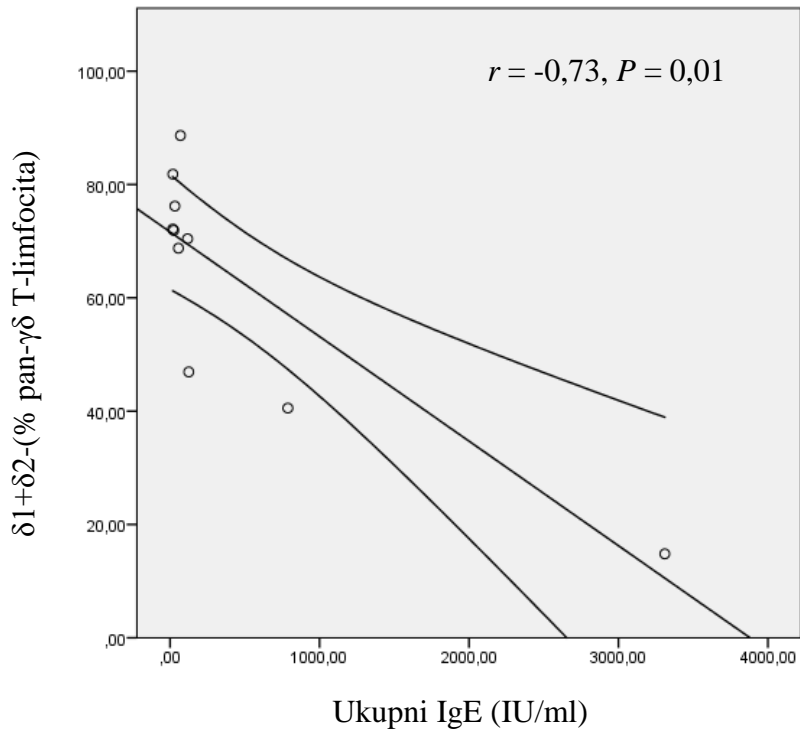
Između parametara pokazatelja težine bolesti (udio eozinofila u obrisku nosa, ukupni IgE, sustav Lund Mackey, klasifikacija Malm), upalnog biljega hsCRP, ukupnog rezultata upitnika SNOT 22 te relativnih frekvencija $\delta 1- \delta 2+$, $\delta 1- \delta 2-$ i $\delta 1+ \delta 2-$ u uzorku SNŠ kod skupine

eKRSsNP, uočena je značajna i pozitivna povezanost udjela $\delta 1+$ $\delta 2-$ u odjeljku ukupnih vijabilnih leukocita i udjela eozinofila (Slika 18). U istim je uzorcima, također, zabilježena značajna i pozitivna povezanost između udjela $\delta 1-\delta 2-$ unutar odjeljka vijabilnih leukocita i kvalitete života određene SNOT-22 upitnikom ($\rho = 0,61$; $P = 0,006$) te težine bolesti određene sustavom bodovanja Lund Mackey ($\rho = 0,65$; $P = 0,01$).

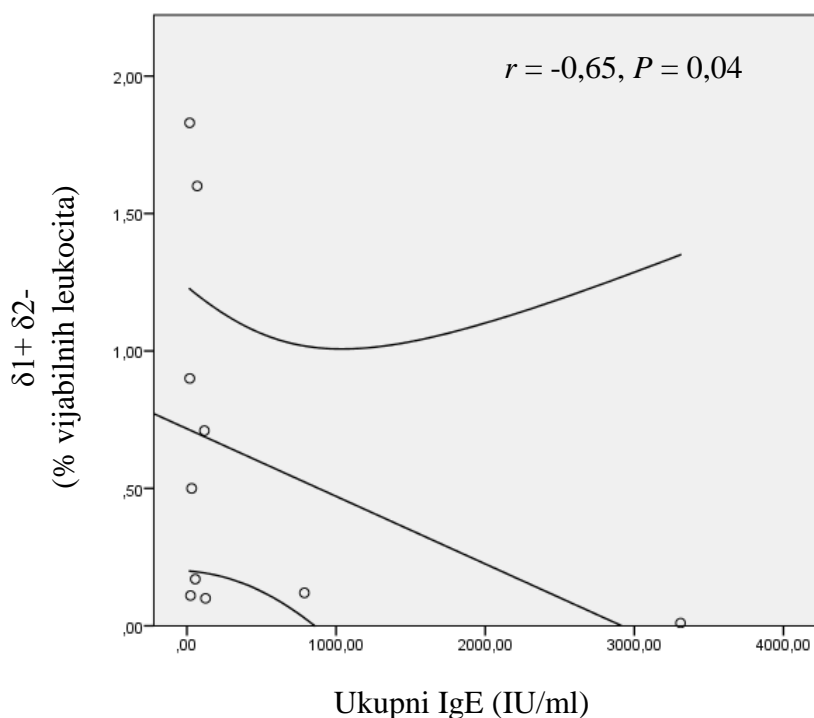


Slika 18. Povezanost udjela eozinofila (%) i udjela $\delta 1+$ $\delta 2-$ subpopulacije vijabilnih leukocita (%) u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.(% vijabilnih leukocita)

Između parametara pokazatelja težine bolesti (udio eozinofila u obrisku nosa, ukupni IgE, sustav Lund Mackey, klasifikacija Malm), upalnog biljega hsCRP, ukupnog rezultata upitnika SNOT 22 te $\delta 1-$ $\delta 2+$, $\delta 1-$ $\delta 2-$ i $\delta 1+$ $\delta 2-$ subpopulacija $\gamma\delta$ T-limfocita u uzorku SNŠ kod kontrolnih ispitanika, uočena je značajna i negativna povezanost udjela $\delta 1+$ $\delta 2-$ i razine ukupnog IgE (Slike 19 i 20).



Slika 19. Povezanost ukupnog IgE (%) i udjela $\delta 1+ \delta 2-$ T-limfocita unutar pan- $\gamma\delta$ T-limfocitnog odjeljka (%) u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac, Polje između zakrivljenih (% pan $\gamma\delta+$ T-limfocita)



Slika 20. Povezanost ukupnog IgE (%) i udjela $\delta 1 + \delta 2$ - unutar odjeljka vijabilnih leukocita (%) u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti. (% vijabilnih leukocita)

4.2. Usporedba izražaja gena između skupina

Nakon izolacije RNA iz tkivnih mononuklearnih stanica, uzorci RNA podijeljeni su u tri skupine: RNA uzorci iz stanica polipa oboljelih od eKRSsNP, RNA uzorci stanica srednje nosne školjke (SNŠ) oboljelih od eKRSsNP i RNA uzorci SNŠ kontrolnih ispitanika. Uzorci čija je koncentracija RNA bila manja od $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ nisu se prevodili u cDNA, ni dalje koristili za RT-q-PCR. U posljedične analize transkriptoma i statističku obradu-prikupljenih podataka uključeno je 30 RNA uzoraka mononuklearnih stanica porijeklom iz polipa i 16 RNA uzoraka tkivnih mononukleara iz SNŠ oboljelih od eKRSsNP, te 14 RNA uzoraka dobivenih izolacijom mononuklearnih stanica iz SNŠ kontrolnih ispitanika.

Izražaj TRDV3 gena nije zabilježena ni u jednom ispitivanom uzorku primjenom metode RT-qPCR.

U odnosu na stanice SNŠ kontrolnih ispitanika, mononukleari porijeklom iz polipa i SNŠ oboljelih od eKRSsNP imali su značajno povišen genski izražaj IL-13 i IL-4. Izražaj GATA3, TRDV1 i TRDV2 nije se međutim, značajno razlikovala između ispitivanih tkivnih populacija stanica oboljelih i kontrolnih bolesnika (Tablica 15).

Tablica 15. Usporedba genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 između skupina

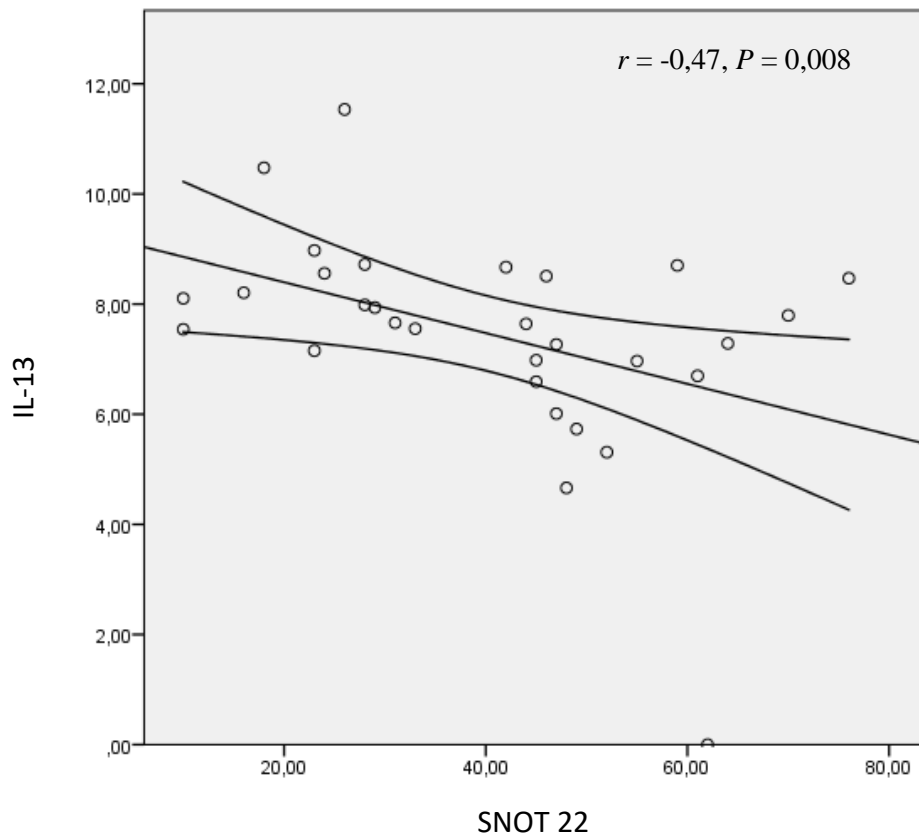
Ukupno	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	eKRSsNP (polipi) (n = 30)	eKRSsNP (SNŠ) (n = 16)	Kontrola (SNŠ) (n = 14)	
Veličina razlike (GATA3)	1,2 (0,86 – 1,9)	1,5 (0,78 – 1,9)	0,9 (0,73 – 1,2)	0,28
Veličina razlike (IL-13) [‡]	13,5 (7,6 – 22,7)	11,5 (1,5 – 28,4)	0 (0 – 0,35)	< 0,001
Veličina razlike (TRDV1)	1,2 (0,54 – 2,6)	0,91 (0,41 – 2,5)	0,86 (0,21 – 1,8)	0,64
Veličina razlike (TRDV2)	0,14 (0 – 0,75)	0,01 (0 – 1,6)	0,1 (0 – 1,6)	0,96
Veličina razlike (IL-4) [§]	1,5 (0,4 – 3,9)	1,7 (0 – 3,8)	0 (0 – 0,43)	0,005

*Kruskal Wallisov test (Post Hoc Conover); ‡ na razini $P < 0,05$ značajne su razlike između eKRSsNP (polip) vs. kontrola i između eKRSsNP (polip) vs. eKRSsNP (SNŠ); § na razini $P < 0,05$ značajne su razlike između eKRSsNP (polip) vs. kontrola i između eKRSsNP (polip) vs. eKRSsNP (SNŠ)

4.3. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorcima polipa s kliničkim (udio eozinofila, Lund Mackey, Malm, ukupni IgE, SNOT 22) i upalnim (hsCRP) pokazateljima težine oboljenja u eKRSsNP bolesnika

Izražaj gena GATA3 u mononuklearnim stanicama polipa oboljelih od eKRSsNP nije bila značajno povezana s pokazateljima težine kliničke slike (udio eozinofila u obrisku nosa, sustav Lund Mackey, klasifikacija Malm i razina ukupnoga IgE), a ni s upalnim biljgom hsCRP i s pokazateljem kvalitete života, rezultatom upitnika SNOT 22.

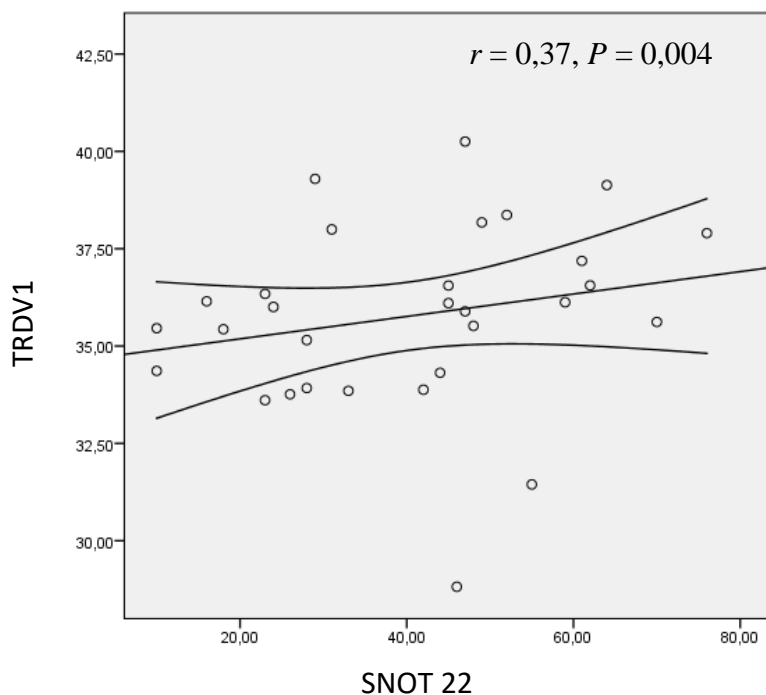
Diferencijalni izražaj IL-13 također je bio neovisan o promjenama udjela eozinofila, pokazateljima Lund Mackey i Malm, razinama ukupnog IgE i serumskim vrijednostima hsCRP, ali je negativno korelirao s rezultatima upitnika SNOT 22, upućujući na inverznu povezanost između povećanog izražaja IL-13 u stanicama polipa eKRSsNP oboljelih i smanjenja rezultata upitnika SNOT 22 (slika 21).



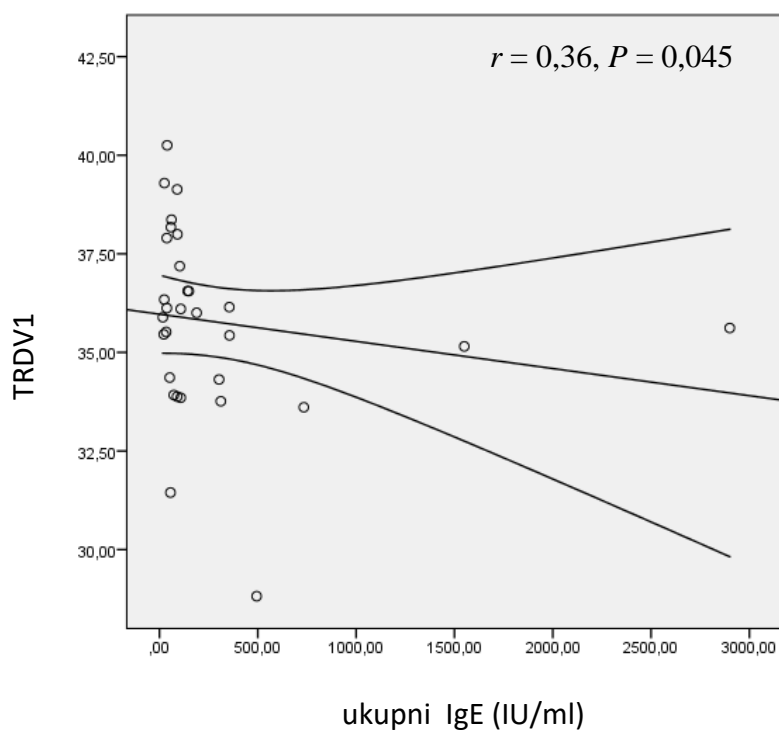
Slika 21. Povezanost rezultata SNOT 22 upitnika i izražaja gena IL-13 (Δ CT vrijednosti) u uzorku polipa kod skupine eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

Izražaj gena TRDV1, TRDV2 i IL-4 nije bila značajno povezana s vrijednostima klasifikacije Lund Mackey i Malm težine oboljenja, a ni sa serumskim razinama upalnog biljega hsCRP. Unatoč tomu zabilježeni su drugi zanimljivi korelacijski obrasci, poput negativne korelacije između genskog izražaja TRDV1 i ukupnih IgE vrijednosti u nosu oboljelih te pozitivne korelacije između rezultata TRDV1 i SNOT 22 (Slike 22.a i 22.b).

A

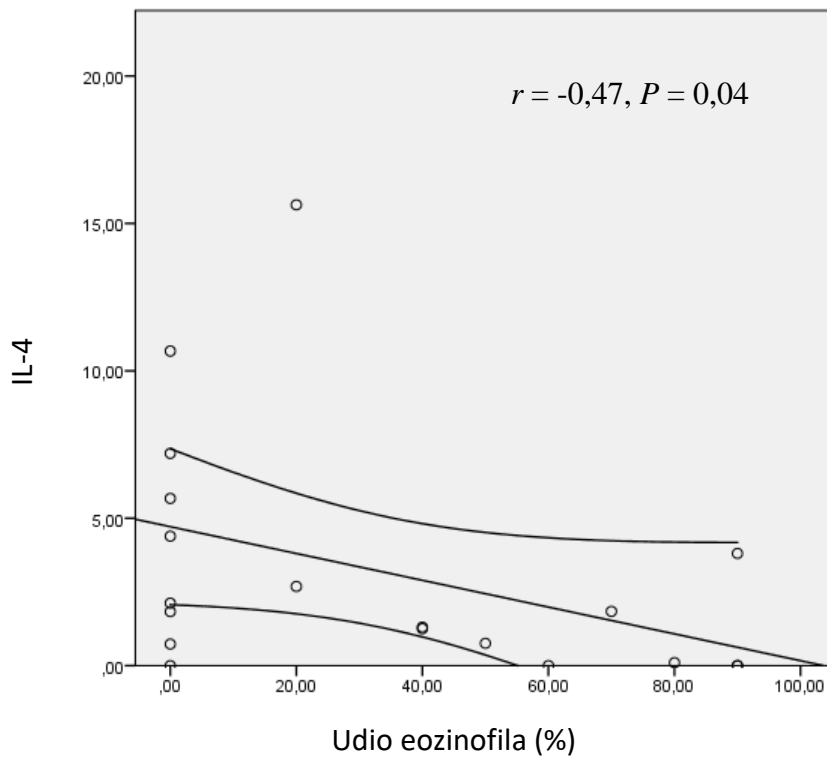


B



Slika 22. Povezanost rezultata upitnika SNOT 22 i izražaja gena TRDV1 (medijan vrijednosti duplikata) u uzorku polipa kod bolesnika sa eKRSsNP (A). Povezanost razine ukupnog IgE i izražaja gena TRDV1 (medijan vrijednosti duplikata) u uzorku polipa (B).

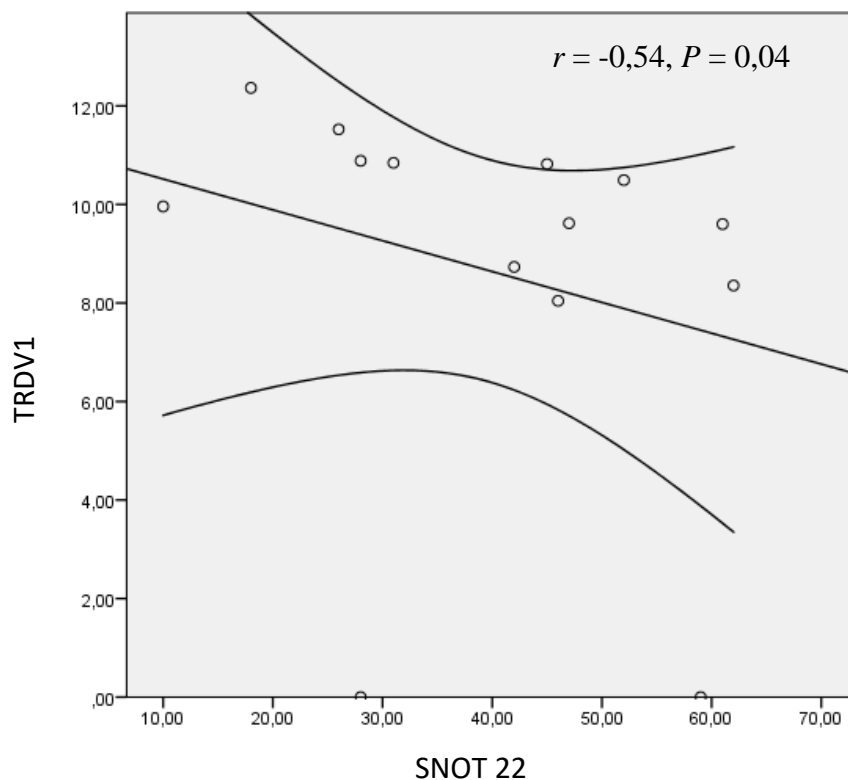
Zabilježena je također i negativna korelacija između genskog izražaja IL-4 u stanicama nosnih polipa i udjela eozinofila u obrisku nosa eKRSsNP oboljelih (slika 23). Genski izražaj IL-4 nije korelirao s rezultatima upitnika SNOT 22 i ukupnim IgE vrijednostima, a izražaj gena TRDV2 nije pokazao povezanost ni s jednim kliničkim i upalnim biljegovom težine eKRSsNP oboljenja.



Slika 23. Povezanost udjela (%) eozinofila u obrisku nosa ispitanika eKRSsNP i izražaja gena IL-4 (veličina razlike) u uzorku polipa. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

4.4. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorcima srednje nosne školjke (SNŠ) s kliničkim (udio eozinofila, Lund Mackey, Malm, ukupni IgE i SNOT22) i upalnim (hsCRP) pokazateljima težine oboljenja eKRSsNP skupine

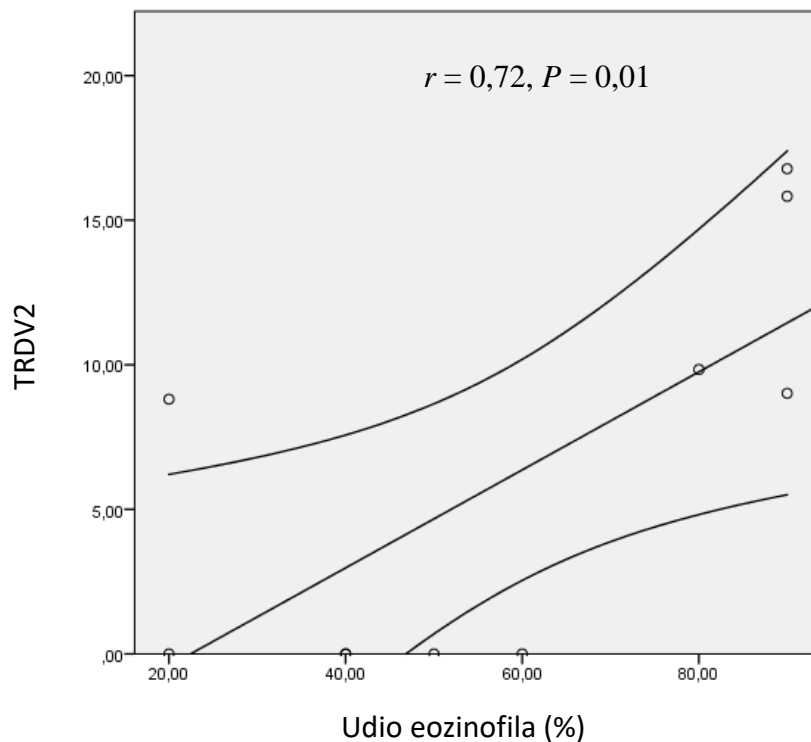
Genski izražaj GATA3 u stanicama SNŠ oboljelih nije bio značajno povezan s pokazateljima težine kliničke slike (sustav Lund Mackey, klasifikacija Malm), a ni s upalnim biljegom hsCRP, ni s pokazateljem kvalitete života, rezultatom upitnika SNOT 22. Jednako tako, izražaj gena TRDV1, TRDV2 i IL-4 u stanicama SNŠ oboljelih od eKRSsNP nije bio značajno povezan s kliničkim parametrima, upalnim biljegom hsCRP i rezultatom upitnika SNOT 22. U usporedbi normaliziranih (Δ CT vrijednosti) izražaja gena TRDV1 u SNŠ oboljelih s ukupnim SNOT22 rezultatom zabilježena je negativna korelacija upitnog značenja (slika 24).



Slika 24. Povezanost rezultata upitnika SNOT 22 kod eKRSsNP skupine i izražaja gena TRDV1 (Δ CT vrijednosti) u uzorku SNŠ. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

Δ CT vrijednost izražaja TRDV2 gena značajno i pozitivno korelira s udjelom eozinofila u obrisku nosa u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP (slika 25). TRDV2 gen nije pokazao drugu značajnu povezanost s ostalim pokazateljima težine kliničke slike, hsCRP i upitnikom SNOT22 u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP.

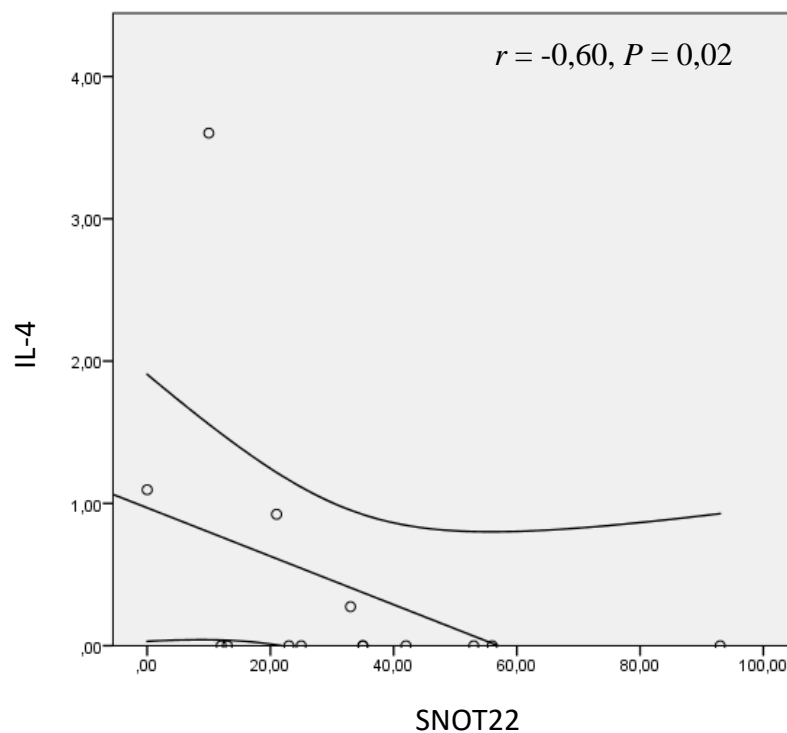
Izražaj IL-4 nije pokazao značajnu povezanost u uzorcima SNŠ u bolesnika s eKRSsNP sa kliničkim parametrima, upalnim biljegovom hsCRP i rezultatom upitnika SNOT 22.



Slika 25. Povezanost rezultata udjela (%) eozinofila u obrisku nosa kod bolesnika sa eKRSsNP i izražaja gena TRDV2 (Δ CT vrijednost) u uzorku SNŠ. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

4.5. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorcima srednje nosne školjke (SNŠ) s kliničkim (udio eozinofila, ukupni IgE i SNOT22) i upalnim (hsCRP) pokazateljima težine oboljenja u kontrolnih ispitanika

Genski izražaj GATA3, TRDV1, TRDV2 i IL-4 u SNŠ kontrolnih ispitanika nije bio povezan s udjelom eozinofila u obrisku nosa, serumskim razinama ukupnog IgE i hsCRP. Zabilježena je međutim, negativna povezanost izražaja gena IL-4 i ukupnoga rezultata upitnika SNOT 22 kod kontrolnih ispitanika (slika 26). Povezanost pokazatelja kvalitete života, upitnika SNOT 22 i ostalih gena nije zabilježena.

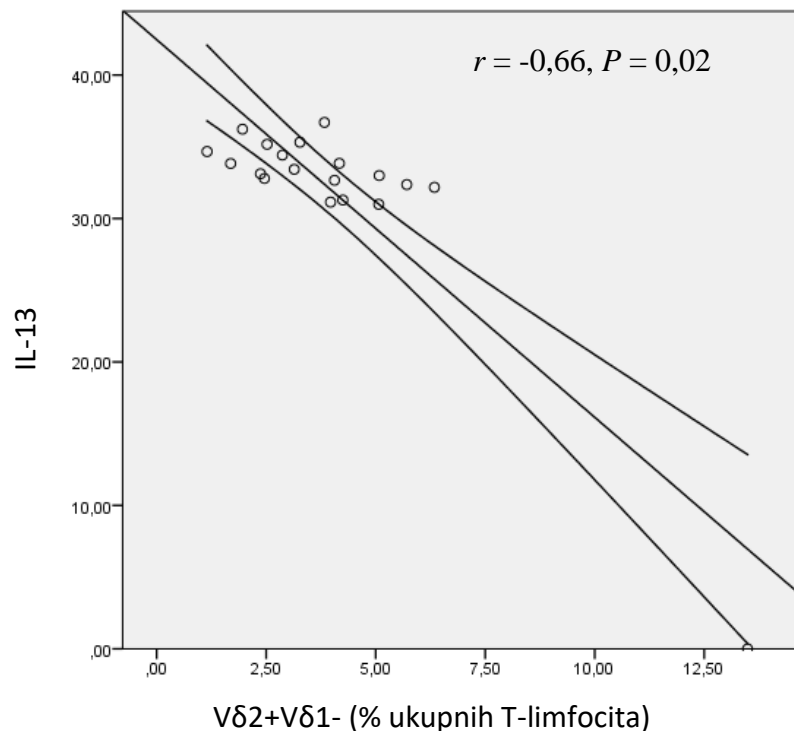


Slika 26. Povezanost rezultata upitnika SNOT 22 kod kontrolnih bolesnika i genskog izražaja IL-4 (veličina razlike) u uzorku SNŠ. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

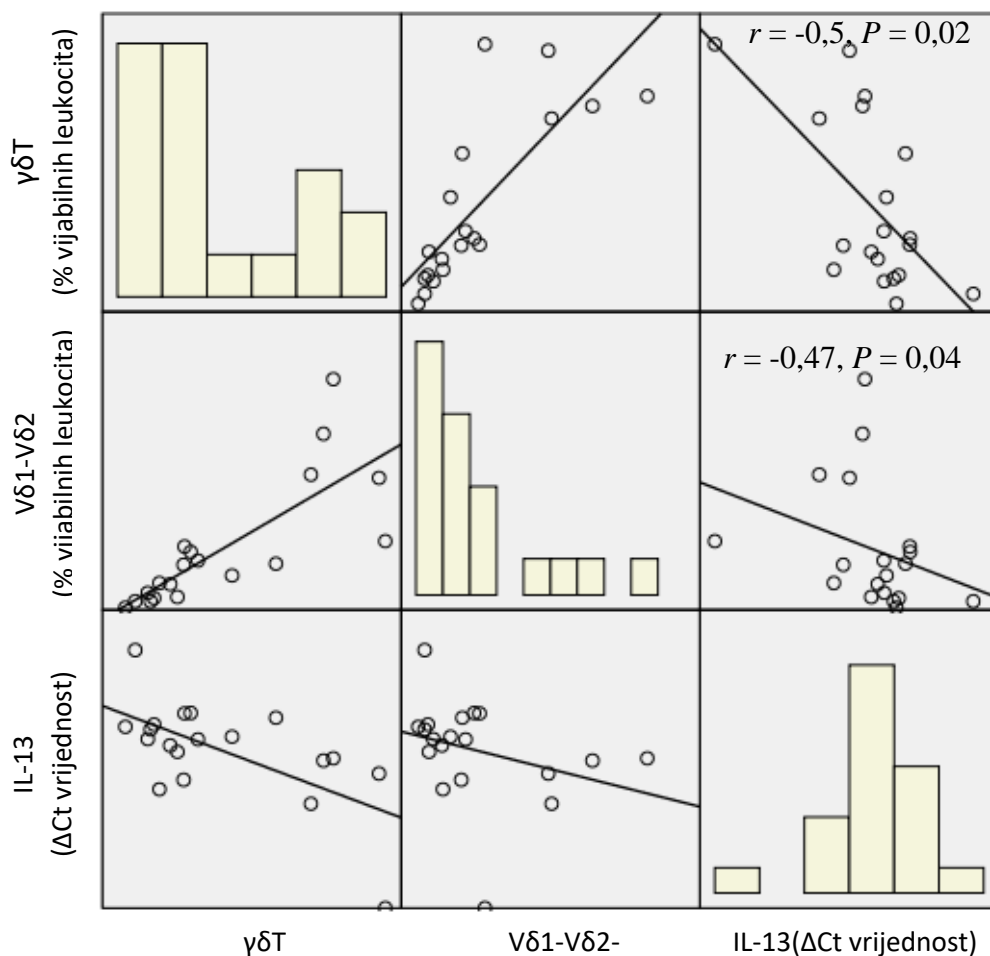
4.6. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku polipa kod eKRSsNP bolesnika sa $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2-

Ispitana je povezanost vrijednosti $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2- dobivenih protočnom citometrijom u uzorku polipa s vrijednostima genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 u uzorku polipa dobivenih PCR-om.

Utvrđena je značajna i negativna povezanost genskog izražaja IL-13 i V δ 2+V δ 1- (% ukupnih T-limfocita) stanica (slika 27). Osim toga, izražaj IL-13 (Δ Ct vrijednost) značajno je korelirao s distribucijom ukupnog broja V δ 1-V δ 2- stanica i $\gamma\delta$ T-limfocita (slika 28).

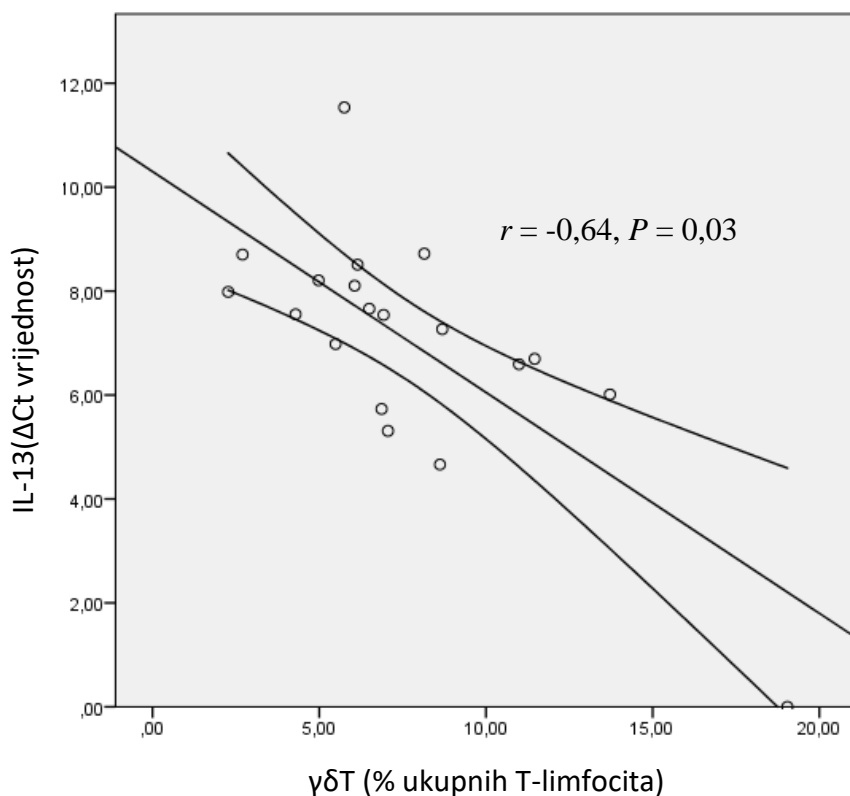


Slika 27. Povezanost V δ 2+V δ 1- (% ukupnih T-limfocita) i genskog izražaja IL-13 u uzorku polipa. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.



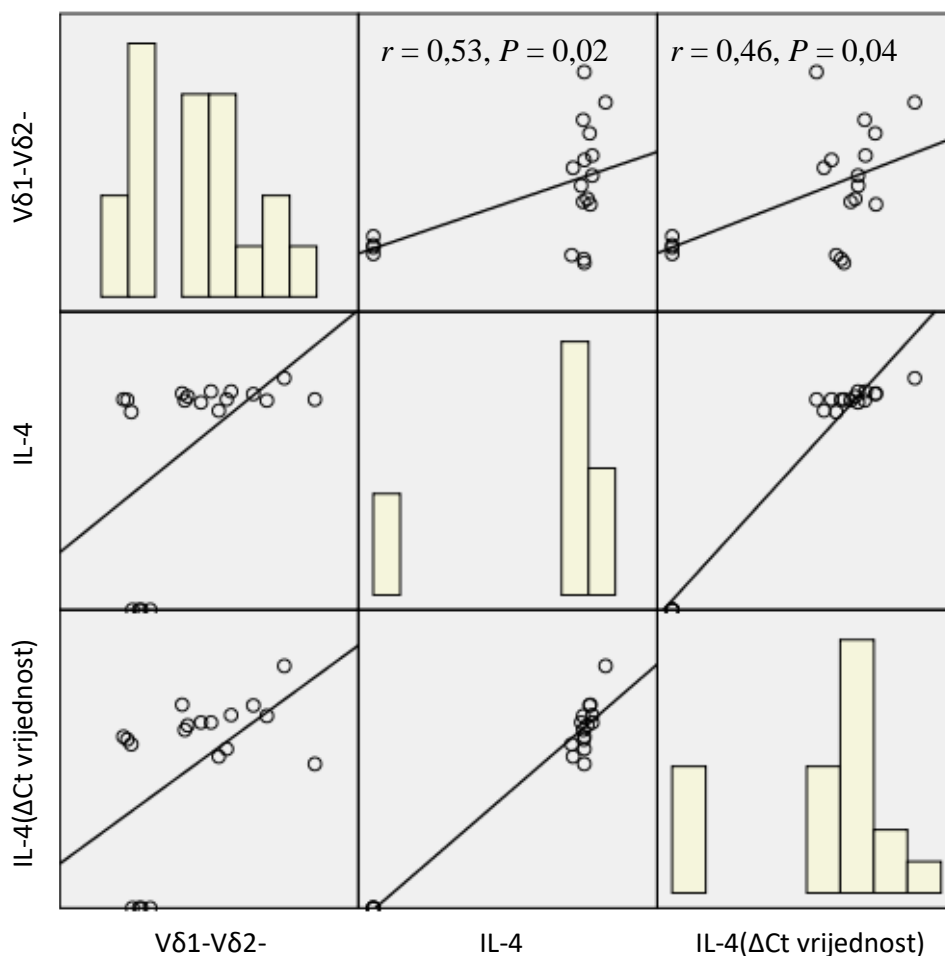
Slika 28. Povezanost $V\delta 1-V\delta 2$ -, $\gamma\delta$ T-limfocita i genskog izražaja IL-13 (ΔCt vrijednost) u uzorku polipa. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac.

Također uočena je i negativna povezanost genskog izražaja IL-13 (ΔCt vrijednost) s roditeljskim $\gamma\delta T$ stanicama (slika 29).



Slika 29. Povezanost $\gamma\delta T$ (% ukupnih T-limfocita) i genskog izražaja IL-13 (ΔC_t vrijednost) u uzorku polipa. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 % interval pouzdanosti.

Značajna je i pozitivna povezanost genskog izražaja IL-4 u stanicama iz polipa s relativnim udjelima V δ 1-V δ 2- stanica te genski izražaj IL-4 u stanicama polipa (ΔC_t vrijednost) s brojnošću V δ 1-V δ 2- stanica (slika 30).



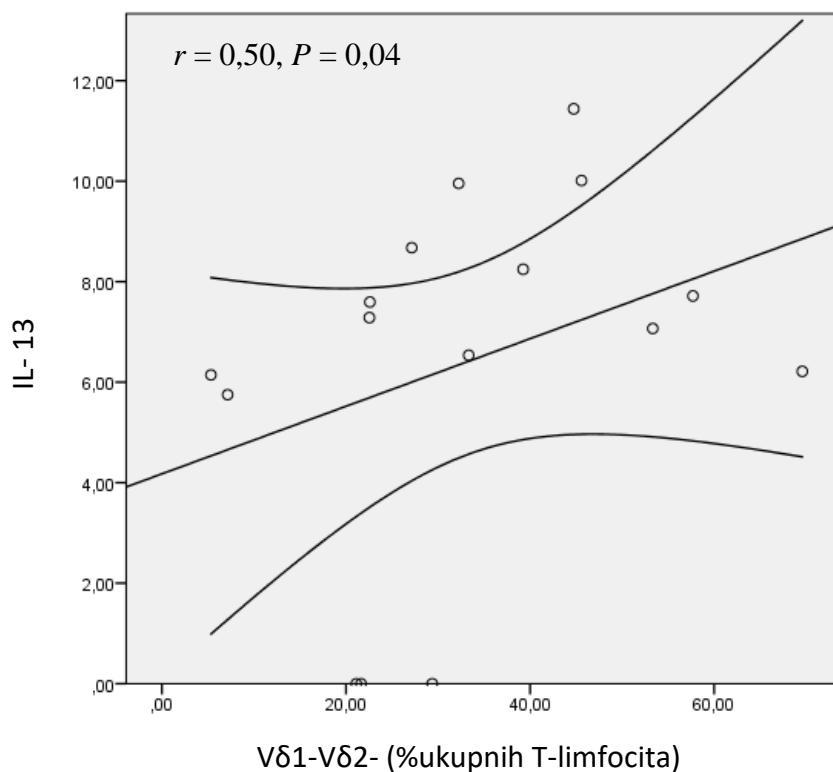
Slika 30. Povezanost V δ 1-V δ 2-(%ukupnih T-limfocita) i genskog izražaja IL-4, IL-4 (Δ Ct vrijednost) u uzorku polipa. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac.

4.7. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ kod bolesnika sa eKRSsNP s $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2-

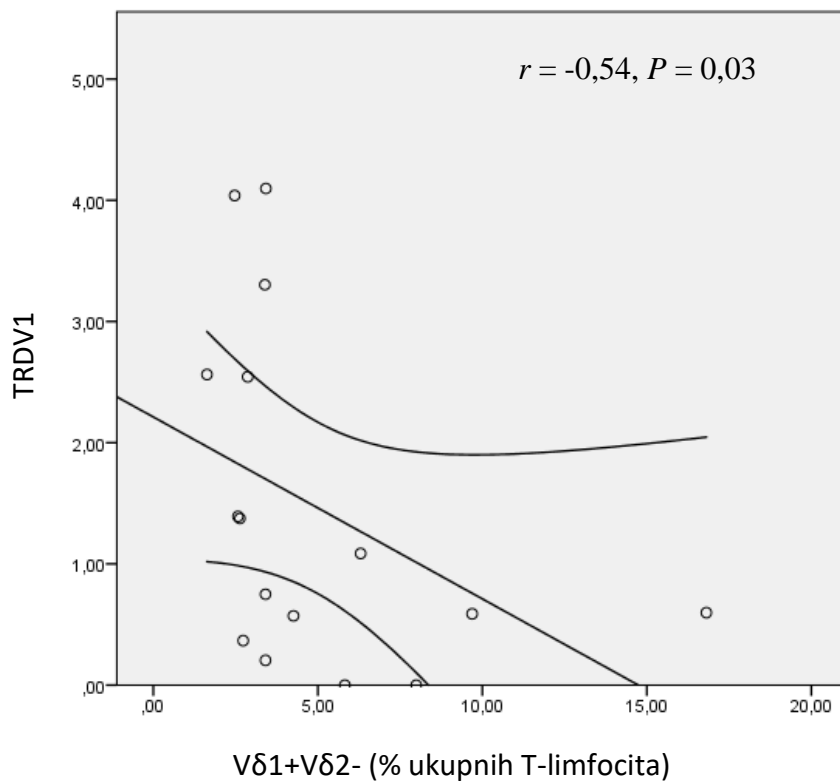
Ispitana je povezanost vrijednosti $\gamma\delta$ T, V δ 1+V δ 2-, V δ 2+V δ 1-, V δ 1-V δ 2- dobivenih protočnom citometrijom u uzorku SNŠ s vrijednostima genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 u uzorku SNŠ dobivenih PCR-om kod bolesnika eKRSsNP.

Zabilježena je pozitivna korelacija između genskog izražaja IL-13 (Δ Ct vrijednost) u stanicama SNŠ oboljelih od eKRSsNP s brojnošću V δ 1-V δ 2- limfocita (slika 31), a zatim i negativna povezanost genskog izražaja TRDV1 (veličina razlike) s udjelima V δ 1+V δ 2- stanica

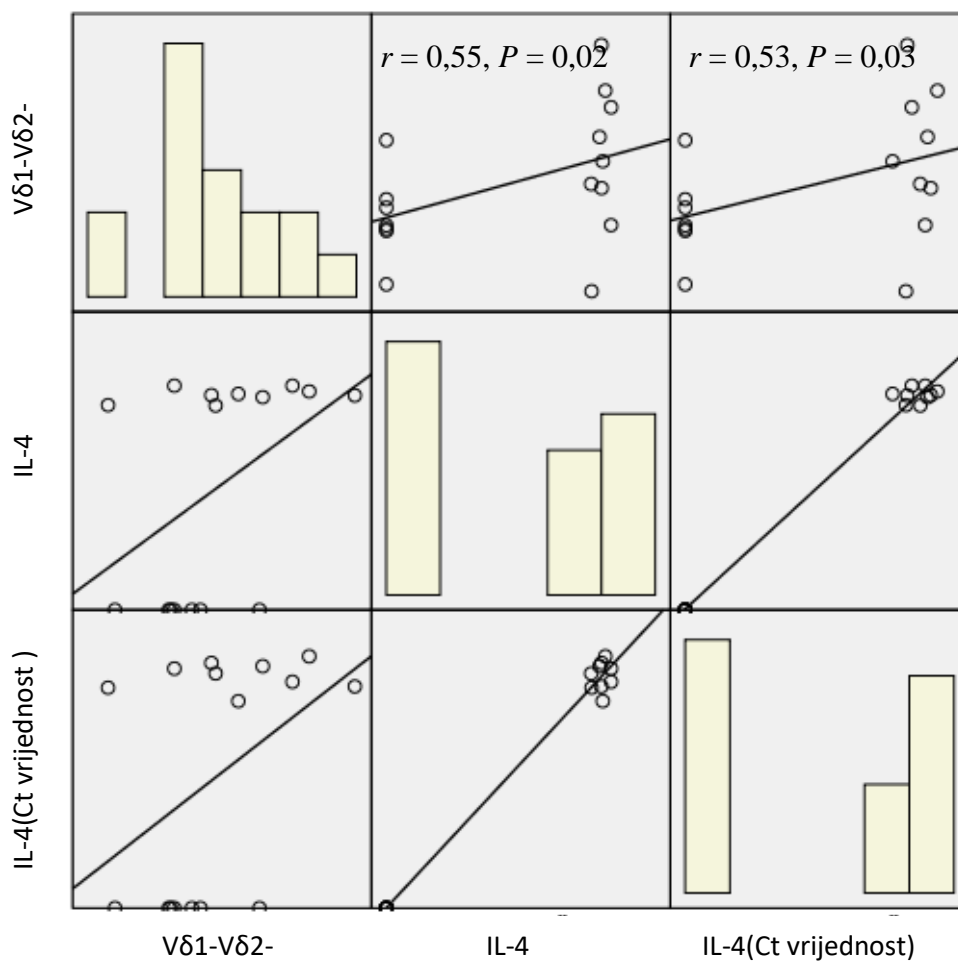
u SNŠ oboljelih (slika 32). Od interesa je i pozitivna povezanost genskog izražaja IL-4 s brojnošću V δ 1-V δ 2- stanica, u SNŠ oboljelih od eKRSsNP (slika 33).



Slika 31. Povezanost V δ 1-V δ 2- (% ukupnih T-limfocita) i genskog izražaja IL-13 (Δ Ct vrijednost) u uzorku SNŠ u bolesnika s eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.



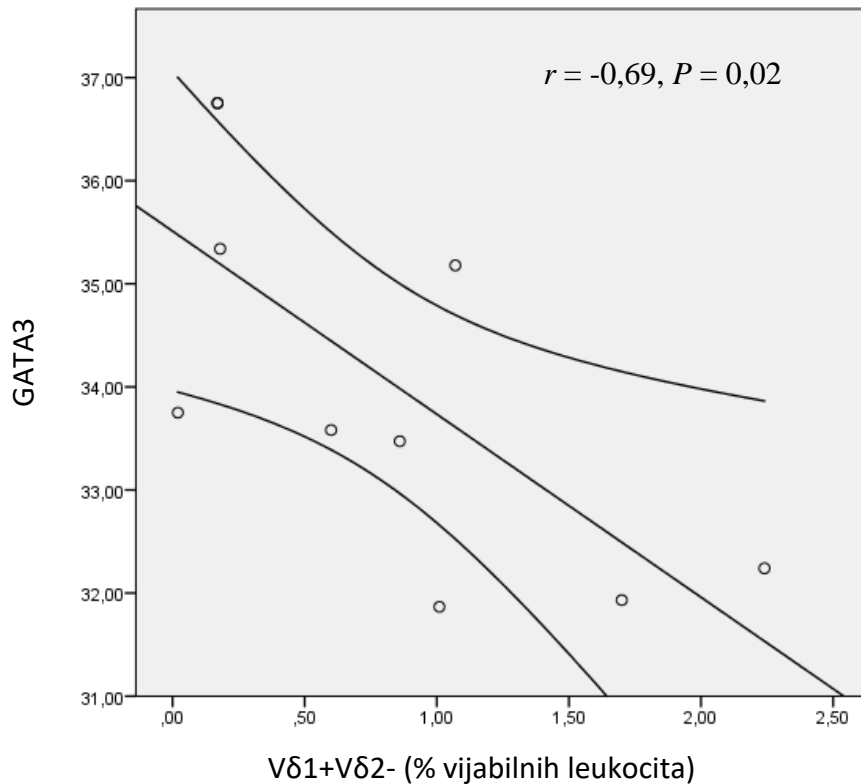
Slika 32. Povezanost Vδ1+Vδ2- (% ukupnih T-limfocita) i genskog izražaja TRDV1 u uzorku SNŠ u bolesnika s eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.



Slika 33. Povezanost Vδ1-Vδ2- (% ukupnih T-limfocita) i genskog izražaja IL-4, IL-4 (ΔCt vrijednost) u uzorku SNŠ u bolesnika sa eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho) (označeni su samo gdje je prisutna značajna povezanost). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac.

4.8. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika s $\gamma\delta$ T, Vδ1+Vδ2-, Vδ2+Vδ1-, Vδ1-Vδ2-

Ispitana je povezanost vrijednosti $\gamma\delta$ T, Vδ1+Vδ2-, Vδ2+Vδ1-, Vδ1-Vδ2- dobivenih protočnom citometrijom u uzorku SNŠ kontrolnih bolesnika s vrijednostima genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 dobivenih PCR-om. Zabilježena je negativna povezanost ekspresije gena GATA3 s brojnošću Vδ1+Vδ2- stanica u SNŠ kontrolnih bolesnika (slika 34).

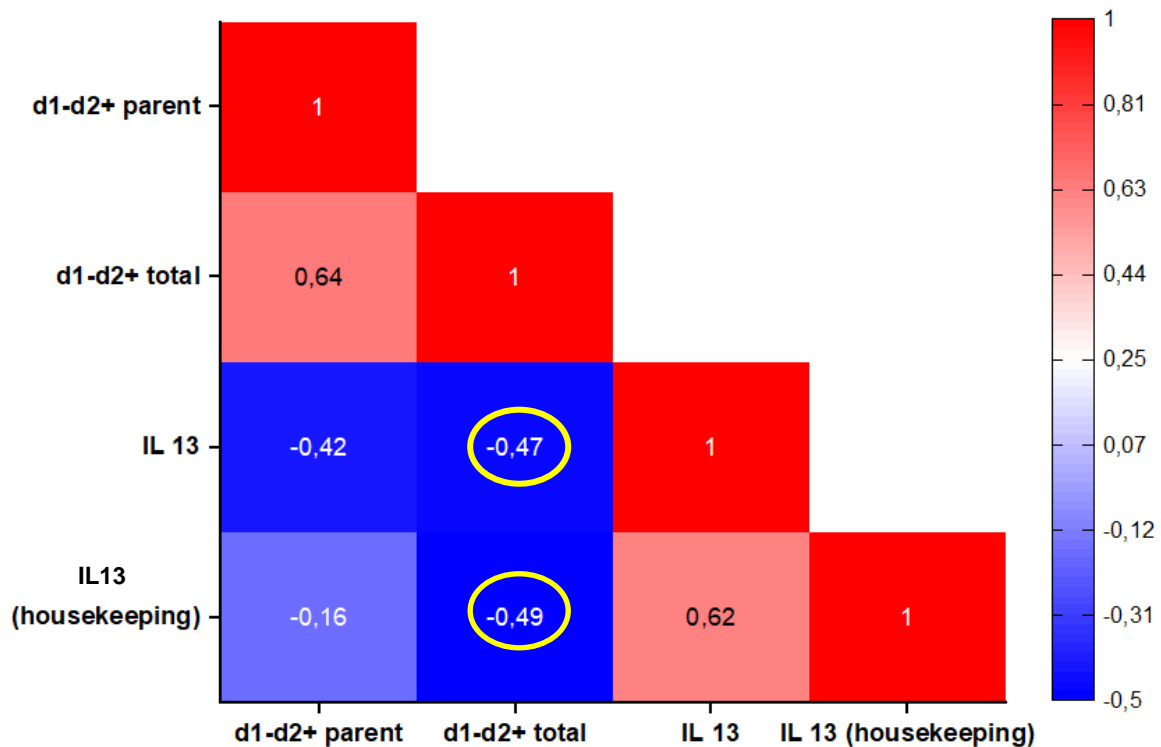


Slika 34. Povezanost Vδ1+Vδ2- (% vijabilnih leukocita) i genskog izražaja GATA3 u uzorku SNŠ kontrolnih bolesnika. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

4.9. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku polipa s δ1- δ2+, δ1+ δ2+, δ1+ δ2- u bolesnika sa eKRSsNP

Ispitana je povezanost vrijednosti δ1-δ2+, δ1+δ2+, δ1+δ2-, dobivenih protočnom citometrijom u uzorku polipa s vrijednostima genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 dobivenih PCR-om.

Zabilježena je negativna povezanost između broja δ1-δ2+ stanica (ukupno) i izražaja IL-13 u stanicama polipa oboljelih od eKRSsNP (slika 35).

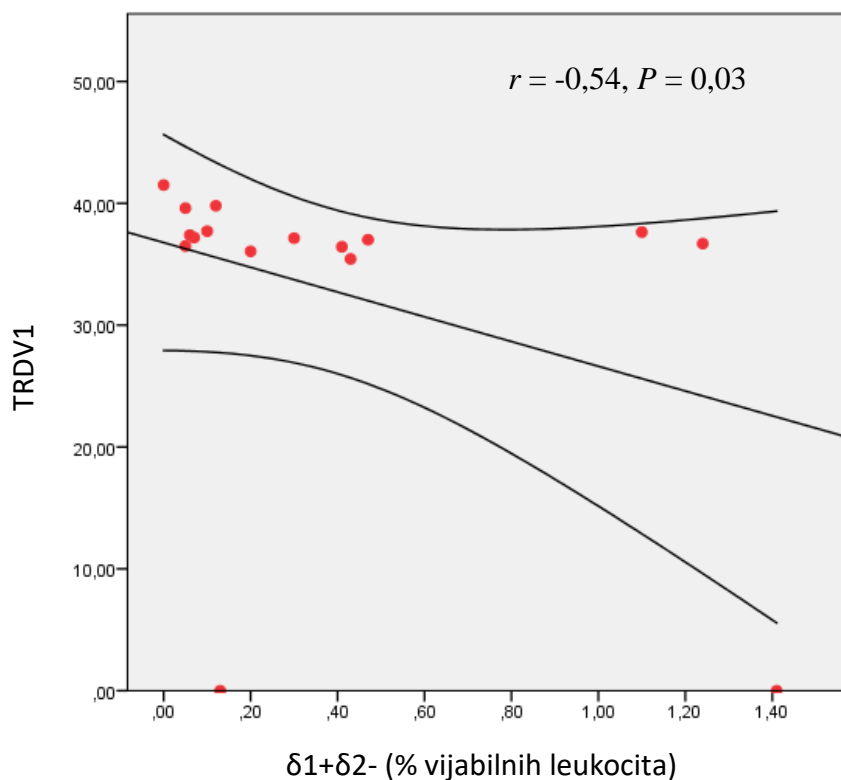


Slika 35. Obrazac povezanosti d1-d2+ ($\delta 1-\delta 2+$) (%vijabilnih leukocita (total) i % ukupnih T-limfocita (parent) vrijednosti) (total i parent) i genskog izražaja IL-13 i IL-13 (ΔC_t vrijednost ; u slici označeno kao "housekeeping") u uzorku polipa prikazan je toplinskom kartom (Spearmanov koeficijent korelacije). Statistički značajna povezanost (dvostrani $P < 0,05$) zaokružena je žutom bojom.

4.10. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ s $\delta 1-\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2-$ u bolesnika sa eKRSsNP

Ispitana je povezanost vrijednosti $\delta 1-\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2-$ dobivenih protočnom citometrijom u uzorku SNŠ s vrijednostima genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 u uzorku SNŠ kod bolesnika s eKRSsNP dobivenih PCR

Značajna i negativna povezanost prisutna je između $\delta 1+\delta 2-$ (ukupne vrijednosti) i izražaja TRDV1 gena u uzorku SNŠ (slika 36).

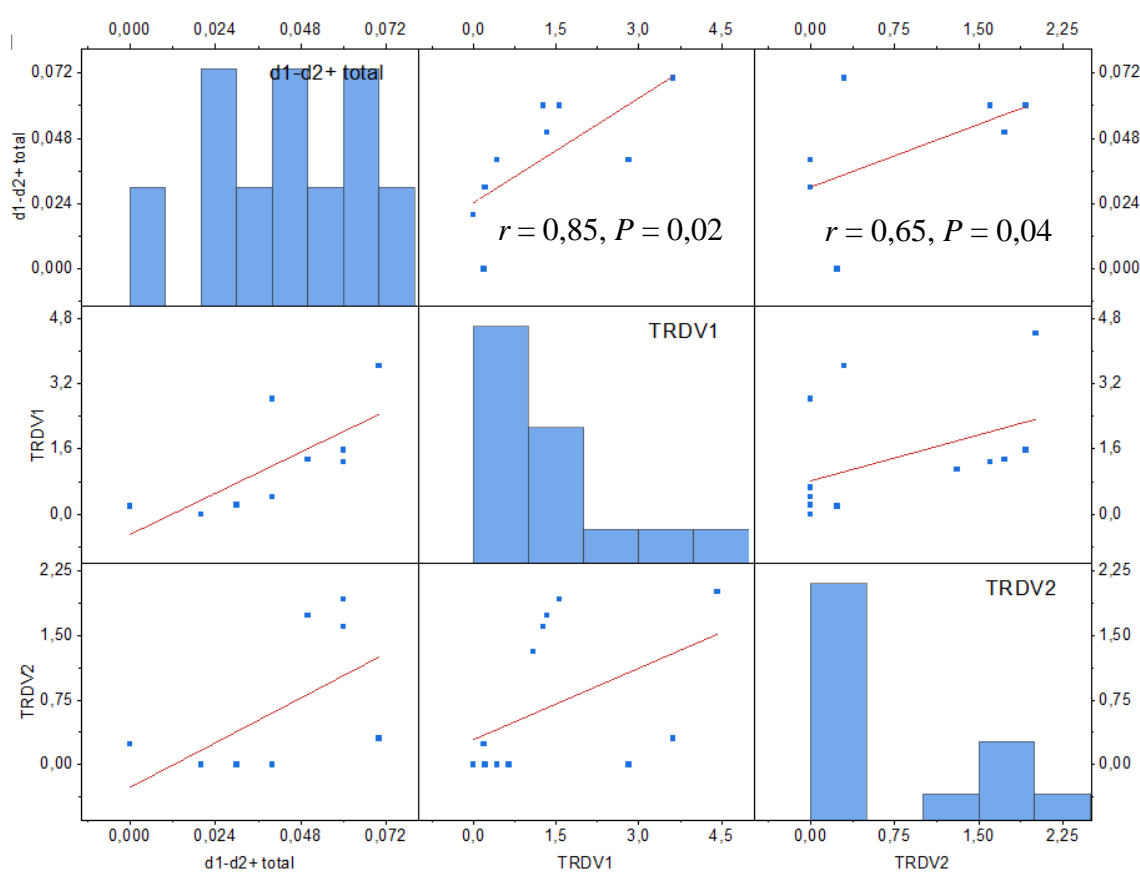


Slika 36. Povezanost $\delta 1+\delta 2-$ (% vijabilnih leukocita) i genskog izražaja TRDV1 u uzorku SNŠ bolesnika s eKRSsNP. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

4.11. Povezanost genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2, IL-4 u uzorku SNŠ s $\delta 1-\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2-$ kod kontrolnih ispitanika

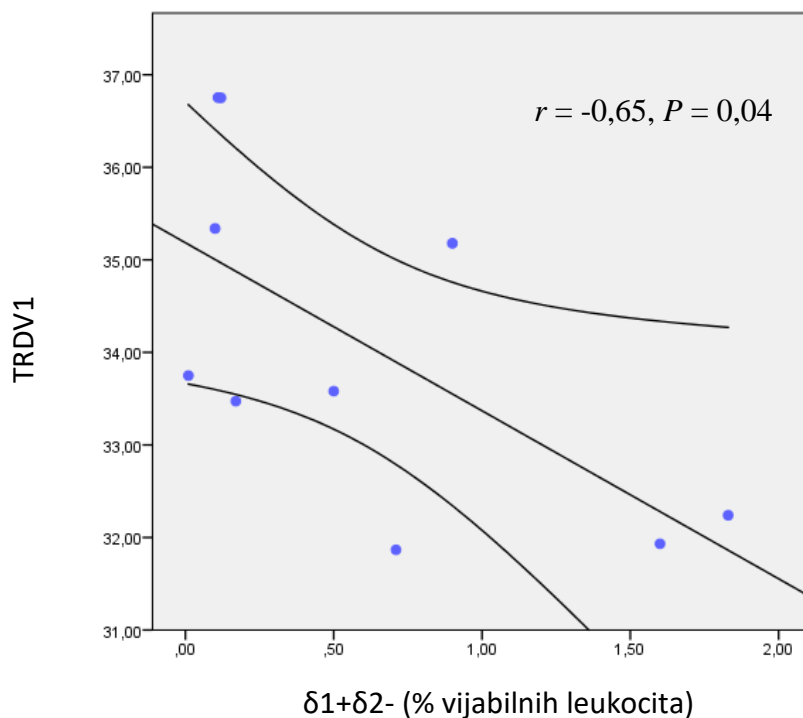
Ispitana je povezanost vrijednosti $\delta 1-\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2+$, $\delta 1+\delta 2-$ dobivenih protočnom citometrijom u uzorku SNŠ kontrola s vrijednostima genskog izražaja GATA3, IL-13, TRDV1, TRDV2 i IL-4 dobivenih PCR-om.

Pozitivna i značajna povezanost prisutna je između ukupne vrijednosti $\delta 1-\delta 2+$ i izražaja TRDV1 (veličina razlike) te TRDV2 (veličina razlike) gena u uzorku SNŠ kod kontrolnih ispitanika (slika 37).



Slika 37. Povezanost $\delta 1- \delta 2+$ (% vijabilnih leukocita) i genskog izražaja TRDV1, TRDV2 (veličina razlike) u uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho) (označeni su samo gdje je prisutna značajna povezanost). Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac.

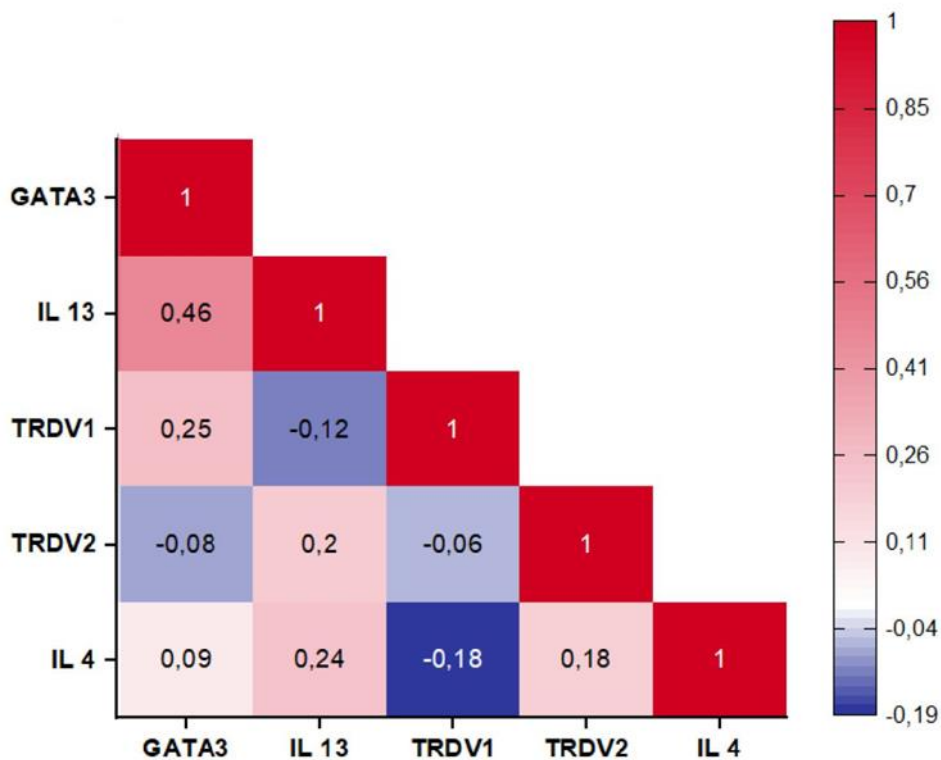
Negativna i značajna povezanost prisutna je između ukupnih vrijednosti $\delta 1+\delta 2-$ i genskog izražaja GATA 3 u uzorku SNŠ u kontrolnih ispitanika (slika 38).



Slika 38. Povezanost $\delta 1+\delta 2-$ (% vijabilnih leukocita) i genskog izražaja GATA3 u uzorku SNŠ u kontrolnih bolesnika. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije (Rho). Crna linija predstavlja linearni regresijski prava. Polje između zakrivljenih linija pokazuje 95 %-tni interval pouzdanosti.

4.12. Međugenska povezanost u uzorku polipa kod bolesnika s alergijskim kroničnim rinosinitisom s nosnom polipozom (eKRSsNP)

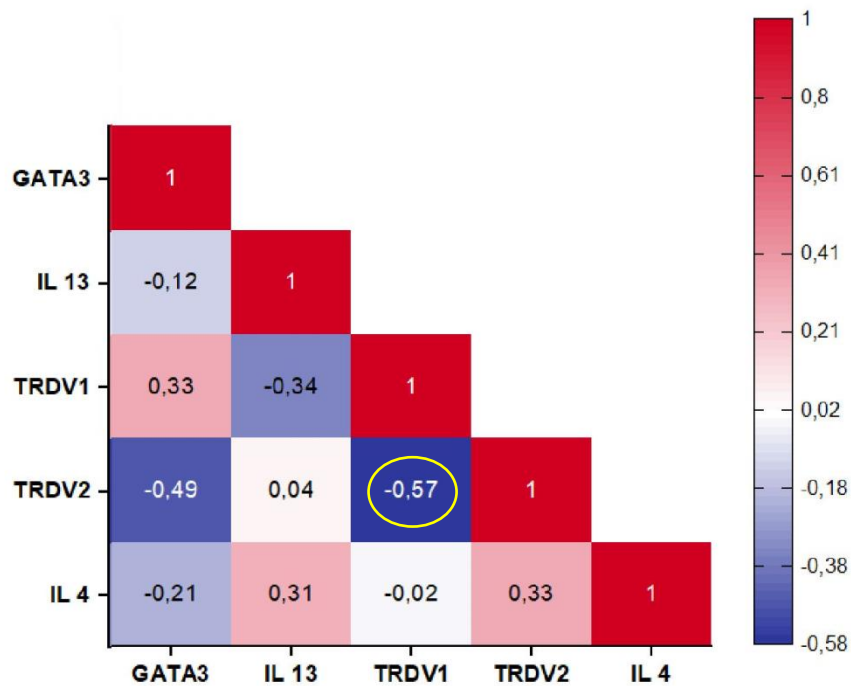
Statističkom obradom podataka nismo utvrdili značajnu međugensku povezanost u uzorku polipa kod bolesnika s eKRSsNP (slika 39).



Slika 39. Obrazac međugenske povezanosti u izražaju u uzorku polipa prikazan je toplinskom kartom (Spearmanov koeficijent korelacije). Statistički značajna povezanost (dvostrani $P < 0,05$) zaokružena je žutom bojom.

4.13. Međugenska povezanost u uzorku srednje nosne školjke (SNŠ) kod bolesnika sa eKRSsNP

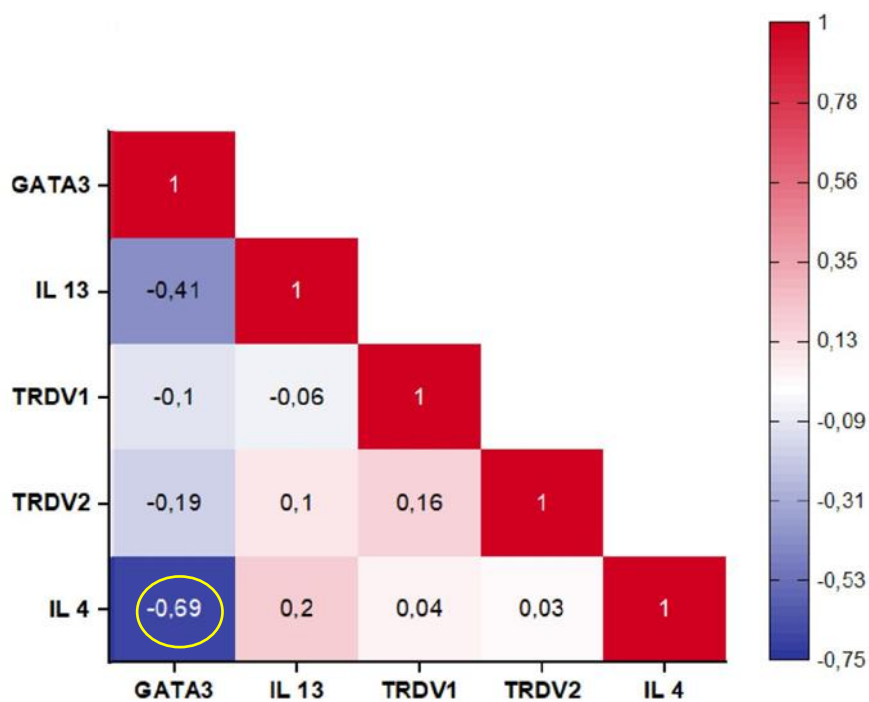
Između izražaja TRDV 1 i TRDV 2 gena postoji negativna i značajna povezanost u uzorku SNŠ u bolesnika s eKRSsNP (Slika 40).



Slika 40. Obrazac međugenske povezanosti u izražajuekspresiji u uzorku SNŠ skupine eKRSsNP prikazan je toplinskom kartom (Spearmanov koeficijent korelacije,). Statistički značajna povezanost (dvostrani $P < 0,05$) zaokružena je žutom bojom.

4.14. Međugenska povezanost u uzorku SNŠ kontrolnih ispitanika

Između izražaja GATA3 i IL-4 gena prisutna je značajna i negativna povezanost u uzorku SNŠ kod kontrolnih ispitanika (lika 41).



Slika 41. Obrazac međugenske povezanosti u izražaju u uzorku SNŠ kod kontrolne skupine bolesnika prikazan je toplinskom kartom (Spearmanov koeficijent korelacije). Statistički značajna povezanost (dvostrani $P < 0,05$) zaokružena je žutom bojom.

5. RASPRAVA

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na potencijalno važne promjene u brojnosti i sastavu subpopulacija $\gamma\delta$ T-limfocita u nosnim polipima i srednjoj nosnoj školjci oboljelih od eKRSsNP. Promjene u staničnim udjelima $\gamma\delta$ T stanica koreliraju s kliničkim pokazateljima i subjektivnom samoprocjenom težine bolesti, kao i s udjelom eozinofila u nosu, te razinom genskog izražaja upalnih citokina IL-4 i IL-13 u mononuklearnim stanicama porijeklom iz polipa i srednje nosne školjke oboljelih. Povećani genski izražaj IL-4 i IL-13, karakterističnih biljega imunskog odgovora tipa 2, nije bio povezan s kliničkim pokazateljima bolesti, ali je zabilježena pozitivna međuovisnost razine IL-4 i IL-13 mRNA, i brojnosti V δ 1-V δ 2- stanica u nosnim polipima, odnosno srednjoj nosnoj školjci oboljelih. S druge strane, genski izražaj TRDV1 i IL-4 gena, negativno je korelirao s ukupnim vrijednostima IgE, i udjelom eozinofila u nosu oboljelih. Izražaj TRDV2 gena pozitivno je korelirala s brojnošću δ 1- δ 2+ stanica samo u srednjoj nosnoj školjci zdravih kontrola, dok je izražaj GATA3 gena opadao s porastom broja δ 1+ δ 2- stanica u zdravoj nosnoj sluznici.

U našem istraživanju bolesnici sa eKRSsNP bili su značajno stariji u odnosu na kontrole. U nedavnom istraživanju autora Mihalj H. i suradnici bolesnici sa KRSsNP bili su također značajno stariji od zdravih kontrola (Mihalj, 2022), ali značajni učinci dobi na sinonazalni transkriptom nisu primjećeni. Sukladno dobro poznatim negativnim učincima nosne polipoze na kvalitetu života oboljelih od KRSsNP (Mozzanica, 2016), naši rezultati također potvrđuju značajno veće vrijednosti SNOT-22 upitnika u ispitanika eKRSsNP. Sveukupno, ovo istraživanje donosi dosad neopisane kompozicijske promjene $\gamma\delta$ T-limfocitnog sijela u nosnoj polipozi, a koje se zbivaju u ovisnosti o veličini eozinofilnog infiltrata i promjenama mononuklearnog transkriptoma u sinonazalnoj sluznici.

5.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta T stanica u tkivu polipa bolesnika sa eKRSsNP i tkivu SNŠ bolesnika s eKRS te kontrolnih ispitanika značajno se razlikuje

Gamma delta ($\gamma\delta$) T-limfociti značajno su više zastupljeni u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na tkivo SNŠ bolesnika s eKRSsNP i kontrolne ispitanike. U studiji Tsuromotoa i suradnika, gdje su se uspoređivale razine $\gamma\delta$ T-limfocita između uzorka nosnih

polipa i donje nosne školjke, a i uzorak bolesnika s nosnim polipima s bolesnicima s dokazanim alergijama utvrđena je statistički značajno veća distribucija između dviju skupina. Zanimljiva je i uočenost relativno niskih razina $\gamma\delta$ T-limfocita u bolesnika s dokazanim alergijama nosne sluznice, ali bez nosne polipoze (Tsurumoto, 1997). Također, $\gamma\delta$ T-stanice značajno su manje distribucije u bolesnica s endometrijalnim polipima u odnosu na zdrave ispitanice te je omjer $V\delta 1/V\delta 2$ povišen u bolesnica s izraženijim endometrijalnim polipima, predviđajući slabiji fertilni kapacitet u teže oboljelih bolesnica (Li X. H., 2021).

Subpopulacija $V\delta 2+$ značajno je zastupljenija u tkivima polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na uzorke SNŠ obiju skupina. Od ranije je poznato da $V\gamma 2V\delta 2$ stanice mogu producirati proinflamatorne citokine i kemokine, lučiti čimbenike rasta za epitelne stanice, ali i prepoznati i uništavati velik broj tumorskih stanica (Morita, 2007). Dokazana je i prisutnost $\delta 2$ stanica u drugim upalnim bolestima poput psorijaze (Plužarić, 2020), koja zbog svoje povezanosti s atopijom i kronicitetom ima sličnosti s eKRS. No, u psorijazi su zabilježene i značajno manje količine $V\gamma 9V\delta 2$ stanica u psorijatičnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (Fay, 2016).

Dvostruko negativne $V\delta 1-V\delta 2-$ stanice, bile su također značajno brojnije u uzorcima polipa u odnosu na uzorke SNŠ oboljelih i zdravih ispitanika. Ranije je dokazana značajno veća pojavnost $\gamma\delta$ T-limfocita ($V\gamma 9V\delta 2$) u perifernoj cirkulaciji djece s atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolne ispitanike (Cairo, 2005). Obzirom na nedostupnost monoklonalnih protutijela za obilježavanje šireg panela $\gamma\delta T$ subpopulacija, imunosni fenotip ovih potencijalno važnih limfocita ostaje nepoznat i čini važan cilj za daljnja istraživanja patogeneze KRSsNP.

Subpopulacija stanica s lancima $\delta 1+$ značajno je manje zastupljena u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na sluznicu SNŠ oboljelih i zdravih ispitanika. Bolesnici s manjom frekvencijom roditeljskih $\delta 1$ stanica uglavnom su pripadali uzorcima nosnih polipa bolesnika s eKRSsNP, što objašnjava negativnu korelaciju između opisanih stanica i naših ciljnih skupina bolesnika. Do sada nije istraživana uloga stanica $\delta 1+$ su eKRSsNP, no prema prikazanim rezultatima značajno su inhibirane u patogenezi eKRSsNP. Dosadašnje studije opisuju protutumorske i antivirusne uloge $\delta 1+$ stanica, barem u kolorektalnom karcinomu gdje proizvodnjom IL-17 potiču upalu sluznice kolona (Wu P, 2014), a i jačaju imunološki odgovor u virusnim infekcijama poput hepatitisa (Agrati C D. G., 2001).

Naši rezultati pokazuju da za razliku od značajno manje zastupljenih $\delta 1+$ stanica u tkivu polipa,, ima $\delta 2+$ stanica moguće imaju patogenu ulogu u razvoju eKRSsNP, gdje djeluju poput okidača

Th2 upale, i stoga se ističu kao meta za buduća istraživanja u stvaranju upale tipa 2 u nosnoj polipozi.

5.2. Povezanost kliničkih i upalnih biljega sa subpopulacijom gamma delta T-limfocita

Vrijednosti SNOT22 značajno pozitivno su korelirale s distribucijom ukupnih $\gamma\delta$ -T-i dvostruko negativnih $\delta 1$ - $\delta 2$ - limfocita, odnosno stanicama koje na svojoj površini nemaju prisutan ni $\delta 1$ ni $\delta 2$ lanac, a prema dosadašnjim istraživanjima čine manjinu u $\gamma\delta$ T-limfocitima (Rutishauser, 2019). Nedvojbeno je da SNOT22 ima veliku važnost u praćenju operiranih bolesnika zbog nosne polipoze i njihovih tegoba (Soler, 2018), a s obzirom na to da se radi isključivo o subjektivnoj samoprocjeni različitih profila ispitanika, potrebna su daljnja mjerenja i istraživanja prije jasnijih zaključaka o povezanosti SNOT22 upitnika i udjela $\gamma\delta$ T subpopulacija u sinonazalnoj sluznici..

Uloga eozinofila u nastajanju KRSsNP ranije je vezana uz kemotaksiju imunskih stanica, citotoksično djelovanje te su imunoregulatorne učinke (Vanderhaegen, 2021). U okviru ove studije, opaženi su dodatni potencijalni učinci eozinofilnog infiltrata na promjenu broja ukupnih $\gamma\delta$ T i $V\delta 1+$ limfocita u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP. Ranije studije pokazale su povećan udio eozinofila u sluznici alergijskih bolesnika, a ranije je opisana i uloga gama delta T-limfocita u alergijskim bolestima (Zheng R, 2014). Veći udio eozinofila u brisu nosa pokazuje umjerenu osjetljivost i visoku specifičnost za asimptomatske bolesnike s alergijskim rinitisom (AR) (Nurkic J, 2016). Također, prema Usha i suradnicima, izmjerena količina eozinofila u brisu nosa $> 0,2/HPF$ dovoljan je podatak za dijagnostiku AR-a u odraslih (Usha, 2022). Nadalje, smanjenje broja eozinofila u nosnoj sluznici utvrđeno je u prospektivnom praćenju tijekom liječenja oboljelih od eKRSsNP s dupilumabom, što govori u prilog ovisnosti udjela eozinofila i težine eKRSsNP oboljenja (Danisman, 2023).

Vrijednost sustava Lund-Mackey (LM), kao objektivnog radiološkog bodovnog sustava za procjenu zahvaćenosti sinusa upalom pozitivno su korelirale s količinom $\gamma\delta$ T-limfocita u tkivu polipa. Sustav LM je priznat, dobro opisani alat za procjenu težine kroničnog rinosinuitisa jer što je više sinusa opstruirano i zahvaćeno polipozom ili upalom, to su teži simptomi koje osjeća pacijent (Okushi, 2013). Pozitivna korelacija LM vrijednosti i udjela $\gamma\delta$ T stanica u tom kontekstu, potvrđuje značajnu ulogu $\gamma\delta$ T-limfocita u eKRSsNP, a dodatnoj težini dokaza

pridonosi i ranije opisana pozitivna korelacija između SNOT-22 te sustava LM udjelom $\gamma\delta$ T-limfocita u sinonazalnoj sluznici oboljelih, povezujući brojnost $\gamma\delta$ T stanica s kvalitetom života oboljelih (Schalek, 2022).

Nije bilo statistički značajne razlike u prisutnosti bakterija u maksilarnom sinusu između dviju skupina bolesnika, no gotovo svi bolesnici s eKRSsNP imali su prisutnu barem jednu bakteriju u maksilarnom sinusu. Uloga bakterija, posebno enterotoksina *S.aureusa* nije u potpunosti razjašnjena u nastanku nosnih polipa, no česta prisutnost gram-pozitivnih bakterija u bolesnika s KRSsNP bez ekspresije IL-5, a time i izražene upale Th2 upućuje na alternativne, bakterijski posredovane mehanizme u nastanku nosne polipoze (Ba, 2011).

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

5.3. IL-4 i IL-13 izražaj i povezanost s $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima

Genski izražaj IL-13 i IL-4 bio je značajno veći u mononuklearnim stanicama izoliranim iz tkiva polipa u odnosu na stanice iz SNS oboljelih i zdravih ispitanika. Ovi rezultati nalikuju rezultatima autora Babe i suradnici gdje je također zabilježen značajno veći izražaj IL-13 i IL-4 (Baba, 2015). Uloga upale tipa Th2, a time i uloga karakterističnih linijskih citokina IL-13 i IL-4 ranije je prepoznata u KRSsNP (Schleimer RP, 2017), ali je očito značajna i u podskupini alergijskog KRSsNP. Tkivo nosnog polipa u bolesnika s eKRSsNP moguće se mijenja pod utjecajem učinaka Th2 i Th17 upale, i pripadajućih citokina. IL-4 i IL-13 štoviše inhibiraju izražaj Th17 povezanih citokina, dok Th-17 citokini (IL-17 i TGF- β) posredno povećavaju razine Th2 citokina. Iako se rezultati ove studije ne dotiču regulatornih mehanizama između Th2 i Th17 imunogenog odgovora, pretpostavka je da Th2 upalu u eKRSsNP potpomaže i stimulacija Th17 (Ryu G, 2020). Wang i suradnici su pomoću qRT-PCR analize pokazali da mRNA razine IL-4 i IL-13 snažno induciraju genski i proteinski izražaj Sonic Hedgehog signalnog puta, koji pak značajno doprinosi razvoju Th2 imunogenog odgovora i posljedičnoj metaplaziji i hipersekreciji sinonazalne sluznice epitela dišnih puteva. Učinci povećane ekspresije IL-4 vezani su uz pojačanu fosforilaciju i aktivaciju JAK 1/2 i STAT6

transkripcijskih čimbenika, ali i izražaj SHH proteina, ključnih medijatora karakterističnih promjena u alergijskom epitelu (Wang X, 2020). Važnu ulogu ovih citokina u eKRSsNP potvrđuju i izvrsni rezultati liječenja primjenom anti-IL4 i anti-IL13 bioloških pripravaka poput dupilumaba sa značajnim smanjenjem recidiva (Bachert C. H., 2019). Genski izražaj IL-13 u uzorku polipa te IL-4 u uzorku SNŠ kontrola negativno korelira s rezultatima upitnika SNOT22. Racette i suradnici dokazali su pozitivnu korelaciju SNOT-22 i Th2 medijatora upale poput IL-5, IL-13 (Racette, 2022), što nam posredno govori o važnosti SNOT-22 jer i naši rezultati ukazuju na prediktivnu vrijednost ovog upitnika kod postavljanja dijagnoze, predviđanja ishoda i potencijalnih želja bolesnika (Liu, 2022). Kontradiktorni rezultati povezanosti tih gena sa SNOT22 mogu se objasniti velikim utjecajem subjektivne procjene bolesnika pri ispunjavanju SNOT22. Izražaj tih dvaju gena odgovornih za upalu Th2 pozitivno i značajno korelira i s Vδ1-Vδ2- stanicama u uzorku polipa i SNŠ bolesnika s eKRSsNP, pri čemu IL-13 pozitivno korelira s pojavom ukupnog broja $\gamma\delta$ T-limfocita. Dvostruko negativne stanice nisu do sada mjerene u uzorcima bolesnika s eKRSsNP, no ranija mjerenja V γ 1+, V γ 2+, V γ 3+ i V γ 4+ subpopulacija nisu bila značajno različita između skupine bolesnika koji boluju od KRSsNP, eKRSsNP i KRSbNP (Lee W. C., 2017). S druge strane, mišji V γ 1+ $\gamma\delta$ T-limfociti izražavaju IL-13 i IL-5 aktivirajući eozinofile i smanjujući broj regulatornih T-limfocita. Time ove subpopulacije pogoršavaju upalu i alergijski odgovor, potencijalno i kao posljedica posrednih učinaka na aktivaciju drugih imunoloških stanica, poput B-limfocita, makrofaga i mastocita potičući stvaranje nosnih polipa, što pogoršava simptome (Kang I. K., 2023). Dvostruko negativne stanice dijelom obuhvaćaju i δ 3+ limfocite koji su ranije u značajnom broju zabilježeni u upalnim bolestima crijeva (Falk MC, 1994) i u epitelu jetre, gdje se pojavljuju i δ 5+ stanice nepoznate uloge (Zhao, 2018). U nosnim polipima naših eKRSsNP ispitanika zabilježena je i značajna negativna korelacija između izražaja IL-13 te Vδ1+Vδ2- limfocita, potencijalno kao posljedica njihovog malog broja u sinonazalnoj sluznici oboljelih. S druge strane, patološka uloga δ 1+ $\gamma\delta$ T-limfocita ranije je opisana na drugim mjestima dišnog sustava, poput pluća, gdje δ 1+ $\gamma\delta$ T-limfociti izražavaju CD30 i IL-4 čime pogoršavaju alergijske simptome (Kang I. K., 2023). Zbog raznolikosti $\gamma\delta$ T-staničnih receptora potrebne su međutim, dodatne studije za razjašnjenje uloge fenotipski nedefiniranih $\gamma\delta$ T u eKRSsNP. Izražaj IL-4 gena negativno je pak korelirao s udjelom eozinofila na sluznici nosa, što traži dodatne potvrde u daljnjim studijama. Rezultati prethodnih studija nisu konzistentni, te u nekim slučajevima pokazuju da periferna i tkivna razina eozinofila ne korelira s udjelom eozinofila uzorkovanim brisom nosa (Gevaert, 2022).

5.4. GATA3 genski izražaj i povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima

Genski izražaj GATA3 nije seznačajno razlikovao u tkivima ispitivanih skupina, niti je bio povezan s kliničkim pokazateljima težine bolesti. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima Lalu i suradnici, koji nisu zabilježili značajnu korelaciju između izražaja GATA3 i tkivne eozinofilije (Lal D. W.-H., 2019), dok su Babe i suradnici utvrdili značajno niži genski izražaj GATA3 u alergijskom KRSsNP. Ove razlike potencijalno odražavaju razlike u izboru biološkog materijala, pri čemu je genska analiza u okviru ove studije provedena u tkivnim mononuklearima, a ne tkivu polipa ili sinonazalne sluznice. U mononuklearima iz SNŠ kontrolnih ispitanika izražaj GATA3 negativno je korelirao s brojnošću V δ 1+V δ 2- stanica. S obzirom na da GATA3 ima poznatu ulogu promotora i biljega Th2 upale (Breiteneder, 2020), koja se povezuje s nastankom eKRSsNP, negativna korelacija GATA3 i broja $\gamma\delta$ T stanica u zdravoj sluznici nosa moguće odražava redovite regulatorne obrasce GATA3 izražaja u fiziološkim uvjetima. S druge strane, povećana zastupljenost V δ 1+V δ 2- izmjerena je u ranijim studijama u oštećenom crijevnom epitelu i moguće posreduje regeneraciju epitela crijeva (Kabelitz, 2005). U studiji Soklića i suradnika zabilježen je značajno veći izražaj GATA3 u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na bolesnike s KRSbNP, što ukazuje na važnu ulogu izražaja toga gena u patogenezi nastanka nosne polipoze (Soklic TK, 2019). Uloga GATA3 u mononuklearnim stanicama nosne sluznice do sada nije istražena, no negativna korelacija s GATA3 i V δ 1+V δ 2- stanica ukazuje na potencijalno važne regulatorne učinke.

5.5. Genski izražaj TRDV1 i TRDV2 te povezanost sa $\gamma\delta$ T-limfocitima te kliničkim i upalnim parametrima

Tijekom razvoja i diferencijacije T-limfocita, delta (δ) se lanac sintetizira rekombinacijom TRDD i TRDJ sastavnica, i potom udružuje se jednom od brojnih genskih varijanti TRDV gena (Satyanarayana, 1988). Izražaj fuzijskih transkripata TRDV1 u mononuklearnim stanicama nosnih polipa je pozitivno, a u stanicama srednje nosne školjke negativno korelirao s rezultatima SNOT22. Kako je ranije napomenuto, te proturječnosti mogu se objasniti izrazitom subjektivnošću pri ispunjavanju SNOT22 upitnika, ali i različitim fenotipom i tkivnim tropizmom $\gamma\delta$ T subpopulacija u sinonazalnoj sluznici oboljelih. Zabilježena je ujedno i negativna korelacija između izražaja fuzijskih transkripata TRDV1 i serumske razine IgE u tkivu polipa. Zanimljivo, Settipanea suradnici ranije su utvrdili veću

razinu tkivnog IgE u nosnom polipu u odnosu na serumske i tkivne razine u tonzilama eKRSsNP oboljelih (Settipane G, 1996). . Ranije je također dokazana povezanost serumske razine IgE s težinom lokalne upale u nosnoj polipozi i tkivnom razinom IgE (Bachert C. G., 2001). U našem istraživanju negativna korelacija između TRDV1 i IgE u tkivu SNS bolesnika s eKRSsNP upućuje na suprotnu potencijalno protektivnu ulogu $\delta 1+$ subpopulacije u održavanju razine IgE protutijela u sinonazalnoj sluznici. U budućim istraživanjima potrebno je analizirati ukupni repertoar $\gamma\delta$ T staničnih receptora u potrazi za rizičnim $\gamma\delta$ T subpopulacijama u pozadini eKRSsNP.

5.6. Međugenska povezanost između ispitivanih gena

U uzorcima SNS bolesnika s eKRSsNP zabilježena je negativna korelacija između genskog izražaja fuzijskih transkripata TRDV1 i TRDV2, koja moguće dijelom odražava povećanje $\delta 2+$ i dvostruko negativnih $\delta 1-\delta 2-$ limfocita u sinonazalnoj sluznici oboljelih, na uštrb $\delta 1+$ subpopulacija. Jednaki obrasci međovisnosti međutim nisu zabilježeni u nosnim polipima, što ukazuje na potrebu daljnje analize fuzijskih transkripata δ -lanaca T staničnih receptora, u studijama šireg opsega i longitudinalnog karaktera, primjenom metoda i tehnologija za analizu ukupnog $\gamma\delta$ TCR repertoara. Kako je ranije u raspravi naglašeno, $\delta 2+$ stanice su među najzastupljenijima u tkivu nosnih polipa kod bolesnika s eKRSsNP od svih subpopulacija $\gamma\delta$ T-limfocita, a $\delta 1+$ stanice značajno su više zastupljene u kontrolnih ispitanika, i ove razlike potencijalno oblikuju opažene korelacijske obrasce. Neočekivano, izražaj GATA-3 gena je negativno korelirao s izražajem gena za IL-4 u stanicama srednje nosne školjke kontrolnih ispitanika. Prema Seki i suradnicima, poticajem proizvodnje citokina IL-4 povećava se stvaranje i GATA3 u mišjih modela što je u suprotnosti sa rezultatima u uzorcima srednje nosne školjke kontrolnih ispitanika u našoj studiji (Seki, 2004). S obzirom na različit imunski sastav i individualno specifična obilježja sinonazalne sluznice zdravih kontrola, kao i manji broj uključenih zdravih ispitanika, mehanicističko značenje ove korelacije zahtjeva dodatne analize.

5.7. Ograničenje istraživanja

U svrhu preciznijeg uvida u fenotip i ulogu $\gamma\delta$ T-limfocita ali i važnosti istraženih gena, bilo bi zanimljivo učiniti prospektivnu studiju bolesnika s eKRSsNP koji se koriste

intranazalnom kortikosteroidnom terapijom i u slučaju recidiva nosne polipoze i potrebe za novim operativnim zahvatom ponoviti uzorkovanje SNŠ i polipa te usporediti izražaj gena i količinu $\gamma\delta$ T-limfocita.

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

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

Unatoč navedenim ograničenjima, spoznaje dobivene provedenom analizom tkivnih $\gamma\delta$ T-limfocita te izražajem opisanih gena otvorena su brojna pitanja u svrhu daljnjih istraživanja u ovom području.

6. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati iznjedrili su sljedeće zaključke:

1. Bolesnici s eozinofilnim kroničnim rinosinuitisom s nosnom polipozom (eKRSsNP) značajno su stariji te imaju značajno lošiji rezultat (više bodova) na upitniku SNOT22 u odnosu na kontrolne ispitanike što ukazuje na subjektivno lošiju kvalitetu života.
2. Gamma delta ($\gamma\delta$) T-stanice značajno su više zastupljene u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz tkiva polipa u bolesnika s eKRSsNP u odnosu na populaciju mononuklearnih stanica izoliranih iz tkiva srednje nosne školjke (SNŠ) bolesnika s eKRSsNP i kontrolnih ispitanika. Osim toga, utvrđeni su značajno veći udjeli subpopulacije $\delta 2+$ i dvostruko negativnih $\delta 1-\delta 2-$ stanica uz istovremeno značajno smanjenje frekvencije $\delta 1+$ T-limfocita u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz tkiva polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na stanice izolirane iz SNŠ u objema skupinama. Navedeni rezultati ukazuju na mogući doprinos obogaćenih $\delta 2+$ i dvostruko negativnih $\delta 1-\delta 2-$ subpopulacija u razvoju nosne polipoze.
3. Objektivni klinički pokazatelji težine bolesti eKRSsNP (Lund-Mackey i udio eozinofila u nosu) pozitivno koreliraju sa zastupljenošću $\gamma\delta$ T-stanice u tkivu nosnih polipa, što ukazuje na moguću ulogu ($\gamma\delta$) T-stanica kako u razvoju tipa 2 upale tako i u progresiji i težini bolesti.
4. Osim toga, utvrđena je pozitivna korelacija između rezultata SNOT22 upitnika i frekvencije $\gamma\delta$ T-limfocita što potvrđuje dijagnostičku vrijednost SNOT22 upitnika u procjeni stadija eKRSsNP.
5. Genski izražaj IL-4 i IL-13 značajno je veći u tkivu polipa bolesnika s eKRSsNP u odnosu na tkivo SNŠ bolesnika s eKRSsNP i kontrolnih ispitanika, što je u skladu s značajem navedenih citokina u razvoju upale tipa 2 te patogenezi i nastanku nosne polipoze.
6. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između izražaja gena za IL-4 te zastupljenosti subpopulacije $\delta 1-\delta 2-$ $\gamma\delta$ T-limfocita u tkivu polipa te IL-4 i IL-13 u tkivu SNŠ bolesnika s eKRSsNP sa istom subpopulacijom što djelomično potvrđuje našu hipotezu o doprinosu $\gamma\delta$ T-limfocita razvoju tipa 2 upale i nastanku eKRSsNP.
7. Subpopulacija $\delta 1+$ $\gamma\delta$ T-limfocita nema značajnu ulogu u nastanku nosne polipoze kod bolesnika s kroničnim alergijskim rinosinuitisom.

7. REFERENCE

1. Cappello, Z. J., Minutello, K., & Dublin, A. B. (2023). Anatomy, Head and Neck, Nose Paranasal Sinuses. In StatPearls. StatPearls Publishing. Pristupljeno: 23.09.2023.
2. Beule A. Epidemiology of chronic rhinosinusitis, selected risk factors, comorbidities, and economic burden. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2015
3. Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2010
4. Adams, E. J., Gu, S., & Luoma, A. M. (2015). Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cellular immunology*, 296(1), 31–40.
5. Agrati, C., Cimini, E., Sacchi, A., Bordoni, V., Gioia, C., Casetti, R., Turchi, F., Tripodi, M., & Martini, F. (2009). Activated V gamma 9V delta 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1), 522–529.
6. Agrati, C., D'Offizi, G., Narciso, P., Abrignani, S., Ippolito, G., Colizzi, V., & Poccia, F. (2001). Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 7(1), 11–19.
7. Albu S. Chronic Rhinosinusitis-An Update on Epidemiology, Pathogenesis and Management. *J Clin Med.* 2020;9(7):2285.
8. Sedaghat A. R. (2017). Chronic Rhinosinusitis. *American family physician*, 96(8), 500–506.
9. Ba, L., Zhang, N., Meng, J., Zhang, J., Lin, P., Zhou, P., Liu, S., & Bachert, C. (2011). The association between bacterial colonization and inflammatory pattern in Chinese chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps. *Allergy*, 66(10), 1296–1303.
10. Baba S, Kagoya R, Kondo K, Suzukawa M, Ohta K, Yamasoba T. T-cell phenotypes in chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Japanese patients. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2015;11:33.
11. Bachert, C., Gevaert, P., Holtappels, G., Johansson, S. G., & van Cauwenberge, P. (2001). Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 107(4), 607–614.
12. Bachert, C., Han, J. K., Desrosiers, M., Hellings, P. W., Amin, N., Lee, S. E., Mullol, J., Greos, L. S., Bosso, J. V., Laidlaw, T. M., Cervin, A. U., Maspero, J. F., Hopkins, C., Olze, H., Canonica, G. W., Paggiaro, P., Cho, S. H., Fokkens, W. J., Fujieda, S., Zhang, M., ... Mannent, L. P. (2019). Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet (London, England)*, 394(10209), 1638–1650.
13. Bachert, C., Zhang, N., Cavaliere, C., Weiping, W., Gevaert, E., & Krysko, O. (2020). Biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 145(3), 725–739.
14. Bank, I., & Marcu-Malina, V. (2014). Quantitative peripheral blood perturbations of $\gamma\delta$ T cells in human disease and their clinical implications. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 47(3), 311–333.

15. Bankova, L. G., & Barrett, N. A. (2020). Epithelial cell function and remodeling in nasal polyposis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 124(4), 333–341.
16. Bassis, C. M., Tang, A. L., Young, V. B., & Pynnonen, M. A. (2014). The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*, 2, 27.
17. Benninger, M. S., Ferguson, B. J., Hadley, J. A., Hamilos, D. L., Jacobs, M., Kennedy, D. W., Lanza, D. C., Marple, B. F., Osguthorpe, J. D., Stankiewicz, J. A., Anon, J., Denny, J., Emanuel, I., & Levine, H. (2003). Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 129(3 Suppl), S1–S32.
18. Born, W. K., Huang, Y., Jin, N., Huang, H., & O'Brien, R. L. (2010). Balanced approach of gammadelta T cells to type 2 immunity. *Immunology and cell biology*, 88(3), 269–274.
19. Breiteneder, H., Peng, Y. Q., Agache, I., Diamant, Z., Eiwegger, T., Fokkens, W. J., Traidl-Hoffmann, C., Nadeau, K., O'Hehir, R. E., O'Mahony, L., Pfaar, O., Torres, M. J., Wang, D. Y., Zhang, L., & Akdis, C. A. (2020). Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma. *Allergy*, 75(12), 3039–3068.
20. Caccamo, N., Dieli, F., Wesch, D., Jomaa, H., & Eberl, M. (2006). Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *Journal of leukocyte biology*, 79(4), 663–666.
21. Cairo, C., Arabito, E., Landi, F., Casati, A., Brunetti, E., Mancino, G., & Galli, E. (2005). Analysis of circulating gammadelta T cells in children affected by IgE-associated and non-IgE-associated allergic atopic eczema/dermatitis syndrome. *Clinical and experimental immunology*, 141(1), 116–121.
22. Chang, C. H., Chai, C. Y., Ho, K. Y., Kuo, W. R., Tai, C. F., Lin, C. S., Tsai, S. M., Wu, S. C., & Juan, K. H. (2001). Expression of transforming growth factor-beta 1 and alpha-smooth muscle actin of myofibroblast in the pathogenesis of nasal polyps. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 17(3), 133–138.
23. Sun, C., Ouyang, H., & Luo, R. (2017). Distinct characteristics of nasal polyps with and without eosinophilia. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 83(1), 66–72.
24. Chong, V. F., Fan, Y. F., Lau, D., & Sethi, D. S. (1998). Functional endoscopic sinus surgery (FESS): what radiologists need to know. *Clinical radiology*, 53(9), 650–658.
25. Danisman, Z., Linxweiler, M., Kühn, J. P., Linxweiler, B., Solomayer, E. F., Wagner, M., Wagenpfeil, G., Schick, B., & Berndt, S. (2023). Differential nasal swab cytology represents a valuable tool for therapy monitoring but not prediction of therapy response in chronic rhinosinusitis with nasal polyps treated with Dupilumab. *Frontiers in immunology*, 14, 1127576.
26. del Toro E, Portela J. (2023). *Nasal Polyps* . StatPearls Publishing. Pristupljeno: 01.10.2023.
27. Dietz de Loos, D., Lourijsen, E. S., Wildeman, M. A. M., Freling, N. J. M., Wolvers, M. D. J., Reitsma, S., & Fokkens, W. J. (2019). Prevalence of chronic rhinosinusitis in the general population based on sinus radiology and symptomatology. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 143(3), 1207–1214.
28. Du, K., Wang, M., Zhang, N., Yu, P., Wang, P., Li, Y., Wang, X., Zhang, L., & Bachert, C. (2021). Involvement of the extracellular matrix proteins periostin and tenascin C in nasal polyp remodeling by regulating the expression of MMPs. *Clinical and translational allergy*, 11(7), e12059.

29. Eberhardt, J. A., Torabinejad, M., & Christiansen, E. L. (1992). A computed tomographic study of the distances between the maxillary sinus floor and the apices of the maxillary posterior teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 73(3), 345–346.
30. Falk MC, NG G, Zhang GY, Fanning GC, Kamath KR, Knight JF. Predominance of T cell receptor V delta 3 in small bowel biopsies from coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol*. 1994;98(1):78-82.
31. Fay, N. S., Larson, E. C., & Jameson, J. M. (2016). Chronic Inflammation and $\gamma\delta$ T Cells. *Frontiers in immunology*, 7, 210.
32. Feazel, L. M., Robertson, C. E., Ramakrishnan, V. R., & Frank, D. N. (2012). Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 122(2), 467–472.
33. Fleming, C., Morrissey, S., Cai, Y., & Yan, J. (2017). $\gamma\delta$ T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression. *Trends in cancer*, 3(8), 561–570.
34. Fokkens, W. J., Lund, V. J., Hopkins, C., Hellings, P. W., Kern, R., Reitsma, S., Toppila-Salmi, S., Bernal-Sprekelsen, M., Mullol, J., Alobid, I., Terezinha Anselmo-Lima, W., Bachert, C., Baroody, F., von Buchwald, C., Cervin, A., Cohen, N., Constantinidis, J., De Gabory, L., Desrosiers, M., Diamant, Z., ... Zwetsloot, C. P. (2020). European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*, 58(Suppl S29), 1–464.
35. Freeman, S. C., Karp, D. A., & Kahwaji, C. I. (2023). Physiology, Nasal. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Pristupljeno: 01.10.2023.
36. Fujieda, S., Imoto, Y., Kato, Y., Ninomiya, T., Tokunaga, T., Tsutsumiuchi, T., Yoshida, K., Kidoguchi, M., & Takabayashi, T. (2019). Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 68(4), 403–412.
37. Fundová, P., Funda, D. P., Kovář, D., Holý, R., Navara, M., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2013). Increased expression of chemokine receptors CCR1 and CCR3 in nasal polyps: molecular basis for recruitment of the granulocyte infiltrate. *Folia microbiologica*, 58(3), 219–224.
38. Gevaert, P., Han, J. K., Smith, S. G., Sousa, A. R., Howarth, P. H., Yancey, S. W., Chan, R., & Bachert, C. (2022). The roles of eosinophils and interleukin-5 in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *International forum of allergy & rhinology*, 12(11), 1413–1423.
39. Gorski, S. A., Hahn, Y. S., & Braciale, T. J. (2013). Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003615.
40. Gu, Y., Tang, S., Wang, Z., Cai, L., Lian, H., Shen, Y., & Zhou, Y. (2021). A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*, 12(1), 6166–6185.
41. Hahn, Y. S., Taube, C., Jin, N., Sharp, L., Wands, J. M., Aydintug, M. K., Lahn, M., Huber, S. A., O'Brien, R. L., Gelfand, E. W., & Born, W. K. (2004). Different potentials of gamma delta T cell subsets in regulating airway responsiveness: V gamma 1+ cells, but not V gamma 4+ cells, promote airway hyperreactivity, Th2 cytokines, and airway inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), 2894–2902.
42. Havel, M., Kornes, T., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., & Sundberg, J. (2016). Eliminating paranasal sinus resonance and its effects on acoustic properties of the nasal tract. *Logopedics, phoniatrics, vocology*, 41(1), 33–40.

43. Hellings, P. W., & Steelant, B. (2020). Epithelial barriers in allergy and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 145(6), 1499–1509.
44. Heritage, P. L., Underdown, B. J., Arsenault, A. L., Snider, D. P., & McDermott, M. R. (1997). Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(4 Pt 1), 1256–1262.
45. Himi, T., Takano, K., Ogasawara, N., Go, M., Kurose, M., Koizumi, J., Kamekura, R., Kondo, A., Ohkuni, T., Masaki, T., Kojima, T., Sawada, N., & Tsutsumi, H. (2011). Mucosal immune barrier and antigen-presenting system in human nasal epithelial cells. *Advances in otolaryngology*, 72, 28–30.
46. Hirata, N., Takeuchi, K., Majima, Y., & Sakakura, Y. (2000). The Vdelta1 T cell receptor repertoire in human nasal mucosa. *Scandinavian journal of immunology*, 52(4), 380–384.
47. Hopkins, C., Browne, J. P., Slack, R., Lund, V., & Brown, P. (2007). The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict?. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 137(4), 555–561.
48. Hsu, U. H., & Chiang, B. L. (2023). $\gamma\delta$ T Cells and Allergic Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 65(2), 172–182.
49. Iinuma, T., Okamoto, Y., Yamamoto, H., Inamine-Sasaki, A., Ohki, Y., Sakurai, T., Funakoshi, U., Yonekura, S., Sakurai, D., Hirahara, K., & Nakayama, T. (2015). Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 114(4), 289–298.
50. Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133.
51. Kabelitz, D., Marischen, L., Oberg, H. H., Holtmeier, W., & Wesch, D. (2005). Epithelial defence by gamma delta T cells. *International archives of allergy and immunology*, 137(1), 73–81.
52. Kang, I., Kim, Y. & Lee, H.K. (2023). Double-edged sword: $\gamma\delta$ T cells in mucosal homeostasis and disease. *Exp Mol Med* 55, 1895–1904.
53. Kang, N., Tang, L., Li, X., Wu, D., Li, W., Chen, X., Cui, L., Ba, D., & He, W. (2009). Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunology letters*, 125(2), 105–113.
54. Katainen, E., Kostamo, K., Virkkula, P., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Haapaniemi, A., & Toskala, E. (2015). Local and systemic proteolytic responses in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis and asthma. *International forum of allergy & rhinology*, 5(4), 294–302.
55. Kilic, H., Karalezli, A., Hasanoglu, H. C., Erel, O., & Ates, C. (2012). The relationship between hs-CRP and asthma control test in asthmatic patients. *Allergologia et immunopathologia*, 40(6), 362–367.
56. Kokubo, K., Onodera, A., Kiuchi, M., Tsuji, K., Hirahara, K., & Nakayama, T. (2022). Conventional and pathogenic Th2 cells in inflammation, tissue repair, and fibrosis. *Frontiers in immunology*, 13, 945063.

57. Kucuksezer, U. C., Ozdemir, C., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2018). Chronic rhinosinusitis: pathogenesis, therapy options, and more. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 19(16), 1805–1815.
58. Laidlaw, T. M., Mullol, J., Woessner, K. M., Amin, N., & Mannent, L. P. (2021). Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 9(3), 1133–1141.
59. Laidlaw, T. M., & Buchheit, K. M. (2020). Biologics in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 124(4), 326–332.
60. Lal, D., Keim, P., Delisle, J., Barker, B., Rank, M. A., Chia, N., Schupp, J. M., Gillece, J. D., & Cope, E. K. (2017). Mapping and comparing bacterial microbiota in the sinonasal cavity of healthy, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis subjects. *International forum of allergy & rhinology*, 7(6), 561–569.
61. Lal, D., Wright, B. L., Shim, K. P., Zarka, M. A., Lee, J. J., Chang, Y. H., Ochkur, S. I., Divekar, R., Doyle, A. D., Jacobsen, E. A., Kita, H., & Rank, M. A. (2019). Eosinophil peroxidase, GATA3, and T-bet as tissue biomarkers in chronic rhinosinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 143(6), 2284–2287.e6.
62. Lam K, Schleimer R, Kern RC. The Etiology and Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis: a Review of Current Hypotheses. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(7):41.
63. Lan, F., Zhang, N., Gevaert, E., Zhang, L., & Bachert, C. (2016). Viruses and bacteria in Th2-biased allergic airway disease. *Allergy*, 71(10), 1381–1392.
64. Lee, H., Ruane, D., Law, K., Ho, Y., Garg, A., Rahman, A., Esterházy, D., Cheong, C., Goljo, E., Sikora, A. G., Mucida, D., Chen, B. K., Govindraj, S., Breton, G., & Mehandru, S. (2015). Phenotype and function of nasal dendritic cells. *Mucosal immunology*, 8(5), 1083–1098.
65. Lee, W., Chang, L., Huang, Z., Huang, J., Yang, L., Wang, Z., & Zhang, G. (2017). A Retrospective Analysis of $\gamma\delta$ T Cell Expression in Chronic Rhinosinusitis and Its Association with Recurrence of Nasal Polyps. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*, 79(5), 251–263.
66. Li, X. H., Lu, M. Y., Li, Y. J., Liu, Z. H., Yin, Z. N., Liu, B., & Wu, Y. Z. (2021). Circulating PD1+V δ 1+ $\gamma\delta$ T Cell Predicts Fertility in Endometrial Polyp Patients of Reproductive-Age. *Frontiers in immunology*, 12, 639221.
67. Li, X., Wang, Z., Chang, L., Chen, X., Yang, L., Lai, X., Li, S., Huang, J., Huang, Z., Wu, X., Bellanti, J. A., Zheng, S. G., & Zhang, G. (2019). $\gamma\delta$ T cells contribute to type 2 inflammatory profiles in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clinical science (London, England : 1979)*, 133(22), 2301–2315.
68. Li, Z., Yang, L., Wang, J., Shi, W., Pawar, R. A., Liu, Y., Xu, C., Cong, W., Hu, Q., Lu, T., Xia, F., Guo, W., Zhao, M., & Zhang, Y. (2010). beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish & shellfish immunology*, 29(1), 89–93.
69. Liu, M., Liu, J., Weitzel, E. K., & Chen, P. G. (2022). The predictive utility of the 22-item sinonasal outcome test (SNOT-22): A scoping review. *International forum of allergy & rhinology*, 12(1), 83–102.

70. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408.
71. Malm L. (1997). Assessment and staging of nasal polyposis. *Acta oto-laryngologica*, 117(4), 465–467.
72. Maniscalco, M., Calabrese, C., D'Amato, M., Guida, P., Molino, A., Aliani, M., De Tullio, R., Foschino Barbaro, M., Ricciardolo, F. L. M., & Carpagnano, G. E. (2019). Association between exhaled nitric oxide and nasal polyposis in severe asthma. *Respiratory medicine*, 152, 20–24.
73. Melandri, D., Zlatareva, I., Chaleil, R. A. G., Dart, R. J., Chancellor, A., Nussbaumer, O., Polyakova, O., Roberts, N. A., Wesch, D., Kabelitz, D., Irving, P. M., John, S., Mansour, S., Bates, P. A., Vantourout, P., & Hayday, A. C. (2018). The $\gamma\delta$ TCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. *Nature immunology*, 19(12), 1352–1365.
74. Meltzer, E. O., Hamilos, D. L., Hadley, J. A., Lanza, D. C., Marple, B. F., Nicklas, R. A., Bachert, C., Baraniuk, J., Baroody, F. M., Benninger, M. S., Brook, I., Chowdhury, B. A., Druce, H. M., Durham, S., Ferguson, B., Gwaltney, J. M., Kaliner, M., Kennedy, D. W., Lund, V., Naclerio, R., ... American Rhinologic Society (ARS) (2004). Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 114(6 Suppl), 155–212.
75. Mihalj, H., Butković, J., Tokić, S., Štefanić, M., Kizivat, T., Bujak, M., Baus Lončar, M., & Mihalj, M. (2022). Expression of Oxidative Stress and Inflammation-Related Genes in Nasal Mucosa and Nasal Polyps from Patients with Chronic Rhinosinusitis. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5521.
76. Moore KL, D. A. (2017). *Clinically Oriented Anatomy* .Pristupljeno: 01.10.2023.
77. Morita, C. T., Jin, C., Sarikonda, G., & Wang, H. (2007). Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunological reviews*, 215, 59–76.
78. Mozzanica, F., Preti, A., Gera, R., Gallo, S., Bulgheroni, C., Bandi, F., Ottaviani, F., & Castelnuovo, P. (2017). Cross-cultural adaptation and validation of the SNOT-22 into Italian. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 274(2), 887–895.
79. Mullol, J., Azar, A., Buchheit, K. M., Hopkins, C., & Bernstein, J. A. (2022). Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: Quality of Life in the Biologics Era. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 10(6), 1434–1453.e9.
80. Mutoh, M., Kimura, S., Takahashi-Iwanaga, H., Hisamoto, M., Iwanaga, T., & Iida, J. (2016). RANKL regulates differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell and tissue research*, 364(1), 175–184.
81. Nakayama, T., Okada, N., Yoshikawa, M., Asaka, D., Kuboki, A., Kojima, H., Tanaka, Y., & Haruna, S. I. (2018). Assessment of suitable reference genes for RT-qPCR studies in chronic rhinosinusitis. *Scientific reports*, 8(1), 1568.
82. Newton, J. R., & Ah-See, K. W. (2008). A review of nasal polyposis. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(2), 507–512.

83. Nielsen, M. M., Witherden, D. A., & Havran, W. L. (2017). $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nature reviews. Immunology*, 17(12), 733–745.
84. Norton NS, N. F. (2017). *Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry*. Pristupljeno: 05.10.2023.
85. Nurkic, J., Ahmad, M. A., Arifhodzic, N., & Jusufovic, E. (2016). THE ROLE OF TARGET ORGAN DIAGNOSTIC APPROACH IN SEASONAL ALLERGIC RHINITIS: NASAL SMEAR EOSINOPHILS. *Materia socio-medica*, 28(2), 125–128.
86. Okushi, T., Nakayama, T., Morimoto, S., Arai, C., Omura, K., Asaka, D., Matsuwaki, Y., Yoshikawa, M., Moriyama, H., & Otori, N. (2013). A modified Lund-Mackay system for radiological evaluation of chronic rhinosinusitis. *Auris, nasus, larynx*, 40(6), 548–553.
87. Orlandi, R. R., Kingdom, T. T., Hwang, P. H., Smith, T. L., Alt, J. A., Baroody, F. M., Batra, P. S., Bernal-Sprekelsen, M., Bhattacharyya, N., Chandra, R. K., Chiu, A., Citardi, M. J., Cohen, N. A., DelGaudio, J., Desrosiers, M., Dhong, H. J., Douglas, R., Ferguson, B., Fokkens, W. J., Georgalas, C., ... Kennedy, D. W. (2016). International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *International forum of allergy & rhinology*, 6 Suppl 1, S22–S209.
88. Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., & Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*, 9(5), 745–755.
89. Paik, Y., Dahl, M., Fang, D., & Calhoun, K. (2008). Update: the role of FoxP3 in allergic disease. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16(3), 275–279.
90. Pawankar, R., & Nonaka, M. (2007). Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Current allergy and asthma reports*, 7(3), 202–208.
91. Pawankar, R. U., Okuda, M., Suzuki, K., Okumura, K., & Ra, C. (1996). Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal gamma delta T cells in allergic and infectious rhinitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153(5), 1655–1665.
92. Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
93. Pinto J. M. (2011). Olfaction. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(1), 46–52.
94. Plužarić, V., Štefanić, M., Mihalj, M., Tolušić Levak, M., Muršić, I., Glavaš-Obrovac, L., Petrek, M., Balogh, P., & Tokić, S. (2020). Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris. *Frontiers in immunology*, 11, 572924.
95. Protocols, Thermo Fisher Scientific - US. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/protocols.html>. Pristupljeno: 04.12.2023.
96. Racette, S. D., Schneider, A. L., Ganesh, M., Huang, J. H., Lehmann, D. S., Price, C. P. E., Rodegherio, S. G., Reddy, A. T., Eide, J. G., Conley, D. B., Welch, K. C., Kern, R. C., Shintani-Smith, S., Kato, A., Schleimer, R. P., & Tan, B. K. (2022). CRS-PRO and SNOT-22 correlations with type 2 inflammatory mediators in chronic rhinosinusitis. *International forum of allergy & rhinology*, 12(11), 1377–1386.
97. Ramakrishnan, V. R., Feazel, L. M., Gitomer, S. A., Ir, D., Robertson, C. E., & Frank, D. N. (2013). The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PloS one*, 8(12), e85507.
98. Richter, A., Puddicombe, S. M., Lordan, J. L., Bucchieri, F., Wilson, S. J., Djukanovic, R., Dent, G., Holgate, S. T., & Davies, D. E. (2001). The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to

- the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25(3), 385–391.
99. Ryu G, Kim DW. Th2 inflammatory responses in the development of nasal polyps and chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020 Feb;20(1):1-8.
 100. Roan, F., Obata-Ninomiya, K., & Ziegler, S. F. (2019). Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm. *The Journal of clinical investigation*, 129(4), 1441–1451.
 101. Rotter N. Evidence and evidence gaps in therapies of nasal obstruction and rhinosinusitis. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2016;15
 102. Rutishauser, T., Lepore, M., Di Blasi, D., Dangy, J. P., Abdulla, S., Jongo, S., Ramadhani, K., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Tanner, M., Daubenberg, C., & De Libero, G. (2020). Activation of TCR V δ 1+ and V δ 1-V δ 2- $\gamma\delta$ T Cells upon Controlled Infection with *Plasmodium falciparum* in Tanzanian Volunteers. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 204(1), 180–191.
 103. Rutledge RG, Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*. 2003 Aug 15;31(16):e93.
 104. Satyanarayana K, Hata S, Devlin P, et al. Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor alpha/delta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(21):8166-8170.
 105. Savage, A. K., Constantinides, M. G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., & Bendelac, A. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*, 29(3), 391–403.
 106. Schalek, P., Hart, L., Fuksa, J., & Guha, A. (2022). Quality of life in CRSwNP: evaluation of ACCESS and Lund-Mackay computed tomography scores versus the QoL questionnaire. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 279(12), 5721–5725.
 107. Schleimer R. P. (2017). Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Annual review of pathology*, 12, 331–357.
 108. Seki, N., Miyazaki, M., Suzuki, W., Hayashi, K., Arima, K., Myburgh, E., Izuhara, K., Brombacher, F., & Kubo, M. (2004). IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 172(10), 6158–6166.
 109. Settupane G. A. (1996). Nasal polyps and immunoglobulin E (IgE). *Allergy and asthma proceedings*, 17(5), 269–273.
 110. Sharma, A., Berga-Bolanos, R., Sultana, D. A., & Sen, J. M. (2013). IL-4 and IL-4 receptor expression is dispensable for the development and function of natural killer T cells. *PloS one*, 8(8), e71872.
 111. Shkorbotun Y. (2020). EVALUATION OF THE UKRAINIAN VERSION OF SNOT-22 QUESTIONNAIRE VALIDITY FOR ASSESSING THE QUALITY OF LIFE IN PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS AND NASAL SEPTUM DEVIATION. *Georgian medical news*, (308), 43–47.
 112. Sitkauskiene, B., Johansson, A. K., Sergejeva, S., Lundin, S., Sjöstrand, M., & Lötvall, J. (2004). Regulation of bone marrow and airway CD34+ eosinophils by interleukin-5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(3), 367–378.

113. Sogut, A., Yilmaz, O., Kirmaz, C., Ozbilgin, K., Onur, E., Celik, O., Pinar, E., Vatansever, S., Dinc, G., & Yuksel, H. (2012). Regulatory-T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity. *International archives of allergy and immunology*, 157(4), 349–353.
114. Soklic, T. K., Rijavec, M., Silar, M., Koren, A., Kern, I., Hocevar-Boltezar, I., & Korosec, P. (2019). Transcription factors gene expression in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Radiology and oncology*, 53(3), 323–330.
115. Soler, Z. M., Jones, R., Le, P., Rudmik, L., Mattos, J. L., Nguyen, S. A., & Schlosser, R. J. (2018). Sino-Nasal outcome test-22 outcomes after sinus surgery: A systematic review and meta-analysis. *The Laryngoscope*, 128(3), 581–592.
116. Steelant, B., Seys, S. F., Van Gerven, L., Van Woensel, M., Farré, R., Wawrzyniak, P., Kortekaas Krohn, I., Bullens, D. M., Talavera, K., Raap, U., Boon, L., Akdis, C. A., Boeckxstaens, G., Ceuppens, J. L., & Hellings, P. W. (2018). Histamine and T helper cytokine-driven epithelial barrier dysfunction in allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141(3), 951–963.e8.
117. Steinke, J. W., Crouse, C. D., Bradley, D., Hise, K., Lynch, K., Kountakis, S. E., & Borish, L. (2004). Characterization of interleukin-4-stimulated nasal polyp fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(2), 212–219.
118. Wynn T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annual review of immunology*, 21, 425–456.
119. Takabayashi T, Schleimer RP. Formation of nasal polyps: The roles of innate type 2 inflammation and deposition of fibrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(3):740-750.
120. Tantilipikorn P, Sookrung N, Muangsomboon S, Lumyongsatien J, Bedavanija A, Suwanwech T. Endotyping of Chronic Rhinosinusitis With and Without Polyp Using Transcription Factor Analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:82.
121. Tsurumoto, H., Takamura, H., Takasaki, K., Yoshimi, R., & Kobayashi, T. (1997). *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho*, 100(5), 512–517.
122. Usha, G., Pal, I., Kumar, S., Mondal, B., & Basu, G. (2022). Assessment of Nasal Smear Eosinophil Counts in Allergic Rhinitis: How Useful is it?. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India*, 74(4), 540–546.
123. Van Bruaene, N., Derycke, L., Perez-Novo, C. A., Gevaert, P., Holtappels, G., De Ruyck, N., Cuvelier, C., Van Cauwenberge, P., & Bachert, C. (2009). TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 124(2), 253–259.e2592.
124. Van Bruaene, N., Pérez-Novo, C. A., Basinski, T. M., Van Zele, T., Holtappels, G., De Ruyck, N., Schmidt-Weber, C., Akdis, C., Van Cauwenberge, P., Bachert, C., & Gevaert, P. (2008). T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 121(6), 1435–1441.e14413.
125. Vanderhaegen, T., Gengler, I., Dendooven, A., Chenivresse, C., Lefèvre, G., & Mortuaire, G. (2022). Eosinophils in the Field of Nasal Polyposis: Towards a Better Understanding of Biologic Therapies. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 62(1), 90–102.
126. Verhoef, P. A., Constantinides, M. G., McDonald, B. D., Urban, J. F., Jr, Sperling, A. I., & Bendelac, A. (2016). Intrinsic functional defects of type 2 innate lymphoid cells impair innate

- allergic inflammation in promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF)-deficient mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(2), 591–600.
127. Wang, M., Tang, S., Yang, X., Xie, X., Luo, Y., He, S., Li, X., & Feng, X. (2022). Identification of key genes and pathways in chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma comorbidity using bioinformatics approaches. *Frontiers in immunology*, 13, 941547.
 128. Wang X, Xu C, Ji J, Cai Y, Shu Y, Chao Y, Wu X, Zou C, Wu X, Tang L. IL-4/IL-13 upregulates Sonic hedgehog expression to induce allergic airway epithelial remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020 May 1;318(5):L888-L899.
 129. Wei, P., Hu, G. H., Kang, H. Y., Yao, H. B., Kou, W., Zhang, C., & Hong, S. L. (2014). Role of the aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Inflammation*, 37(2), 387–395.
 130. Whyte A, Boeddinghaus R. The maxillary sinus: physiology, development and imaging anatomy [published correction appears in *Dentomaxillofac Radiol*. 2019 Sep 10;:20190205c]. *Dentomaxillofac Radiol*. 2019;48(8):20190205.
 131. Wrobel, P., Shojaei, H., Schittek, B., Gieseler, F., Wollenberg, B., Kalthoff, H., Kabelitz, D., & Wesch, D. (2007). Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 320–328.
 132. Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., Chen, Z., Wang, K., Zhang, T., Xu, J., Han, Y., Zhang, T., Wu, X., Wang, J., Gong, W., Zheng, S., ... Huang, J. (2014). $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, 40(5), 785–800.
 133. Yang, Y., Li, L., Yuan, L., Zhou, X., Duan, J., Xiao, H., Cai, N., Han, S., Ma, X., Liu, W., Chen, C. C., Wang, L., Li, X., Chen, J., Kang, N., Chen, J., Shen, Z., Malwal, S. R., Liu, W., Shi, Y., ... Zhang, Y. (2019). A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated $V\gamma 9V\delta 2$ T Cell Activation. *Immunity*, 50(4), 1043–1053.e5.
 134. Zarobkiewicz, M. K., Wawryk-Gawda, E., Kowalska, W., Janiszewska, M., & Bojarska-Junak, A. (2021). $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Asthma: a Complicated Picture. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 69(1), 4.
 135. Zhao, Y., Niu, C., & Cui, J. (2018). Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development?. *Journal of translational medicine*, 16(1), 3.
 136. Zheng, R., & Yang, Q. (2014). The role of the $\gamma\delta$ T cell in allergic diseases. *Journal of immunology research*, 2014, 963484.
 137. Zhou, Y., Mihindukulasuriya, K. A., Gao, H., La Rosa, P. S., Wylie, K. M., Martin, J. C., Kota, K., Shannon, W. D., Mitreva, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2014). Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome biology*, 15(5), R66.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Radi boljeg razumijevanja etiopatogeneze bolesti i utvrđivanja potencijalnih točaka za razvoj pametnih lijekova, koji su danas trend u liječenju brojnih imunološki posredovanih upalnih bolesti, a time i eozinofilnog kroničnog rinosinitisa s nosnom polipozom (eKRSsNP) istraživane su moguće stanične ($\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija (V δ 1 + V δ 2 - , V δ 1 - V δ 2 + , V δ 1 - V δ 2 -) i molekularne (mRNA V δ 1, V δ 2, V δ 3, IL-4, IL-13, GATA3) osnove eKRSsNP. Potencijalni stanični i molekularni elementi ove bolesti testirani su na tkivima nosnog polipa i srednje nosne školjke (SNŠ) oboljelih te uspoređivani s uzorkom SNŠ kontrola. Izražaji spomenutih gena i opisane stanične populacije uspoređivane su i s kliničkim pokazateljima težine bolesti. **Dizajn studije:** Opažajno istraživanje parova. **Materijali i metode:** U istraživanju je sudjelovalo 84 bolesnika, od čega 43 bolesnika s dijagnozom eozinofilnog kroničnog rinosinitisa s nosnom polipozom (eKRSsNP) i 41 kontrola. Svim bolesnicima učinjen je klinički pregled i potrebna radiološka obrada (bolesnicima s eKRSsNP CT PNŠ), laboratorijska obrada (alergijska obrada, hsCRP) bris nosa na eozinofile te su ispunili upitnik SNOT22. Uzorci polipa i SNŠ u bolesnika s eKRSsNP i SNŠ u kontrolnih ispitanika pripremljeni su za imunofenotipizaciju $\gamma\delta$ T-limfocita na protočnom citometru te za kvantitativnu analizu traksriptoma pomoću RT-PCR. **Rezultati:** Subpopulacija V δ 2+ (*Kruskal Wallis* ; $P = 0,01$) i V δ 1-V δ 2- (*Kruskal Wallis*; $P = 0,03$) $\gamma\delta$ T-limfocita bila je značajno više zastupljena u tkivu polipa oboljelih od eKRSsNP u odnosu na sinonazalnu sluznicu SNŠ obje skupine. Spearmanovim koeficijentom korelacije (*Rho*) zabilježena je značajna pozitivna povezanost ukupne količine $\gamma\delta$ T-limfocita ($P = 0,04$) i rezultata SNOT22, kao i ukupne količine $\gamma\delta$ T-limfocita ($P = 0,009$) s kliničkim pokazateljem težine bolesti Lund-Mackey. Genski izražaj IL-13 i IL-4 bio je značajno veći u tkivu polipa eKRSsNP u odnosu na SNŠ obje skupine (*Kruskal Wallis*; $P = 0,04$ i $P = 0,009$). U tkivu polipa ispitanika eKRSsNP porastom genskog izražaja IL-4 značajno raste frekvencija V δ 1-V δ 2-stanica (*Rho*; $P = 0,04$). Također, u tkivu SNŠ bolesnika s eKRSsNP porastom IL-13 (*Rho*; $P = 0,04$) i IL-4 (*Rho*; $P = 0,03$) značajno raste i pojavnost V δ 1-V δ 2- limfocita. **Zaključak:** V δ 1-V δ 2+ i V δ 1-V δ 2- subpopulacije $\gamma\delta$ T-limfocita snažno su zastupljene u tkivu polipa dok $\gamma\delta$ T-stanice pozitivno koreliraju s Lund-Mackey pokazateljima težine bolesti i rezultatima SNOT22 upitnika što ukazuje na važnu ulogu ovih stanica u upali Th2 i eKRSsNP. Pojačani genski izražaj IL-4 i IL-13 u tkivu polipa potvrđuje njihov važan doprinos Th2 upali u eKRSsNP. V δ 1-

V δ 2- odjeljak pozitivno korelira sa genskim izražajem IL-4 u tkivu polipa, no spomenute mononuklearne stanice tek treba detaljnije istražiti da bi se definirala njihova uloga.

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

9. SUMMARY

Goals of the study: In order to better understand the etiopathogenesis of the disease and to determine potential points for the development of smart drugs, which are currently in the trend to treat numerous immune-mediated inflammatory diseases, and thus eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (eCRSwNP), possible cellular ($\gamma\delta$ T lymphocytes and their subpopulations ($V\delta 1 + V\delta 2^-$, $V\delta 1 - V\delta 2^+$, $V\delta 1 - V\delta 2^-$)) and molecular (mRNA $V\delta 1$, $V\delta 2$, $V\delta 3$, IL-4, IL-13, GATA3) basis of eCRSwNP. Potential cellular and molecular elements of this disease were tested on nasal tissues polyps and the middle nasal turbinate (MNT) of patients and compared with the sample of the MNT of the controls. The expressions of the mentioned genes and the described cell population were also compared with the clinical indicators of the severity of the disease. **Study design:** Observational study of couples. **Materials and methods:** 84 patients participated in the study, of which 43 subjects were diagnosed with eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (eCRSwNP) and 41 were controls. All subjects underwent a clinical examination and CT scan of paranasal sinuses (for CRSwNP group), laboratory treatment (allergy tests, hsCRP), nasal swab for eosinophils and filled out the SNOT22 questionnaire. Samples of polyps and MNT in patients with eCRSwNP and MNT in control subjects were prepared for immunophenotyping of $\gamma\delta$ T-lymphocytes on a flow cytometer and for quantitative analysis of the transcriptome using RT-PCR. **Results:** $V\delta 1-V\delta 2^+$ (*Kruskal Wallis*; $P = 0,01$) and $V\delta 1-V\delta 2^-$ (*Kruskal Wallis*; $P = 0,03$) subpopulations were significantly more prevalent in the polyp tissue in the group of subjects with eCRSwNP compared to MNT of both groups. Spearman's correlation coefficient (*Rho*) showed a positive relationship between the rate of total $\gamma\delta$ T-lymphocytes ($P = 0,04$) and the SNOT22 result, as well as between the rate of total $\gamma\delta$ T-lymphocytes ($P = 0,009$) and Lund-Mackey score. The expressions levels of IL-13 and IL-4 genes were significantly higher in eCRSwNP polyp tissue compared to MNT of both groups (*Kruskal Wallis*; $P = 0,04$ and $P = 0,009$). In the polyp tissue of eCRSwNP subjects, the increase in IL-4 expression was accompanied with significant increase of $V\delta 1-V\delta 2^-$ (*Rho*; $P = 0,04$). In the MNT tissue of patients with eCRSwNP, the increase in IL-13 (*Rho*; $P = 0,04$) and IL-4 (*Rho*; $P = 0,03$) gene expression correlated with the increase of $V\delta 1-V\delta 2^-$ rates among mononuclear cells. **Conclusion:** $V\delta 1-V\delta 2^+$ and $V\delta 1-V\delta 2^-$ subpopulation of $\gamma\delta$ T-lymphocytes are strongly represented in polyp tissue, and the total $\gamma\delta$ T cells correlate with the Lund-Mackey and SNOT22 questionnaire, suggesting important role of these cells in Th2 inflammation and the pathogenesis of the disease. Increased expression of IL-

4 and IL-13 in polyp tissue confirms their contribution in Th2 inflammation in eKRSsNP. V δ 1-V δ 2- T cells positively correlate with the expression of IL-4 in polyp tissue; however, their precise V δ phenotype and active role in the pathogenesis of the disease remains elusive.

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

10. ŽIVOTOPIS

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

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

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

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

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

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

Tijekom specijalizacije pohađa brojne domaće i međunarodne tečajeve:

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

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

head dissection, Zagreb, 2020.

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

Kao aktivni sudionik sudjelovao je na sljedećim kongresima:

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

Popis objavljenih publikacija:

1. Zubčić, Ž. Mendeš, T. Včeva, A. Mihalj, H. Bogović, V. Milanković, SG. Presence of pepsin in laryngeal tissue and saliva in benign and malignant neoplasms. Biosci Rep. 2020 Nov 27;40(11).
2. Bogović, V. Milanković, SG. Zubčić, Ž. Včeva, A. Mihalj, M. Maleš, J. Kotromanović, Ž. Grebenar, M. Mendeš, T. Mihalj, H. Open Approach in Rhinoplasty. Southeastern European Medical Journal. 2019; 3(2); 56-62.
3. Mihalj, H. Včeva, A. Zubčić, Ž. Šestak, A. Bogović, V. Milanković, SG. Prpić, T. Abičić, I. Rezo, M. The effectiveness of diode laser in reduction of inferior turbinate. Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. [Internet]. 2020 [pristupljeno 10.12.2020.];(543=50-51):17-24. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/244558>.
4. Mihalj, H. Zubčić, Ž. Včeva, A. Kotromanović, Ž. Rotim, T. Zrno, N. Šestak, A. Bogović, V. Milanković, SG. Prpić, T. Abičić, I. Rezo, M. Duboke infekcije vrata. Medica Jadertina. 2020;50 (3):219-225.

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

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

Prilozi:

1. SNOT 22 UPITNIK

SNOT 22 upitnik

SNOT 22 upitnik

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

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

Ime i prezime: _____

Datum: _____