

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vjeran Bogović

**UTJECAJ MIKROBNE FLORE NA FENOTIP I
FUNKCIONALNI STATUS GAMA DELTA ($\gamma\delta$) T LIMFOCITA
U SINONAZALNOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD
KRONIČNOG RINOSINUITISA S NOSNOM POLIPOZOM**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vjeran Bogović

**UTJECAJ MIKROBNE FLORE NA FENOTIP I
FUNKCIONALNI STATUS GAMA DELTA ($\gamma\delta$) T LIMFOCITA
U SINONAZALNOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD
KRONIČNOG RINOSINUITISA S NOSNOM POLIPOZOM**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Mihalj, dr. med.

Komentor rada: doc. dr. sc. Željko Zubčić, dr. med.

Rad ima 100 stranica.

PREDGOVOR:

PROJEKTI:

Istraživanje je dio znanstvenog projekta IP14 2022. sufinanciranog od strane Medicinskog fakulteta Osijek naslovljenog pod „Utjecaj mikrobioma na fenotip i funkcionalni status gama delta ($\gamma\delta$) T limfocita u sinonazalnoj sluznici oboljelih od kroničnog rinosinuitisa s nosnom polipozom“. Voditelj je projekta izv. prof. dr. sc. Hrvoje Mihalj, dr. med.

Zahvale:

Zahvaljujem svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Hrvoju Mihalju, dr. med. i komentoru doc. dr. sc. Željku Zubčiću, dr. med. na nesebičnoj podršci koju su mi pružali za vrijeme izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem i dragim kolegama i kolegicama s Klinke za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC-a Osijek koji su mi pomagali pri obradi i pripremanju pacijenata.

Posebno zahvaljujem kolegi dr. sc. Stjepanu Grgi Milankoviću, dr. med. na suradnji i pomoći tijekom cijelog znanstveno-istraživačkog procesa te dr. sc. Anamariji Šestak, dr. med. što je uvijek pomogla kad je to trebalo.

Veliko hvala prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. i izv. prof. Stani Tokić na stručnim savjetima i podršci.

Posebne zahvale zaposlenicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku i Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek te Laboratorija za analizu DNA, Medicinskog fakulteta Osijek, bez kojih bi istraživanje bilo nemoguće.

Zahvala cijeloj mojoj obitelji naročito mojim roditeljima što su me trpili i bili podrška od početka do kraja obrazovanja.

Zahvaljujem mojim curama Dunji i Teni što su tatu ponekad uspjele ostaviti na miru da „tipka nešto na računalu“ i posebna, najposebnija zahvala mojoj supruzi Matei jer bez njezine ljubavi i podrške sve bi bilo teže.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Embriologija nosa i sinusa	3
1.2. Anatomija dišnih puteva	4
1.2.1. Anatomija nosne šupljine	4
1.3. Fiziologija sluznice nosnog kavuma	6
1.3.1. Respiracija (disanje)	6
1.3.2. Olfaktorna funkcija	7
1.3.3. Protektivna funkcija	7
1.4. Kronični rinosinuitis	8
1.5. Dijagnostika i liječenje KRS+NP	10
1.6. Utjecaj mikrobiomne flore na KRS+NP	13
1.7. Th1 i TH3 tip upalnog odgovora i njihova uloga u KRS+NP	13
1.8. $\gamma\delta$ T limfociti u KRSsNP	16
1.9. Kvaliteta života bolesnika s KRS+NP	12
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	18
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
4. MATERIJALI I METODE.....	20
4.1. Uzorkovanje obrisaka sluznice sinusa i nosne šupljine za mikrobiološku analizu.....	21
4.2. Patohistološka analiza na prisutnost eozinofila u uzorcima sluznice srednje nosne školjke i nosnog polipa	21
4.3. Uzorkovanje tkiva sinonazalne sluznice i nosnog polipa	22
4.4. Izolacija i kriokonzervacija ukupnih tkivnih leukocita.....	23
4.5. Imunofenotipizacija $\gamma\delta$ T limfocita metodom protočne citometrije	24
4.5.1. Izrada kompenzacijske matrice	25
4.5.2. Isključivanje nevijabilnih stanica iz analize.....	25
4.5.3. Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela i imunofenotipizacija PBMC stanica	26
4.6. Izolacija ukupne RNA iz mononuklearnih stanica	26
4.7. Kvantitativna analiza transkriptoma mononuklearnih stanica	27
4.8. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)	27
4.9. Kvantitativna analiza transkriptoma mononuklearnih stanica izoliranih iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa primjenom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time qPCR).....	28
4.9.1. Analiza amplifikacijske krivulje	29

4.9.2. Kvantifikacija DNA: apsolutna i relativna metoda	30
4.9.3. Priprema standardnih krivulja	30
4.9.4. Postupak pripreme standardne krivulje	31
4.9.5. Analiza ekspresije mRNA	31
4.9.6. Postupak analize	32
4.9.7. Kvantifikacija genske ekspresije metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$	33
4.10. Statističke metode	34
5. REZULTATI	38
5.1. imunofenotipizacija mononuklearnih stanica izoliranih iz tkiva nosnih polipa i sluznice nosa	38
5.2. Sijelo, status i ostale kovarijate	44
5.3. PCR	54
5.4. Q...kvartila	56
5.5. Sijelo i status	60
5.6. Breme simptoma, kvaliteta života (SNOTs, JESREC, Nose score)	64
5.8. PCR i FACS	73
6. RASPRAVA	76
6.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta T stanica u tkivu polipa bolesnika s KRSsNP i u tkivu SNŠ bolesnika s KRS te kontrolnih ispitanika značajno se razlikuje	76
6.2. Povezanost kliničkih faktora i kvalitete života bolesnika sa subpopulacijom gamma delta T-limfocita	77
6.3. ZBTB16 ekspresija i povezanost s dobom, spolom i kliničkim parametrima	78
6.4. RORC ekspresija i povezanost s dobom, spolom i kliničkim parametrima	79
6.5. TRDV1 ekspresija i povezanost s dobom, spolom i kliničkim parametrima	79
6.6. Međugenska povezanost između ispitivanih gena	80
6.7. Povezanost staničnih frekvencija s intenzitetom izražaja odabranih gena	80
6.8. Ograničenje istraživanja	81
7. ZAKLJUČAK	82
8. SAŽETAK	83
9. SUMMARY	85
10. REFERENCE	87
11. ŽIVOTOPIS	96
12. PRILOZI	100

POPIS KRATICA

ARS – akutni rinosinitis

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

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

KRS+NP – kronični rinosinitis s nosnom polipozom

KRS-NP – kronični rinosinitis bez nosne polipoze

CT PNŠ – kompjutorizirana tomografija paranazalnih šupljina

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*

D1 - V δ 1+V δ 2- gamma delta stanice

D2 - V δ 1-V δ 2+ gamma delta stanice

DN - V δ 1⁻ V δ 2⁻ - dvostuko negativne gamma delta stanice

POPIS TABLICA

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

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

Tablica 3a. Program za qRT-PCR, Izvor: Thermofisher, 2023.

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

Tablica 4. Klinička i demografska obilježja ispitanika, protočna citometrija (medijan, [interkvartiln raspon]).

Tablica 5. Usporedba kliničkih i demografskih obilježja ispitanika po sijelu, protočna citometrija (medijan, [interkvartiln raspon]).

Tablica 6. Razdioba staničnih frekvencija (sluznica nosa, protočna citometrija) po sijelima i statusu (medijan, [interkvartiln raspon]).

Tablica 7. ICC2 (*intraclass*) koeficijenti, sličnost staničnih frekvencija u dva sijela, polip i sluznica SNŠ oboljelih (n=14)

Tablica 8. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole). Populacijski i distribucijski parametri (*a posteriori*). Refcat=D1, C

Tablica 9. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole), *a posteriori* kontrasti. Udjel D1,D2 i DN stanica u gdT populaciji

Tablica 10. Dirichletova regresija, Bayesov model, parametri s *a posteriori* kontrastima. Udjel DN, D1 i D2 gd stanica u T-stanicama i limfocitima (P+C)

Tablica 11. Dirichletova regresija, Bayesov model, *a posteriori* kontrasti. Udjel DN, D1 i D2 gd stanica u T-stanicama i limfocitima (P+C, SNŠ+C)

Tablica 12. Dirichletova regresija, Bayesov model (SNŠ i kontrole), *a posteriori* kontrasti. Udjel D1,D2 i DN stanica u gdT populaciji

Tablica 13. Klinička i demografska obilježja ispitanika, kvantifikacija genske ekspresije (medijan, [interkvartilni raspon])

Tablica 14. Razdioba genske ekspresije po sijelima i statusu, omjer izražaja (*fold change*)

- Tablica 15. Linearni mješoviti model, genski izražaj, suma kvadrata tipa III, Satterthwaitova metoda
- Tablica 16. Linearni mješoviti model, genski izražaj, raščlamba rezultata za Tablicu 3 ($\log_2$..logaritam omjera izražaja, INRT inverzna normalna transformacija rangova za omjer izražaja)
- Tablica 17. Linearni model (kontrole i polipi oboljelih), genski izražaj prema Lund-Mackay CT zbroju
- Tablica 18. Linearni model (kontrole i polipi oboljelih), genski izražaj prema endoskopskoj gradaciji/klasifikaciji (Malm)
- Tablica 19. Linearni mješoviti model, genski izražaj prema bremenu simpotoma (SNOT22 zbroj i JESREC)
- Tablica 20. Linearni mješoviti model, genski izražaj prema sijelu i bremenu simpotoma (SNOT22 zbroj i JESREC), suma kvadrata tipa III, Satterthwaitova metoda
- Tablica 21. Taksonomija izolata
- Tablica 22. Genski izražaj vs. mikrobiom, permutacijska analiza varijance (n=999, Jaccardov indeks)

POPIS SLIKA

Slika 1. Hipokratova metoda odstranjenja polipa iz nosa

Slika 2. Suvremena operacijska sala (Vlastiti izvor)

Slika 3. Shematski prikaz aktivacije tip I i tip III imunskog odgovora (Vlastiti izvor)

Slika 4. Endoskopska slika KRS+NP (vlastiti izvor)

Slika 5. Izolacija i kriokonzervacija ukupnih tkivnih leukocita (vlastiti izvor)

Slika 6. Izolacija ukupne RNA iz izoliranih mononuklearnih stanica

Slika 7. Krivulja amplifikacije isječaka DNA. Izvor: (Rutledge RG, 2003)

Slika 8. Amplifikacija ciljnih i referentnih gena (vlastiti izvor)

Slika 9. Ternarni dijagram, sastav sluzničkih gdT stanica prema uporabi TRDV1 i TRDV2 lanaca (protočna citometrija).

Slika 10. Ternarni dijagram, sastav sluzničkih gdT stanica, razdioba uporabe TRDV1 i TRDV2 lanaca prema sijelu (protočna citometrija)

Slika 11. Ternarni dijagram, sastav sluzničkih gdT stanica nosa, razdioba uporabe TRDV1 i TRDV2 lanaca

Slika 12. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole, T4).

Slika 13. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole). -h=Malm [3]. EoI eozinofili u obrisku nosa, pos/neg

Slika 14. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole, serumski IgE).

Slika 15. Dirichletova regresija, Bayesov model (SNŠ i kontrole).

Slika 16. Grafički prikaz genske ekspresije po sijelima,

Slika 17. Korelogram demografskih, kliničkih obilježja i genske ekspresije u sluzničkim mononuklearnim stanicama

Slika 18. Sekvenciranje jednostanične RNK, kronični rinosinuitis

Slika 19. Genska ekspresija, stanični ekosustav nosne sluznice (sekvenciranje jednostanične RNK, *Nasal Lifespan Atlas*, GSE162864, 29917 stanica, *UCSC Cell Browser*).

Slika 20. Marginalni efekti za sijelo, generalizirani linearni mješoviti model (GLMM) za izražaj odabranih genskih prijevsa u mononuklearima sluznice nosa

Slika 21. Marginalni efekti prema Lund-Mackay CT zbroju

Slika 22. Korelacija rangova, sluznički izražaj izabranih genskih prijevsa vs. dob

Slika 23. Korelacija rangova, zasebno po spolu, sluznički izražaj izabranih genskih prijevsa vs. dob, za skup neovisnih mjerenja (polipoidna sluznica oboljelih i kontrole).

Slika 24. Razdioba *TRDVI* izražaja prema Lund-Mackay CT

Slika 25. Korelogram, povezanost staničnih frekvencija s intenzitetom genskog izražaja u istih ispitanika (n=14).

Slika 26. Ljudske gdT stanice, GSE149356

Slika 27. Ljudske postnatalne gdT stanice periferne krvi, GSE180059

Slika 28. Ljudske gdTstanice fetalne krvi pupkovine, GSE180059

1. UVOD

Počet ću ovu disertaciju Renanovim riječima: „Pravi ljudi od nauke duboko poštuju prošlost. Sve što radimo i sve što jesmo rezultat je stoljetnog rada.” Medicinska znanost i vještina samo su malen dio stremljenja čovječanstva i pojedinaca prema savršenstvu, koji se ne može izdvojiti iz općih kulturnih, socijalnih, ekonomskih i političkih prilika u kojima se čovječanstvo razvijalo. Najjača sila pokretnica u razvitku čovječanstva i znanosti, jača od oružja, od svake vlasti i svakog nasilja snaga je ideje.

Povijest nosne polipoze stara je više od 5000 godina. U grobnici Sahure, egipatskog kralja, nalazi se slika kraljevskog liječnika Ni-Ankh Sekhmeta i njegove žene, uz kraljevsku zahvalu što mu je ozdravio nosnice, što govori da je nosna polipoza jedna od najstarijih opisanih bolesti.

Nauka o bolestima uha, nosa i grla, u pravom smislu te riječi, nije se mogla razviti dok nisu bili poznati elementarni podatci o anatomskej strukturi tih organa. Pravo istraživanje uha, nosa i grla počinje u XVI. stoljeću, a sve do toga vremena imali su i najučeniji liječnici nejasne, često i potpuno pogrešne nazore o funkciji i izgledu tih organa. Razlog tome leži u skrivenom i teško pristupačnom položaju i u sitnim razmjerima uha, nosa i grla, koji iziskuju specijalnu visoko razvijenu tehniku prepariranja, kakvu poznajemo tek u novije doba.

Tek je Hipokratova nauka značila osnutak medicine kao znanosti nezavisne od religije i od filozofije. Temelj njegove nauke bio je iskustvo i opažanje. Zbirka njegovih djela ne potiču samo od Hipokrata nego i od njegovih učenika i ne sadržavaju samo iskustvo Hipokratove škole nego obuhvaćaju zapravo sve do tada medicinsko znanje. Njegovo znanje, objektivnost i skromnost održavaju se u krasnoj i danas aktualnoj misli: „Život je kratak, umijeće je dugo, prilike su nestalne, iskustvo je varavo, a sud je težak.” Iz golemog mnoštva znanja sabranih u Hipokratovim djelima, želim istaknuti samo nekoliko stvari koje se odnose na našu struku. O uzrocima otežanog disanja na nos imao je relativno dobre predodžbe jer iz njegovih opisa možemo raspoznati nosne polipe, hipertrofiju školjki, tumore i rinolite. Upravo zadivljuje duhovitost kojom odstranjuje polipe iz nosa, postoje slike koje na shematski način prikazuju kako treba u nos uvesti spužvu i kako je treba kroz usta izvući da se ne povrijedi meko nepce.



Slika 1. Hipokratova metoda odstranjenja polipa iz nosa

Osnove liječenja nosnih polipa postavljene od strane Hipokrata održale su se do današnjih dana i danas liječenje nekada ne može proći bez kirurškog, mehaničkog odstranjivanja polipa samo uz nešto precizniji i sofisticiraniji instrumentarij. Iako se znanost i medicina razvijaju velikom brzinom, kao i količina znanja o biologiji, patogenezi i medijatorima krničnog rinosinuitisa s nosnom polipozom, nikako ne možemo reći da nam je jasno kako i zbog čega dolazi do ove bolesti. Nadam se da će ova disertacija biti barem jedan mali korak naprijed.



Slika 2. Suvremena operacijska sala (Vlastiti izvor)

1.1 Embriologija nosa i sinusa

U četvrtom tjednu embrionalnog razvoja bujanjem mezenhima oko usne jamice pojavljuje se pet nastavaka. Prvi je nastavak čeonog nastavak (*processus frontonasalis*), neparni nastavak na čijim su lateralnim rubovima njušne plakode. Ona su zadebljanja ektodermalnog epitela.

U petom se tjednu udubljuju u nosne jamice. Oko njih bujanjem mezenhima sa svake strane nastaje lateralni i medijalni nastavak. Medijalni nosni nastavak brže raste i dodiruje maksilarni. Medijalni se nastavci u šestom i sedmom tjednu potiskuju i spajaju tvoreći intermaksilarni segment od kojih se razvijaju *philtrum*, dio gornje čeljusti i trokutasto primarno nepce – os incizivum koje je povezano dijelom septuma. Lateralni nosni nastavci nazolakrimalnom su brazdom odvojeni od maksilarnih. Nazolakrimalna brazda osnova je za nazolakrimalni kanal. Maksilarni nastavci od petog do sedmog tjedna rastu prema medijalno i od njih se razvija gornja čeljust. Mandibularni nastavci spajanjem čine donju čeljust, a kada se spoje s mekim tkivom u lateralnim dijelovima nastaju obrazi. Osnova piramide nosa nastaje iz pet nastavaka. Iz čeonog nastavka razvijaju se dorzum nosa i vrh nosa. Spojeni medijalni nastavci čine vršak nosa i meki dio septuma. Iz lateralnih nosnih nastavaka nastaju nosna krila (*alae nasi*). Oronazalna membrana tijekom razvoja nestaje, a od nje nastaju hoane. Septum nosa nastaje od dva dijela: iz frontonazalnog nastavka prednji manji dio, a od maksilarnih nastavka stražnji dio. U desetom tjednu spajaju se nepce i septum. Nosne kosti vezane su vezivom na hrskavicu. U intermaksilarnoj kosti centar je rasta.

Okoštavanjem hrskavične *capsulae nasalis* nastaju etmoidni sinus i donja nosna školjka, dok od ostalog dijela hrskavične osnove nastaju hrskavice nosa. Paranasalni sinusi nastaju mjesec dana kasnije kao udubljenja ektoderma u stijenku hrskavice. Rast sinusa prestaju u dvadesetoj godini. Nakon drugog nicanja zubi razvijaju se maksilarni sinusi u potpunosti. Etmoidni sinusi dobro su razvijeni u djetinjstvu i imaju razmjerno razvijene otvore. Frontalni i sfenoidni sinusi razvijaju se nakon rođenja, poslije treće godine (1).

1.2. Anatomija dišnih puteva

Respiratorni sustav služi za izmjenu plinova između zraka i krvi. Ima dva dijela: respiratorni ili dišni i konduktivni ili provodni. U provodni dio ubrajaju se: 1. nos ili *nasus* (vanjski nos i nosna šupljina, *cavitas nasi*), 2. ždrijelo ili *pharynx*, 3. grkljan ili *larynx*, 4. dušnik ili *trachea* i 5. dušnice ili *bronchi*. Konduktivni dio dišnog sustava izrasta tijekom embrionalnog razvoja iz probavne cijevi, a to se vidi iz povezanosti i sudjelovanju ždrijela u provođenju zraka do pluća. Zrak obično prolazi kroz nos, potom kroz nazofarinks i orofarinks te napokon u grkljan, ali čovjek može disati i na usta. Respiratorni dio čine pluća, *pulmones*.

1.2.1. Anatomija nosne šupljine

Cavitas nasi ili nosna šupljina nosnom je pregradom, *septum nasi*, podijeljena u dva prostora. Kroz nosnice, *nares*, nosna šupljina komunicira s vanjskim svijetom, a straga je preko *choanae*, povezana s nosnim ždrijelom. Nosna šupljina ima svoja omeđenja, tako razlikujemo dno, krov te medijalnu i lateralnu stijenku. Tvrdi nepce prekriveno sluznicom čini dno nosne šupljine. Krov nije ravan kao dno. Koštanu mu podlogu tvore: stražnja strana nosne kosti, *os nasale*, nosni dio čeonih kosti, *pars nasalis ossis frontalis*, *lamina cribrosa*, te *corpus ossis sphenoidalis*. Medijalna stijenka nosna je pregrada, *septum nasi*, građena od *pars ossea* i hrskavičnog, *pars cartilaginea* i membranoznog, *pars membranacea*. Nosnu pregradu u vestibulumu prekriva koža, a ostali dio sluznica. Lateralna stijenka nešto je složenija, a sastoji se od *faies nasalis maxillae*, *laminae perpendicularis ossis palatini*, *os ethmoidale*, *corpus ossis sphenoidalis*, *concha nasalis inferior*, *os lacrimale*, *os frontale* i *os nasale*. Sasvim sprijeda na lateralnoj stijenci nalazi se njušni žlijeb, *sulcus olfactorius* koji pri njušenju usmjerava zračnu struju prema njušnom dijelu nosne sluznice. Na stražnjem dijelu lateralne stijenke nalaze se srednja i gornja nosna školjka i nosni hodnici ispod njih. Donja nosna školjka, *concha nasalis inferior* samostalna je kost.

OMC ostiomeatalni kompleks središnja je anatomska jedinica u lateralnom zidu nosne šupljine. Pod tim se pojmom krije cjelokupni prostor koji se nalazi unutar srednjeg nosnog hodnika. Sprijeda ga omeđuje *infundibulum*, *procesus uncinatus*, a u sredini su *bulla ethmoidalis*, okolne etmoidalne stanice i *hiatus semilunaris*. To je područje značajno, jer se preko njega

dreniraju maksilarni, frontalni i prednji etmoidni sinus. Lateralno ga omeđuje *lamina papiracea*, medijalno srednja nosna školjka i *infundibulum*, a dolje donja nosna školjka.

Paranasalni sinusi ili *sinus paranasales* niz su zračnih prostora u okolnim kostima, a uključuju *sinus sphenoidalis*, *sinus frontalis*, *sinus maxillaris* i *sinus ethmoidalis*. Paranasalni sinusi razvijaju se kao izdanci nosne šupljine. Sve ih prekriva ista sluznica kao i nosnu šupljinu, koja je tanja nego u nosu, nije tako dobro vaskularizirana i nije čvrsto prirasla uz kost.

Sfenoidni sinus (*sinus sphenoidalis*) nalazi se u tijelu klinaste kosti. Otvara se u nosnu šupljinu kroz otvor *apertura sinus sphenoidalis*. Otvor se drenira u *recessus sphenothmoidalis*. Tanke koštane stijenke odvajaju sinus od važnih tvorbi: optičkog živca, hipofize, unutarnjih karotidnih arterija i kavernoznog venskog sinusa.

Frontalni sinus (*sinus frontalis*) nalazi se u čeonj kosti. Drenira se preko ljevkastog kanala, *ductus nasofrontalis*, u prednji dio procjepa, *hiatus semilunaris*, u srednjem nosnom hodniku. Frontalni sinusi obično imaju dva dijela, okomiti u ljusci frontalne kosti i vodoravni u orbitalnom dijelu kosti. Ako je orbitalni dio sinusa velik, onda svojom gornjom stijenkom sudjeluje u tvorbi dna prednje lubanjske udubine, a donjom stijenkom omeđuje orbitu.

Maksilarni sinus (*sinus maxillaris*) nalazi se u tijelu gornje čeljusti i najveći je sinus. *Hiatus semilunaris* procjep je u gornjem dijelu i ulaz je u sinus. Donja nosna školjka šalje *procesus maxillaris* prema dolje u unutrašnjost sinusa i zatvara gotovo cijelu donju polovinu hijatusa. *Processus uncinatus* i *bulla ethmoidalis* zatvaraju gornji dio hijatusa. Između nastavaka ostanu otvori koje zatvara podvostručenje nosne sluznice. Krov sinusa čini dno orbite, a dno sinusa tvore alveolarni nastavci maksile.

Etmoidni sinus (*sinus ethmoidalis*) sastoji se od nekoliko skupina zračnih komora koje u rešetnici tvore *labyrinthus ethmoidalis*. Nalazi se između nosne šupljine i orbite. Dijeli se na *cellulae ethmoidales anterior, mediae et posteriores*. Prednje etmoidne komore dreniraju se ispod srednje nosne školjke, a stražnje ispod gornje nosne školjke (2).

Devijacija nosnog septuma može značajno utjecati na normalnu fiziologiju nosa, prvenstveno ometajući protok zraka i funkciju nosne šupljine. Pomicanjem nosne školjke lateralno, devijacija može dovesti do suženja srednjeg nosnog hodnika, što smanjuje ventilaciju i drenažu paranasalnih sinusa (3). Prema nedavnim istraživanjima, devijacija septuma često uzrokuje konkavnost na suprotnoj strani septuma, što dodatno sužava

kontralateralni nosni hodnik i može pogoršati simptome opstrukcije (4). Osim mehaničke opstrukcije nosnog disanja, devijacija septuma također može ometati prirodnu drenažu sluzi i funkciju mukocilijarnog transporta, što pridonosi razvoju nosne kongestije i povećava rizik od sekundarnih infekcija sinusa, uključujući rinosinusitis (3).

Deformacije nosnog septuma također se smatraju važnim čimbenikom u patogenezi kroničnog rinosinusitisa (KRS), prvenstveno zbog mehaničke blokade prirodnih otvora sinusa, poremećaja mukocilijarne funkcije te otežanog kirurškog pristupa tijekom liječenja, što dodatno komplicira postoperativnu njegu (5–7). Iako nekoliko studija sugerira povezanost između devijacije nosnog septuma i razvoja KRS-a (8, 9), postoje i istraživanja koja nisu našla statistički značajnu korelaciju između ovih stanja (10, 11). Ova kontradiktorna saznanja upućuju na potrebu za daljnjim kliničkim i epidemiološkim studijama kako bi se razjasnio točan patofiziološki mehanizam i potencijalna povezanost između devijacije septuma i kroničnog rinosinusitisa.

1.3. Fiziologija sluznice nosnog kavuma

Tri su glavne funkcije nosa osjet mirisa, disanje i protektivna funkcija. Ove funkcije potpomognute su zamršenom anatomijom nosne šupljine, koja stvara veliku površinu. Mukoza, sluz i cilije sluznice povećavaju kontaktnu površinu kroz koju struji udahnuti zrak, povećavaju olfaktornu funkciju i rezultira zagrijavanjem zraka, povećanjem vlažnosti zraka i njegovim filtriranjem prije nego što dosegne donje dišne puteve.

1.3.1. Respiracija (disanje)

U nosnoj šupljini udahnuti se zrak grije na 37 °C i vlaži do 85 % što omogućava urednu alveolarnu izmjenu plinova i pri volumenu od 7 L u minuti. Osnova fiziologije nosne šupljine turbulentno je strujanje zraka koje se događa pri sporijim i bržim udasima. Turbulentno strujanje povećava kontakt između udahnutog zraka i nosne mukoze. Najveći otpor strujanju zraka kroz nos daje prednja nosna valvula koju čini septum i glava donje nosne školjke. Submukoza nosne šupljine bogata je arteriolama, venulama i kapilarima, donja nosna školjka puna je malih vena što joj pomaže pri povećanju i dovodi do kongestije, dok dekongestijom nosa dolazi do kontrakcije donje nosne školjke i smanjenja same

školjke. Obično simpatikus kontrolira strujanje zraka kroz nos, a parasimpatikus sekreciju. Autonomna regulacija toga naziva se nosni ciklus, koji se u 80 % populacije događa svakih pola do tri sata i regulira strujanje zraka tako da ga pojačava ili smanjuje u suprotnim nosnicama, ovaj fiziološki ciklus brojni ljudi tumače kao patološki i zbog njega odlaze doktoru.

1.3.2. Olfaktorna funkcija

Olfaktorni greben nalazi se između septuma i gornje nosne školjke i ponekad prelazi na srednju nosnu školjku, prekriven je neuroepitelom. Mirisi mogu doseći olfaktorni greben nazalno ili retronazalno, stimulacija dovodi do osjeta mirisa. Postoji preko 1 000 vrsta receptora za miris koji su organizirani u zone, raspoređene neodređeno, svaki miris aktivira drugi set receptora što rezultira jedinstvenom aktivacijom.

1.3.3. Protektivna funkcija

Normalna sinonazalna sluznica sačinjena je od sloja mukoze, lamine proprie, submukoze i periosta. Epitelne stanice nosa prekrivene su cilijama, pseudostratificirane kolumnarne stanice. Tanki sloj acelularne membrane razdvaja epitelni sloj od lamine proprie. Ispod epitela nalaze se limfociti, plazma stanice i makrofazi. Nosni filter načinjen od vibrisa i cilija izbacuje čestice veće od 0,5 um obično kihanjem, dio se otplavi prema nazofarinksu pomoću gel sloja s glikoproteinima lučenog od strane Goblet stanica. U svim sinusima sluz se otplavljuje prema prirodnim usćima, potom dalje prema nazofarinksu gdje bude svakih 10 - 15 minuta progutan prema želudcu. Cilijarna aktivnost može biti narušena smanjenjem vlažnosti, temperature ili promjenom mikrobiološkog okoliša nepogodnog za mukocilijarni transport.

Narušena i smanjena cilijarna aktivnost može dovesti do akutne, a kasnije i do eventualno kronične upale sinusa kojim se najčešće i očituje, a može dovesti i do drugih bolesti kao što su *otitis media* i upala pluća.

Nosna mukoza interferira s vanjskim svijetom, neprestanom interakcijom s bakterijama, virusima i gljivama i čini tako prvu crtu obrane protiv agresivnih patogena, bez prevelike reakcije tkiva i kolateralne štete. Epidemiološki podaci pokazuju da se 0,5 %

gornjih respiratornih infekcija komplicira sinuitisom što, s epidemiološkoga stajališta, čini virusne infekcije gornjih dišnih putova glavnim predispozicijskim faktorom za nastanak akutnog sinuitisa. Mehanizam uključuje povećanje količine i smanjenje viskoznosti nosnog sekreta te oštećenje cilija, koje može potrajati i mjesecima nakon infekcije. Osnovni faktor koji dovodi do sinuitisa, uz infektivni agens, jest neprikladna ventilacija i drenaža zbog opstrukcije sinusnih ušća. Glavni predispozicijski faktori virusni su respiratorni infekt, alergijski rinitis, septalna deformacija, odontogena upala i strano tijelo nosa. Niz bakterija koji može uzrokovati akutni sinuitis najčešće su *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*. Anaerobni uzročnici imaju bitniju ulogu u patogenezi kod kroničnog sinuitisa. Bakterija koja se susreće u aspiratu sinusa je i *Staphylococcus aureus*, ali je njezina značajnost osobita kod kroničnog rinosinuitisa (12).

1.4. Kronični rinosinuitis

Rinosinusitis upala je nosne i sinusne (sinonazalne) sluznice, karakterizirana pojavom najmanje dvaju simptoma, uključujući obveznu začepljenost ili sekreciju (na nos ili postnazalno), uz prateće simptome boli i pritiska u projekciji sinusa te poremećaj njuha. Ako tegobe traju duže od 12 tjedana, riječ je o kroničnom rinosinusitisu (13). Rinosinusitis značajan je javnozdravstveni problem koji se javlja u 5 - 15 % europske i američke populacije (14,15) te uvelike narušava kvalitetu života oboljelih (16,17).

Prognoza bolesti lošija je što objektivni znaci više koreliraju sa subjektivnim osjećajem bolesnika. Lošiju prognozu imaju i bolesnici koji imaju uz nosnu polipozu i udruženost s bronhijalnom astmom, intolerancijom na acetilsalicilnu kiselinu i cilijarnom diskinezijom.

Ovisno o pratećoj pojavi ili izostanku nosnih polipa, razlikujemo dva različita oblika kroničnog rinosinuitisa; kronični rinosinusitis s nosnom polipozom (KRS+NP) i bez nosne polipoze (KRS-NP). Nosni polipi najčešće se pojavljuju u obliku bilateralnih, grozdastih struktura koje se sastoje od upalnih stanica, vezivnog tkiva, mukoznih žlijezda i kapilara obloženih pseudostratificiranim epitelom. Dodatna podjela unutar skupine oboljelih od KRS+NP-a vezana je uz razlike u sastavu i efektorskom odgovoru imunosnog infiltrata, pri čemu se povećani broj neutrofila i prateći razvoj tip 1 imunosnog odgovora češće opisuju u azijskim populacijama KRS+NP oboljelih, dok u zapadnim zemljama KRS+NP uglavnom obilježava povećani broj eozinofila i tip 2 imunosni odgovor (18). Međutim, kod

KRS+NP bijelaca zabilježena je i pojava mješovite upale tipa 1 (INF- γ) i 2 (IL-5), bez prisutnosti eozinofila, u pratnji dominantnog T limfocitnog infiltrata aktiviranog, memorijskog fenotipa

(19). Noviji radovi u populaciji bijelaca ukazuju također i na važnu ulogu imunosnog odgovora tipa 3, dominantno vezanog uz ekspresiju upalnih citokina poput IL-17, IL-22 i IL-21, odgovornih za diferencijaciju, proliferaciju i migratorni potencijal Th17/Tc17 limfocita i neutrofila (20,21) u sinonazalnoj sluznici oboljelih. Prema upalnom obrascu, CRSwNP dodatno se dijeli na eozinofilni CRS+NP (Eos KRS+NP) i neeozinofilni KRS+NP (non-Eos KRS+NP). Postoje razlike između ova dva podtipa KRS+NP-a. Neeozinofilni KRS+NP (non-Eos KRS+NP) vjerojatnije uključuje neutrofilnu upalu i fibrozu te dijeli neke karakteristike s KRS-NP-om i eozinofilnim KRS+NP-om (Eos KRS+NP) (22).

Unatoč rezultatima posljednjih istraživanja, sama etiologija i patogenetski mehanizmi nastanka nosne polipoze još su uvijek nerazjašnjeni (23). Kao potencijalni uzročnici, često se, međutim, spominju bakterijske, virusne i gljivične infekcije nosne sluznice (24,25). Najčešće su anaerobne bakterijske kulture izolirane iz sinonazalnih obrisaka bolesnika s kroničnim rinosinusitisom *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans* dr.

(26). Noviji radovi, štoviše, ukazuju na važnu ulogu bakterijskih superantigena, uključujući i enterotoksine porijeklom iz *S. aureus*, u aktivaciji T staničnog odgovora i razvoju upalnog procesa kod oboljelih od KRS-a (27).

Kronični rinosinusitis često je ponavljajuća bolest čija terapija može biti konzervativna ili operacijska. Cilj terapije kod oboljelih jest uspostaviti prohodnost nosa, omogućiti ventilaciju i drenažu paranazalnih šupljina i oporaviti osjet njuha. Navedeni terapijski ciljevi obično se postižu primjenom lokalnih i sistemskih kortikosteroida u kombinaciji s postupcima funkcionalne endoskopske sinusne kirurgije (FESS, od engl. *functional endoscopic sinus surgery*). U konzervativnu terapiju, uz topičke i sistemske kortikosteroide, spadaju i antibiotici. Makrolidi su antibiotici izbora, oni pospješuju mukocilijarni transport, imaju imunomodulacijska i protuupalna svojstva, zbog čega djeluju sinergistički s kortikosteroidima, a ne samo antibakterijski (28). Neuspjeh konzervativne terapije indikacija je za kirurško liječenje. Kirurško liječenje trenutno, i na određeni rok, rješava simptome, ali ne i uzrok bolesti, stoga su recidivi relativno česti.

1.5. Dijagnostika i liječenje KRS+NP

Dijagnoza KRS+NP-a prvenstveno je klinička i temelji se na anamnezi i kliničkom pregledu, a najbitniji dio pregleda endoskopija je nosa.

Najčešći su simptomi nosna opstrukcija i promjene osjeta mirisa i okusa, to su najčešći, ali i najteži simptomi. Drugi su simptomi sekrecija na nos i postnazalna sekrecija te glavobolja. Svi ti simptomi dovode do smanjenja kvalitete života koja se može izmjeriti upitnikom o kvaliteti života (prilog 1. SNOT 22). Iz anamneze treba doznati eventualne alergije, plućne simptome te preosjetljivost na salicilate.

Pri prvom pregledu potrebno je učiniti, uz potpuno otorinolaringološki pregled, i endoskopiju nosa na temelju koje možemo odrediti status polipa u nosu, a preporuča se koristiti klasifikaciju po Malme-u (Tablica 1.). KRS+NP u pravilu se javlja obostrano, ali ne nužno simetrično. Ako je nosna polipoza jednostrana, potrebno je isključiti invertni papilom ili zloćudni tumor. Kod djece s nosnom polipozom treba posumnjati na primarnu cilijarnu diskineziju i cističnu fibrozu (28,29).

Radiološka obrada potrebna je u slučaju sumnje na komplikacije bolesti ili sumnje na destrukciju kosti. Standardni rendgenogram sinusa ne preporučuje se učiniti zbog niske specifičnosti i niske osjetljivosti. Preporuča se učiniti CT paranazalnih šupljina neposredno nakon završetka terapije oralnim kortikosteroidima, a u svrhu pripreme bolesnika za operativni zahvat.

Za dijagnozu nije ključna radiološka i mikrobiološka obrada, korisna je alergološka obrada jer 50 - 70 % bolesnika ima i alergiju na inhalacijske alergene. Anatomske deformacije (septuma i nosnih školjki) predispozicijski su čimbenik u oko 15 % slučajeva. Radiološka dijagnostika ključna je za objektivnu procjenu stupnja sinuitisa. Konvencionalna radiološka metoda RTG ne daje nam dovoljno informacija o sfenoidnom i etmoidnom sinusu, pa je najprikladnija kompjuterizirana tomografija (CT), a potom se prema Lund Mckey-u (30) određuje zahvaćenost pojedinih sinusa i endoskopski gradacija po Malmu.

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

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

Tablica 2. Lund-Mackey sustav stupnjevanja CT nalaza. 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

Konzervativno liječenje kod bolesnika koji nemaju značajnu opstrukciju NP-a (Malm 1) i imaju očuvan osjet mirisa obuhvaća inicijalnu terapiju izbora ispiranjem nosa fiziološkom otopinom i primjenu intranazalnih kortikosteroida. Ako je kod bolesnika dokazana alergija na inhalacione alergene, u obzir dolazi i intranazalni kortikosteroidi u kombinaciji s antihistaminikom.

Ako je kod bolesnika nosna opstrukcija značajna (Malm 2-3) i/ili postoji hiposmija ili anosmija, uz ispiranje nosa s fiziološkom otopinom i intranazalnog kortikosteroida u obzir dolazi i peroralni kortikosteroid u niskim dozama kroz dva tjedna, u silazećoj shemi. Ova terapija ne preporučuje se više od dva do tri puta godišnje. Učinak peroralnih kortikosteroida

značajan je u smanjenju veličine polipa, što dovodi do manje opstrukcije i bolje primjene lokalne terapije (31).

Kod bolesnika s KRS+NP-om koji ne odreagira adekvatno na konzervativnu terapiju indicirano je kirurško liječenje, funkcionalna endoskopska kirurgija sinusa (FESS) (31). Ako je bolesnik operiran u više navrata radi KRS+NP-a, uputno je koristiti CT neuronavigaciju, ako je bolnica posjeduje i to radi smanjenja mogućih komplikacija, a one su rinolikvoreja, povreda orbite, krvarenja.

Liječenje se antibioticima kod bolesnika s KRS+NP-om ne preporučuje, osim kod sumnje na infekciju. Tada je preporuka uzeti obrisak srednjeg nosnog hodnika za mikrobiološku analizu i ordinirati antibiotik po antibiogramu. Makrolidi antibiotici su izbora, oni pospješuju mukocilijarni transport, imaju imunomodulacijska i protuupalna svojstva, zbog čega djeluju sinergistički s kortikosteroidima, a ne samo antibakterijski (28).

Novija opcija liječenja biološka je terapija dupilumabom (32). Prema EPOS smjernicama (33), biološka terapija indicirana je kod bolesnika s refrakternim bilateralnim KRS+NP-om, koji su prošli kirurško liječenje ili koji se nisu mogli operirati zbog medicinskih razloga i koji imaju najmanje tri od pet kriterija: dokaz Th2 upale, potreba uzimanja peroralnih kortikosteroida najmanje dva puta godišnje ili kontinuirano uzimanje tri mjeseca, značajno narušena kvaliteta života, astma, značajan gubitak osjeta mirisa.

1.6. Kvaliteta života bolesnika s KRS+NP-om

Kronični rinosinusitis s nosnim polipima (CRSwNP) stanje je koje se najčešće povezuje s Th2 tipom upale, nešto rjeđe s Th1 i Th17 (34,35), te značajno narušava kvalitetu života vezanu uz zdravlje sa simptomima koji uključuju nazalnu opstrukciju, gubitak mirisa i rinoreju, kao i poremećaje spavanja (36), kao što je i ranije navedeno. S obzirom na simptomatsku prirodu kroničnog rinosinuitisa s nosnim polipima (CRSwNP), mjere rezultata koje prijavljuju pacijenti imaju ključnu ulogu u informiranju odluka o liječenju (37).

Sinonasal Outcome Test (SNOT-22) (Privitak 1.) evaluirani je upitnik u kojem bolesnici prijavljuju težinu simptoma, a osmišljen je za procjenu utjecaja kroničnog rinosinuitisa (CRS) na kvalitetu života vezanu uz zdravlje. Sadržaj SNOT-22 obuhvaća težinu simptoma, socijalni i emocionalni utjecaj, produktivnost i posljedice na spavanje koje uzrokuje CRS.

Stavke se boduju od 0 (nema problema) do 5 (problem je toliko težak koliko može biti) i zbrajaju se kako bi se dobio ukupni rezultat u rasponu od 0 do 110 (38).

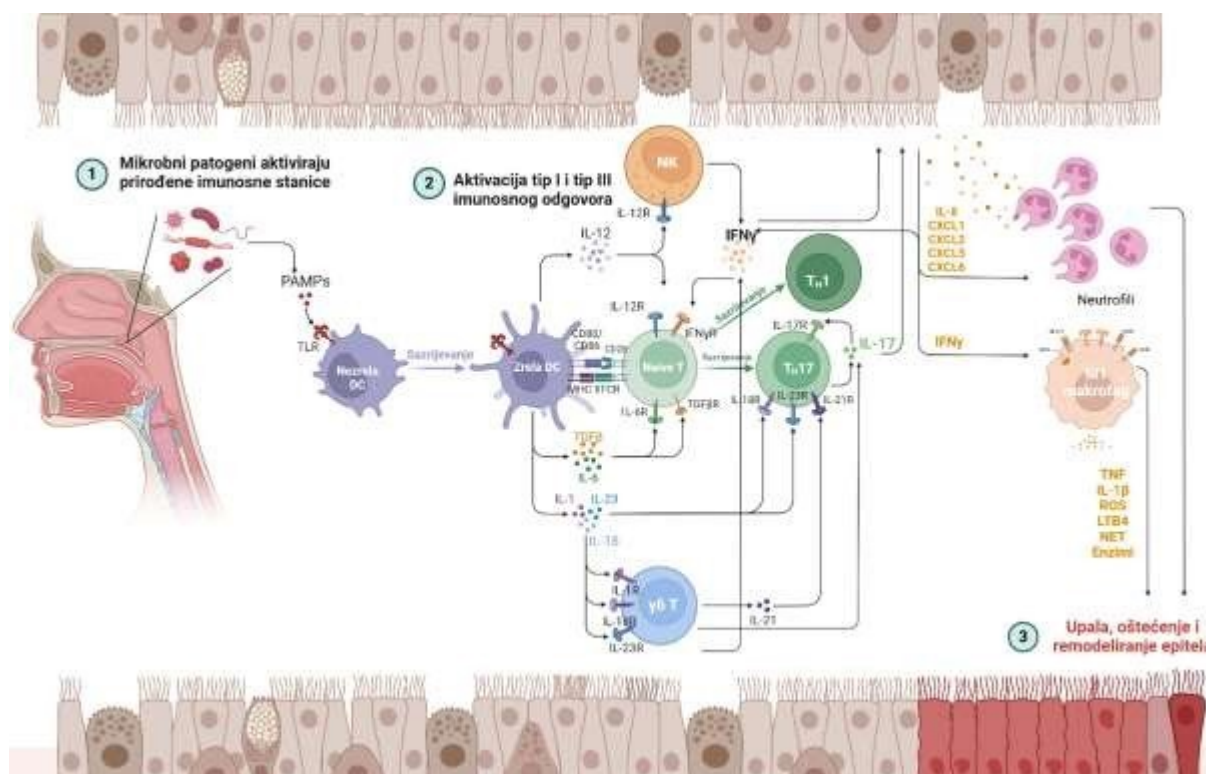
1.7. Utjecaj mikrobne flore na KRS+NP

Kronični rinosinuitis (CRS) može se opisati kao heterogeni poremećaj koji uključuje brojne patogene procese i upalne mehanizme (39). Međutim, povezanost između infektivnih organizama i cjelokupne patogeneze bolesti ostaje nejasna. Studije uloge superantigena, posebno enterotoksina *Staphylococcus*, sugeriraju da se dominantna upala temelji na lokalnoj flori, a ne na intrinzičnom mukoznom procesu (40-42). Paranasalni sinusi sastoje se od zamršenih, parnih šupljina unutar kraniofacijalnog kostura koji vjerojatno sadrže jedinstvena mikrookruženja. Kao takva, svaka bi niša mogla imati prevlast različitih bakterija koje su prilagođene jedinstvenim svojstvima svakog mikrookruženja (npr. hipoksija, pH, vlažnost). Nije poznato ima li svaki pojedini sinus jedinstveno mikrookruženje i pridruženu jedinstvenu mikrobiotu, ili jesu li prilično slični u cijelosti. Zabilježeno je da kolonizacijski potencijal bakterija predviđa prisutnost ili odsutnost određenih ključnih modulatora upale, posebice interleukina 5 (IL-5). T helper 2 (Th-2)/upala posredovana eozinofilima predviđa Gram-pozitivnu kulturu, dok Th-1/ neutrofilni odgovor ukazuje na gram-negativnu kolonizaciju, iako nije bila statistički značajna (43). Pacijenti s KRS-om predisponirani su smanjenoj bakterijskoj raznolikosti u usporedbi s osobama bez KRS-a, što dovodi do veće sklonosti za prethodno smatrane komenzalne organizme da će postati patogeni. Prije rađena studija temeljena na kulturi pokazala je da je srednji nosni hodnik oko 80 % do 90 % reprezentativan u detekciji kolonizirajućih bakterija (44-46). Iako nisu savršeni, ovi rezultati podrazumijevaju da mikrobne sličnosti postoje između srednjeg nosnog hodnika i prednjeg etmoida i maksilarnih sinusa. Analizama briseva srednjeg nosnog hodnika kod zdravih odraslih pojedinaca, najčešće bakterije bile su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Propionibacterium acnes* (29).

1.8. Th1 i Th17 tip upalnog odgovora i njihova uloga u KRS+NP-u

Stanice Th1 upalnog odgovora (od eng. *Type 1 helper T cells – Th1*) podvrsta su CD8+ T stanica karakterizirane stvaranjem Th1 citokina – IFN- gama, interleukin IL 1 -beta, interleukin –6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) interleukin 17 (IL-17) i nakupljanje Th1 i Th17

stanica (47,48). Potencijalni su mehanizmi u ne-T2 KRS+NP. Upala posredovana T1 uglavnom je izazivala nakupljanje i aktivaciju TH1 stanica, CD81 T stanica i NK stanica, a IFN-g ključni je citokin koji kontrolira daljnje regrutiranje T1 imunoloških stanica, disfunkcija epitelne barijere, taloženje fibrina i razvoj makrofaga. Makrofagi proizvode IL-1b i ROS kako bi inducirali upalu. T3-posredovana upala potaknuta je nakupljanjem i aktivacijom TH17 stanica. IL-17 inducira regrutiranje TH17 stanica i neutrofila. Aktivirani neutrofili otpuštaju enzime OSM, NET, IL-1b, LTB4 i ROS kako bi inducirali disfunkciju epitelne barijere, upalu i oštećenje tkiva. IgG antitijela također su povišena u ne-T2 KRS+NP i može igrati ulogu u aktivaciji neutrofila i putova komplementa. NET, neutrofil izvanstanična zamka, NK- prirodni ubojica i Makrofagi također se prebacuju na fenotip M1 i proizvode IL-1b i ROS putem aktivacije upale NLRP3(49). Neutrofili igraju važnu ulogu u Th1 upalnom odgovoru (50). Aktivirani neutrofili oslobađaju unaprijed pohranjene molekule uključujući mijeloperoksidazu, elastazu, katepsin G, proteinazu 3 i antimikrobne peptide koji štite od zaraženih bakterije i induciraju oštećenje i remodeliranje tkiva. Aktivirani neutrofili također sintetiziraju i proizvode lipidne medijatore (uglavnom LTB4), ROS i nekoliko citokina i kemokina uključujući OSM, IL-1b i IL-8 te doprinose upali i dalje regrutiranje neutrofila (51).



Slika 3. Shematski prikaz aktivacije tip I i tip III imunskog odgovora (Vlastiti izvor)

Prva faza – Aktivacija urođenog imunosnog odgovora: Mikrobní patogeni (virusi, bakterije, gljive) preko PAMPs (molekularni uzorci povezani s patogenima) aktiviraju TLR (*Toll-like* receptore) na nezrelim dendritičkim stanicama (DC). Ova aktivacija potiče sazrijevanje nezrele DC u zrele dendritičku stanicu koja sada može aktivirati specifičan imunosni odgovor.

Druga faza – Aktivacija adaptivnog imunosnog odgovora (tip I i tip III): Tip I imunosni odgovor posreduju Th1 stanice (T pomoćničke stanice tipa 1). Zrela dendritička stanica luči IL-12, što potiče diferencijaciju naivnih T stanica (Naive T) u Th1 stanice. Th1 stanice proizvode IFN- γ (interferon gama), koji aktivira makrofage (M1 makrofagi) koji zatim luče pro-upalne citokine poput TNF, IL-1 β te ROS (reaktivne kisikove spojeve), enzime i druge molekule koje pospješuju upalu. Tip III imunosni odgovor posreduju Th17 stanice. Zrela dendritička stanica luči IL-6 i TGF- β , što potiče diferencijaciju naivnih T stanica u Th17 stanice koje proizvode IL-17. IL-17 regrutira neutrofile putem kemokina poput CXCL1, CXCL2, CXCL5 i CXCL6 što dovodi do jače upalne reakcije.

Treća faza - Upala, oštećenje i preoblikovanje epitela: aktivirane stanice, poput neutrofila i makrofaga, luče citokine i druge pro-upalne molekule koje uzrokuju upalu i oštećenje epitela. Ovi procesi karakteristični su za mnoge upalne bolesti, uključujući autoimune poremećaje i kronične infekcije.

1.9. $\gamma\delta$ T limfociti

$\gamma\delta$ T stanice mala su, ali osebujna podskupina T stanica koje je prvi prepoznao Brenner 1986. godine (52). $\gamma\delta$ T stanica nedavno je opisana vrsta T stanica koja se razlikuje od konvencionalnih $\alpha\beta$ T stanice u razvoju, fenotipu i funkciji (29). Neke molekule koje definiraju sazrijevanje $\alpha\beta$ T stanica i reguliraju njihovu funkciju, kao što su CD4, CD8 i CD28, nisu pronađeni na $\gamma\delta$ T stanicama (53). Istraživanja pokazuju da $\gamma\delta$ T stanice mogu sadržavati do 50 % T stanica unutar epitela ili tkivima bogatim sluznicama i manje od 10 % u perifernoj krvi (45). Većina $\gamma\delta$ T stanica nalazi se u epitelu i sluznici kože, želuca, vagine itd., a izrazito su uključeni u lokalnom imunitetu (53, 54). Njihove razine dosežu vrhunac u ranoj fazi upale i izlučuju obilne količine kemokina i citokina te reguliraju patogeni obrazac $\alpha\beta$ T stanica (53).

Prva linija obrane od mikrobnih infekcija uvelike je vezana uz aktivaciju prirodnih imunskih linija, posebice nekonvencionalnih limfocitnih populacija poput gama-delta ($\gamma\delta$) T stanica (55). Za razliku od konvencionalnih, adaptivnih T limfocitnih vrsta koje na svojoj površini izražavaju T stanični receptor (TCR od engl. *T cell receptor*) sastavljen od α i β TCR lanaca, $\gamma\delta$ T stanice izražavaju $\gamma\delta$ TCR receptore ograničenog repertoara, koji prepoznaju fosforilirane mikrobne antigene i/ili biljege unutarstaničnog stresa u kompleksu s nekласičnim antigen prezentirajućim molekulama poput BTN3A1, BTN2A1, CD1c i CD1d (56).

Ljudske $\gamma\delta$ T stanice čine manji udio (2 - 5 %) ukupnih limfocita T, a sukladno vrsti TCR delta lanca često su razgraničene u nekoliko podrazreda, od kojih se najčešće spominju V δ 1, prisutne u koži, sluznici pluća, crijeva i reproduktivnih organa; V δ 2, dominantne u perifernoj krvi; i V δ 3, prisutne u krvi i jetri (57). Temeljem jačine ekspresije CD3 koreceptorske molekule i $\gamma\delta$ TCR receptora, humane $\gamma\delta$ T linije moguće je ujedno razlikovati na CD3^{int} $\gamma\delta$ TCR^{hi} i CD3^{hi} $\gamma\delta$ TCR^{int} podrazrede, pri čemu $\gamma\delta$ TCR^{hi} podskupinu dominantno čine δ 1+, a $\gamma\delta$ TCR^{int} većinom δ 2+ $\gamma\delta$ T stanice (58). Pri susretu sa stranim antigenima na mjestu upale, $\gamma\delta$ T stanice posreduju izravne, citotoksične učinke ekspresijom upalnih citokina (TNF- α , INF- γ , IL-17, IL-22), prirodno ubilačkih receptora (NKG2D) i proteolitičkih enzima (perforin, granzim B).

Prirođeni fenotip, citotoksični i migratorni kapacitet pojedinih $\gamma\delta$ T subpopulacija nalaze se pak pod kontrolom niza transkripcijskih čimbenika (59), poput ROR γ t (od. engl. *RAR-related Orphan Receptor Gama T*, kodiran genom RORC), PLZF (od. engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*, kodiran genom ZBTB16) i T-bet (od engl. *T-box transcription factor*, kodiran genom TBX21) (60). U tom kontekstu, δ 1+ vrste humanih $\gamma\delta$ T limfocita uglavnom obilježava PLZF^{low}RORC^{hi}IL-17+, a δ 2+ linije PLZF^{hi}TBX21^{hi}IFN γ ^{hi} transkripcijski profil (61).

1.10. Uloga $\gamma\delta$ T limfocita u razvoju KRS+NP-a

Unatoč novim saznanjima koja pridonose boljem razumijevanju funkcije i raznolikosti heterogenih $\gamma\delta$ T vrsta, gotovo su u potpunosti nerazjašnjeni udjeli, fenotipska raznolikost i potencijalna uloga $\gamma\delta$ T stanica u patogenezi neutrofilne KRS upale s nosnim polipima.

Nekolicina dosadašnjih istraživanja, opisuje, naime, nepromjenjeni (62,63) ili povećani udio (64) $\gamma\delta$ T stanice u sinonazalnoj sluznici oboljelih od eozinofilnog oblika KRS+NP-a, u

odnosu na zdrave i KRS-NP oboljele ispitanike. Također, kod eozinofilne varijante KRS+NP-a oboljenja opisana je povećana ekspresija V γ 1 mRNA (65), gena koji kodira otvoreni okvir čitanja, ali ne i funkcionalnu jedinicu humanog TCR gama-lanca. Međutim, fenotip i transkripcijski profil $\gamma\delta$ T stanica u neutrofilnom obliku KRS+NP-a u potpunosti su nerazjašnjeni. Štoviše, u potpunosti je nejasno kako promjene u sastavu mikrobioma sinonazalne sluznice KRS+NP oboljelih utječu na sastav i omjer tkivnih δ 1 i δ 2 $\gamma\delta$ T podrazreda te na promjene mRNA ekspresije funkcionalnih gena u kontroli fenotipskog i citokinskog profila $\gamma\delta$ T stanica.

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Tkivni udjeli i fenotip $\gamma\delta$ T stanica, kao i transkripcijski profil delta-lanaca, gena u kontroli prirođenih obilježja limfocita te gena uključenih u tip 1 i tip 3 imunološki odgovor mononuklearnih stanica u sinonazalnoj sluznici i nosnim polipima oboljelih od nealergijskog kroničnog rinosinuitisa s nosnom polipozom (KRS+NP) značajno se razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

Osim toga, ispitivani parametri koreliraju s promjenama u sastavu mikrobne flore, udjelom perifernih i tkivnih leukocita, biokemijskim parametrima i kliničkim statusom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti i usporediti mikrobnu floru (prisutnost bakterija/gljiva) sinonazalne sluznice oboljelih od nealergijskog KRS+NP-a i kontrolnih ispitanika.
2. Odrediti frekvenciju $\gamma\delta$ T limfocita i njihovih subpopulacija (V δ 1+V δ 2-, V δ 1-V δ 2+, V δ 1-V δ 2-) u sluznici srednje nosne školjke i nosnog polipa oboljelih od nealergijskog KRS+NP-a i usporediti s frekvencijama istih staničnih populacija u sluznici srednje nosne školjke kontrolnih ispitanika.
3. U populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz nosnih polipa i tkiva srednje nosne školjke KRS+NP oboljelih i zdravih kontrolnih ispitanika, istražiti raznolikost $\gamma\delta$ TCR repertoara (V δ 1, V δ 2, V δ 3) i transkripcijski profil gena vezanih uz fenotip i funkciju V δ 2 (ZBTB16, TBX21, INFG) i V δ 1 (RORC, IL17) $\gamma\delta$ T limfocita.
4. Ispitati povezanost između raznolikosti mikrobne flore sinonazalne sluznice oboljelih i kontrolnih ispitanika s promjenama u frekvenciji i fenotipu tkivnih $\gamma\delta$ T populacija i transkriptomu tkivnih mononukleara.

4. MATERIJALI I METODE

U istraživanju je sudjelovao 71 bolesnik. Bolesnici su podjeljeni u dvije skupine, a potom jedna skupina dodatno u dvije. Prvu skupinu bolesnika činilo je 30 bolesnika s KRS+NP-om koji su bili hospitalizirani na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata radi operativnog zahvata FESS i koji prema kliničkim i laboratorijskim kriterijima zadovoljavaju dijagnozu neozinofilnog kroničnog rinosinitisa s nosnom polipozom (KRS+NP). U kontrolnoj skupini odabran je 41 bolesnik. Bolesnici su hospitalizirani i operiran na Klinici zbog drugih rinolkirurških operacije (npr. septoplastika, redukcija donjih nosnih školjki, rinoseptoplastika), a ujedno nemaju dijagnozu KRS+NP-a.

Isključni su kriteriji bili: poznata alergijska sklonost, astma, KOPB, onkološki bolesnici, preosjetljivost na salicilate, korištenje kortikosteroida, antibiotika i antihistaminika mjesec dana prije operativnog zahvata.

Za vrijeme prijeoperacijske obrade svakom bolesniku učinjen je endoskopski pregled nosa kojim je određen stupanj proširenosti bolesti (Malm klasifikacija), CT PNŠ (CT glave i paranazalnih šupljina) učinjen je samo skupini s dijagnozom KRS+NP-a, uzorkovala se krv te je iz seruma učinjena biokemija (HS CRP, CKS, Uk IgE, RIST i RAST). Svakom bolesniku učinjen je obrisak nosa na Eo u sklopu alergijske obrade te je učinjena kompjuterizirana tomografija paranazalnih šupljina svim bolesnicima s KRS+NP-om. Svi bolesnici odgovorili su na upitnike o kvaliteti života (SNOT 20, SNOT 22, Nose score i Japanski test). Svi bolesnici zabilježili su komorbiditete, dob, spol, alergije na lijekove i pušenje.

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: 15-61-47-23-10).

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

Svim bolesnicima uzorkovao se bris srednjeg nosnog hodnika za kultivaciju i identifikaciju bakterija. Kod bolesnika s KRS+NP-om uzorkovao se bris prednjeg etmoidnog sinusa intraoperativno dok se u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika intraoperativno uzorkovao bris srednjeg nosnog hodnika. Endoskopski vođeni bris sinusa uvijek se uzima iz prednjeg etmoidnog sinusa. Upotrijebili smo flokirane briseve (Copan Italia S.p.A., Brescia, Italija) kako bismo maksimizirali prinos bakterija. Da bi se izbjegla nehotična kontaminacija, odbačeni su svi uzorci koji su tijekom uzorkovanja mogli doći u kontakt s nosnim predvorjem tijekom uzorkovanja. Isključeni su pacijenti s gnojom sekrecijom.

Uzorci za mikrobiološku analizu potom su bili dostavljeni u mikrobiološki laboratorij Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, KBC Osijek. Uzorci su bili inokulirani na različita standardna kruta i tekuća hranilišta te inkubirani u aerobnoj, anaerobnoj i atmosferi s 3 - 5 % CO₂.

Po inokulaciji, krvni agar (KA), kromogeni agar i srčano moždani bujon (engl. *Brain Heart Broth*; BHI) bio je inkubiran 24-48 h na 37 °C, a čokoladni agar (ČA) u atmosferi s 3 - 5 % CO₂. U anaerobnoj atmosferi kroz 5 dana na 37 °C bili su inkubirani uzorci inokulirani na Columbia agar, SNVS (engl. *Schaedler Neomycin Vancomycin Agar*) i tioglikoladni bujon.

Za mikološku analizu bio je inokuliran Sabouraudov agar (SAB) i Candida kromogeni agar (CAN) i inkubirani u aerobnoj atmosferi kroz 5 dana na 29 °C. Sterilna primarna hranilišta presijana su na bujonske kulture za aerobnu (krvni agar, kromogeni agar), anaerobnu (Columbia agar i SNVS) i kultivaciju u atmosferi s povišenim parcijalnim tlakom CO₂ (čokoladni agar-ČA). Identifikacija svih poraslih, morfološki različitih kolonija na krutim hranilištima izvršena je pomoću MALDI tof MS Biotypera, a za klinički značajne izolate učinjen je i test osjetljivosti.

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

Dijagnoza eozinofilnog kroničnog rinosinuitisa temelji se na zastupljenosti ≥ 10 % eozinofila u ukupnom leukocitnom infiltratu tkiva polipa. U svrhu potvrde nealergijskog KRS+NP-a pripreman je preparat sluznice srednje nosne školjke i polipa fiksiran u 5 % formalinu, potom uklopljeni u parafin te bojani hematoksilin-eozinom (HE), odnosno po

Gomoriju. Priprema preparata izvođena je u Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek. Udio eozinofila određen je prebrojavanjem ukupnih i eozinofilnih leukocita u vidnom polju pri povećanju od 400x, u najmanje 5 vidnih polja bogatijih eozinofilima na 5 nasumično odabranih rezova (preparta) (66).

4.3. Uzorkovanje tkiva sinonazalne sluznice i nosnog polipa

Uzorci tkiva srednje nosne školjke i nosnih polipa oboljelih od KRS+NP-a izuzeti su tijekom kirurškog liječenja primjenom FESS postupaka. Bioptat zdrave, kontrolne sinonazalne sluznice srednje nosne školjke osiguran je od dobrovoljnih ispitanika koji su bili kirurški liječeni povodom drugih rinoloških poteškoća (npr. septoplastika, rinoseptoplastika, sinusoskopija, orbitalne dekompresija).

Izuzeti uzorci tkiva bili su kratkotrajno pohranjeni u transportni medij (DMEM sa stabilnim glutaminom, 10 % FBS, 10 mM HEPES, 1 % penicilin/Streptavidin, 1mM Napiruvat, 1xneesencijalne aminokiseline) sve do trenutka daljnje obrade u Laboratoriju za analizu DNA Medicinskog fakulteta u Osijeku.



Slika 4. Endoskopska slika KRS+NP-a (vlastiti izvor)

4.4. Izolacija i kriokonzervacija ukupnih tkivnih leukocita

Svježi uzorci bioptata usitnjeni su maceracijom tkiva u transportnom mediju i zatim inkubirani na rotatoru (LabRoller™ H5100), 30 min na 37 °C pri brzini od 50 rpm/min. Suspenzija usitnjenog tkiva u nastavku će se dodatno homogenizirati pomoću *gentleMACS Dissociator* uređaja (Milteny Biotec, Auburn, SAD) i profiltrirati preko filtera promjera 70 µm kako bi se oslobođene stanice odvojile od ostataka tkiva.

Populacija tkivnih mononuklearnih stanica izdvajana je od eritrocita i granulocita postupkom centrifugiranja (800 g, 25 min, 25 °C) u gradijentu gustoće Lymphoprep medija (Axis Shield, Oslo, Norveška), a brojnost vijabilnih mononukleara u konačnom izolatu utvrđen je brojanjem pomoću Bürker-Türk komorice i svjetlosnog mikroskopa.

Ovisno o brojnosti izoliranih stanica, pripremljeno je pa potom smrznuto (-80 °C) nekoliko alikvota koncentracije 1×10^6 st/mL, miješanjem 0,5 ml hladnog fetalnog goveđeg seruma (FBS, Biosera, Francuska), s jednakim volumenom ohlađenog medija za smrzavanje (FBS + 20 % dimetil sulfoksid – DMSO, AppliChem). Dio pohranjenih alikvota korišten je kasnije za obilježavanje monoklonalnim protutijelima i nastavnu analizu na protočnom citometru, a ostatak za izolaciju RNA.



Slika 5. Izolacija i kriokonzervacija ukupnih tkivnih leukocita (vlastiti izvor)

4.5. Imunofenotipizacija $\gamma\delta$ T limfocita metodom protočne citometrije

Zastupljenost ukupnih $\gamma\delta$ T-limfocita i njihovih subpopulacija (V δ 1+V δ 2-, V δ 1-V δ 2+, V δ 1-V δ 2-) 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 upotrijebili su se standardni protokoli dostupni na poveznici: <http://www.thermofisher.com>.

Protočna citometrija (engl. *flow cytometry*, također poznata kao *flow cytofluorometry* ili *flow microfluorometry*) sofisticirana je analitička metoda koja omogućava višedimenzionalnu kvantitativnu i kvalitativnu analizu stanica, kao i sortiranje stanica s unaprijed definiranim karakteristikama iz ispitivanog uzorka. Ova tehnika omogućuje analizu ključnih fizikalnih (npr. veličina stanice, unutarstanična struktura, stupanj granularnosti) i kemijskih svojstava stanica (npr. prisutnost ili odsutnost površinskih, unutarstaničnih i nuklearnih proteina, količina deoksiribonukleinske kiseline (DNK) te koncentracija kalcija).

Uređaj za protočnu citometriju sastoji se od tri ključna sustava: (a) sustava za protok stanica (engl. *fluidics*), (b) optičkog sustava (laseri, leće i fotodetektor) te (c) elektroničkog sustava. Prije same analize, stanice se pripremaju u suspenziji, kako bi se omogućio protok pojedinačnih stanica tijekom mjerenja. Najčešći mehanizam za postizanje usmjerenog toka stanica hidrodinamičko je usmjeravanje (engl. *hydrodynamic focusing*), pri čemu se stanice pojedinačno kreću kroz sustav protoka stanica i bivaju osvijetljene laserskim zrakama specifičnih valnih duljina. Ovisno o fizikalnim karakteristikama stanica dolazi do disperzije svjetlosti, a u slučaju vezanja specifičnih protutijela obilježenih fluorokromima i do emisije fluorescencije određene valne duljine. Reflektirana polikromatska svjetlost kroz sustav se filtera i dihotomnih stakalaca usmjerava na fotodetektore, koji bilježe fotone i pretvaraju ih u elektroničke signale, odnosno pulseve napona. U suvremenim uređajima, ti se analogni podaci pretvaraju u digitalne, omogućavajući detaljnu analizu rezultata.

Fotodetektor dijele se u tri glavne vrste: FSC-detektor (engl. *Forward Scatter*) koji pruža informacije o veličini stanice, SSC-detektor (engl. *Side Scatter*) koji mjeri kompleksnost stanične citoplazme, uključujući stupanj granularnosti te FL-detektor (engl. *Fluorescence Detectors*) koji detektiraju fluorescentni signal specifične valne duljine, potekao od fluorokroma vezanih na protutijela za kemijsku analizu stanica. Ovisno o karakteristikama koje su zabilježene fotodetektorima (veličina stanica, stupanj granularnosti, kemijski sastav), moguće je odabrati specifičnu populaciju stanica za daljnju analizu. Rezultati analize mogu

biti prikazani numerički ili grafički, kao histogram fluorescencije ili točkasti prikaz (engl. *dot plot*).

4.5.1. Izrada kompenzacijske matrice

Najčešće korišteni fluorokromi u protočnoj citometriji emitiraju polikromatsku svjetlost širokog raspona valnih duljina. Veći dio tog spektra filtrira se i usmjerava na odgovarajući FL detektor, no zbog širokog raspona valnih duljina nekih fluorokroma, mali dio svjetlosti može dospjeti i u susjedne FL detektore. Prije početka analize, ključno je izraditi kompenzacijsku matricu pomoću jednobojnih kontrola (engl. *single stain controls*), što omogućava pravilnu interpretaciju podataka. Kompenzacija se odnosi na ispravak signala u susjednim detektorima tako da se od staničnih signala koji potječu od primarnog fluorokroma oduzima udio signala koji je nepoželjno prenesen. Ove kompenzacije specifične su za kombinaciju napona u detektorima korištenim tijekom mjerenja.

4.5.2. Isključivanje nevijabilnih stanica iz analize

Nevijabilne (mrtve) stanice isključene su korištenjem komercijalnog kita za određivanje vijabilnosti stanica (*LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. *LIVE/DEAD* komercijalni kit koristi princip razlike u intenzitetu fluorescencije, koja je više od 50 puta veća kod mrtvih u usporedbi sa živim stanicama. Boja u kit-u ima afinitet prema slobodnim aminima na površini i unutar stanice. Zbog povećane permeabilnosti stanične membrane u oštećenim i mrtvim stanicama, boja lakše prodire u unutrašnjost stanice i veže se za slobodne amine, dok se kod živih, vijabilnih stanica kovalentno veže samo za amine stanične membrane, čime se omogućuje vizualizacija mrtvih stanica kroz izraženije fluorescentno obojenje.

4.5.3. Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela i imunofenotipizacija PBMC stanica

Imunološke stanice, poput B-limfocita i fagocita (monociti i granulociti), posjeduju receptore za Fc segment imunoglobulina (FcR) na svojoj površini, što im omogućuje prepoznavanje opsoniziranih mikroorganizama. Tijekom obilježavanja stanica specifičnim protutijelima za analizu na protočnom citometru može doći do nespecifičnog vezanja protutijela za Fc receptore, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Da bi se spriječilo nespecifično bojenje uzrokovano vezanjem protutijela za FcR, dodan je 5 μ L reagensa *Human TruStain FcX™* (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon 8 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorcima su dodana specifična fluorescentno obilježena protutijela: CD3 ϵ FITC (klon UCHT1 gamma, donacija prof. Peter Balogh, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu), TCR $\gamma\delta$ PE-Cy7 (1:100, klon B1, BioLegend), TCRV δ 1 APC (1:100, klon TS8.2, eBiosciences) i TCRV δ 2 PerCP/CY5.5 (1:200, klon B6, BioLegend). Svi koraci provedeni su u fosfatnom puferu (PBS) s dodatkom 0,5 - 1 % goveđeg serumskog albumina (BSA) i 0,1 % natrijevog azida (NaN₃) prilagođenom pH vrijednosti (pH ~7,4). Kompenzacijska matrica izračunata je pomoću komercijalno dostupnih kompenzacijskih kuglica BD™ CompBeads mišji Ig κ /negativne kontrol (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i jednobojnih kontrola.

Mjerenja uzoraka provedena su na BD FACSLytic™ protočnom citometru (Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD) opremljenom trima laserima (plavi Argon 488 nm, crveni HeNe 633 nm i ljubičasti 403 nm). Podaci su analizirani i vizualizirani pomoću programa *FlowLogic* (v 11.0; Inivai Technologies; Mentone, Australija).

4.6. Izolacija ukupne RNA iz mononuklearnih stanica

Ukupna RNA izolirana je iz mononuklearnih stanica korištenjem komercijalnog kompleta *Direct-zol™ RNA Microprep* (Zymo Research, Irvine, CA, SAD). Proveden je protokol preporučen od strane proizvođača, koji je dostupan na mrežnoj stranici *Zymo Research* (<https://www.zymoresearch.com/collections/direct-zol-rna-kits/products/direct-zol-rnamicroprep-kits>).

4.7. Kvantitativna analiza transkriptoma mononuklearnih stanica

Analiza transkriptoma izoliranih mononuklearnih stanica iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa provedena je u Laboratoriju za analizu DNA Medicinskog fakulteta u Osijeku. U prvom koraku, izolirani uzorci RNA prevedeni su u cDNA korištenjem reverzne transkripcije s komercijalnim kompletom *PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit* (Takara, Japan). Sintezni cDNA amplificiran je uz pomoć predizajniranih TaqMan proba i kompletirane smjese PCR reagensa (*Universal TaqMan PCR Mastermix*) koristeći qPCR metodu na uređaju *QuantStudio 5* (Applied Biosystems, SAD). Relativni ekspresijski profili ispitivanih gena određeni su u odnosu na ekspresiju prethodno validiranog referentnog gena TBP koristeći metodu $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.8. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)

Sinteza cDNA uključuje prepisivanje mRNA u komplementarne cDNA molekule pomoću odgovarajućih oligonukleotidnih početnica i enzima reverzne transkriptaze (RT). Brojnost dobivenih cDNA kopija u uzorcima može se odrediti metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR). Postupak sinteze cDNA izveden je korištenjem komercijalnog kompleta *PrimeScript™ RT Reagent* (Takara Bio, SAD) prema uputama proizvođača.

POSTUPAK: Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadržavala je:

- 4 µl PrimeScript™ pufera
- 3 µl nefiltrirane vode (NFW)
- 1 µl oligo-dT početnica
- 1 µl nasumičnih heksamernih oligonukleotida (5 µM)
- 1 µl enzimske smjese PrimeScript™ RT
- 10 µl ukupne RNA radne koncentracije 1 ng/µL.

Nakon pripreme reakcijske smjese, uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C, nakon čega je reakcija reverzne transkripcije zaustavljena zagrijavanjem 5 sekundi na 85 °C. Dobivena cDNA razrijeđena je 5 puta na ukupni volumen od 100 µl. Uzorci su alikvotirani i pohranjeni na -20 °C do trenutka upotrebe.

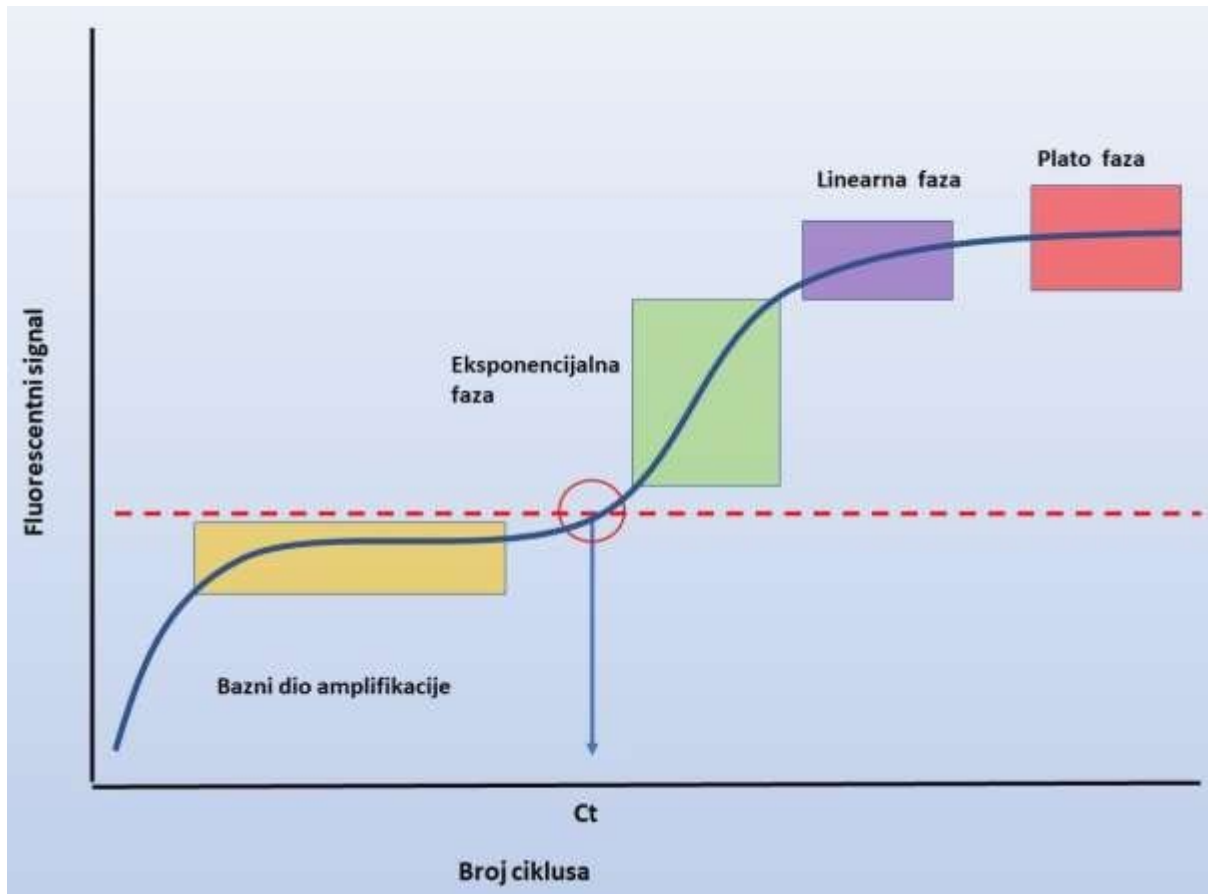


Slika 6. Izolacija ukupne RNA iz izoliranih mononuklearnih stanica

4.9. 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 mononuklearnih stanica iz sinonazalne sluznice i nosnog polipa provedena je u Laboratoriju za analizu DNA Medicinskog fakulteta u Osijeku. Sintezni cDNA amplificiran je korištenjem predizajniranih TaqMan proba i kompletnog PCR reagensa (*Universal TaqMan PCR Mastermix*) metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) na uređaju *QuantStudio 5* (Applied Biosystems, SAD). Relativni ekspresijski profili ispitivanih gena utvrđeni su u odnosu na ekspresiju prethodno validiranog referentnog gena ACTB1 primjenom metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Metoda qPCR precizna je i pouzdana tehnika za kvantifikaciju DNA segmenta od interesa. Ciljni dio DNA molekula koji se želi amplificirati određuje se korištenjem kratkih oligonukleotidnih sekvenci – primerima, koji su komplementarni krajevima željenog DNA fragmenta. Ovi primeri pokreću seriju reakcija u prisutnosti enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac, pri čemu veličina sintetiziranog dijela DNA molekula odgovara dužini omeđenoj izabranim primerima. 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 u fluorescenciji moguće je pratiti u obliku amplifikacijske krivulje (Slika 10.).



Slika 7. Krivulja amplifikacije isječka DNA. Izvor: (Rutledge RG, 2003)

4.9.1. Analiza amplifikacijske krivulje

Bazni dio amplifikacijske krivulje prikazuje razinu fluorescencije na početku PCR reakcije (otprilike 0 - 18 ciklusa), kada fluorescencija nastalih DNA produkata ne nadmašuje pozadinsku fluorescenciju. Intenzitet fluorescentnog signala naglo raste u eksplozivnoj fazi, kada se broj DNA kopija udvostručuje u svakom ciklusu PCR. U linearnoj fazi amplifikacija se usporava zbog iscrpljivanja jednog ili više sastojaka smjese reagensa, a na kraju reakcija staje, pri čemu fluorescencijski signal doseže fazu platoa.

Eksplozivna faza koristi se za kvantifikaciju fluorescencijskog signala u ispitivanim uzorcima. Vrijednost ciklusa PCR u kojem fluorescencijski signal prelazi prag fluorescencije definira se kao granični ciklus ili Ct vrijednost (engl. *threshold cycle*; *Ct* / *Cq quantification cycle*). Fluorescentni signal raste proporcionalno početnoj količini kopija DNA u uzorku. Usporedbom vrijednosti Ct između uzoraka moguće je kvantificirati razlike u početnoj količini DNA materijala.

4.9.2. Kvantifikacija DNA: apsolutna i relativna metoda

Za analizu razlika u količini DNA mogu se koristiti metode apsolutne ili relativne kvantifikacije. Apsolutna kvantifikacija uključuje usporedbu vrijednosti Ct u nepoznatim uzorcima s vrijednostima Ct standardnih uzoraka poznate koncentracije ciljnih molekula DNA/RNA. U nedostatku apsolutnih standardnih uzoraka, provodi se relativna kvantifikacija usporedbom Ct vrijednosti ciljnih gena s Ct vrijednostima referentnih ili „housekeeping“ gena. Razlika u količini između normaliziranih Ct vrijednosti (engl. *fold difference* ili *fold change*) u uzorcima različitog podrijetla ili fenotipskog statusa može se procijeniti primjenom metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ prema Livaku i suradnicima (Livak KJ, 2001).

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

4.9.3. Priprema standardnih krivulja

Standardne krivulje ciljnih i referentnih gena pripremljene su analizom RT-qPCR-a na temelju 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 analizirani korištenjem računalnog programa *QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1*.



Slika 8. Amplifikacija ciljnih i referentnih gena (vlastiti izvor)

4.9.4. Postupak pripreme standardne krivulje

Za pripremu standardne krivulje korišteno je 6 uzoraka RNA radne koncentracije 7 ng/ μ l. Reverzna transkripcija izvedena je u ukupnom volumenu od 20 μ l prema prethodno opisanim protokolima u potpoglavlju „Sinteza komplementarne DNA“. Dobivena cDNA pomiješana je u jedinstveni uzorak volumena 72 μ l, koji je potom razrijeđen dodavanjem 216 μ l RNase free H₂O, čime je postignut ukupni volumen od 288 μ l. U sljedećem koraku pripremljeno je 5 serijskih razrjeđenja, pri čemu je svaki uzorak razrijeđen 4 puta u odnosu na prethodni. Standardi poznate koncentracije alikvotirani su i pohranjeni na -20 °C do trenutka upotrebe.

4.9.5. Analiza ekspresije mRNA

Razina mRNA ekspresije ciljnih gena (TRDV1, TRDV2, IFNG, ZBTB16, IL-17A, RORC, TBX21) i referentnog gena (ACTB1) određena je metodom RT-qPCR korištenjem fluorescentno obilježenih TaqMan oligonukleotidnih proba na uređaju *QuantStudio 5 PCR* (Applied Biosystems, SAD). U TaqMan probama, fluorofor je kovalentno vezan na 5' kraju probe, dok je molekularni prigušivač (engl. *Q-quencher*) vezan na 3' kraju. Tijekom sinteze

novog DNA lanca, djelovanjem enzima Taq polimeraze, dolazi do cijepanja probe TaqMan, što uzrokuje razdvajanje fluorofora i prigušivača te emisiju i detekciju fluorescentnog zračenja na kraju svakog PCR ciklusa.

4.9.6. Postupak analize

Temperaturni uvjeti i raspored pipetiranja uzoraka i standarda dizajnirani su u računalnom programu *QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1*. Za pripremu reakcijske smjese ukupnog volumena 10 µl korišteno je 5 µl komercijalnog kompleta *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), 0,5 µl odgovarajuće *TaqMan Expression* probe i 4,5 µl cDNA. Pripremljena reakcijska smjesa pažljivo je pipetirana u mikrotitarske jažice PCR ploče, koja je zatim prekrivena prozirnom plastičnom folijom i centrifugirana 1 minutu pri brzini od 3000 rpm na 24 °C. Amplifikacija ciljnih i referentnih gena provedena je u duplikatu prema unaprijed definiranim temperaturnim uvjetima (vidi Tablica 3a. i Tablica 3b.). Standardi su uključeni u sve pokuse qPCR i također su mjereni u duplikatu.

Tablica 3a. Program za qRT-PCR i Popis TaqMan proba i veličina DNA odsječaka

Izvor: Thermo Fisher, 2023.

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

Tablica 3b. 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_002190.2	Hs00174383_m1	IL-17A	S(250 rxn)	80
<i>Nastavak tablice 3. sa stranice 30</i>				
NM_000619.2	Hs00989291_m1	IFNG	S(250 rxn)	73
NM_013351.1	Hs00894392_m1	TBX21	S(250 rxn)	119
NM_001001523.1	Hs01076112_m1	RORC	S(250 rxn)	62
NM_00108011.1	Hs00232313_m1	ZBTB16	S(250 rxn)	67
Sljed nukleotida početnice i probe				
X06557.1	APGZPMN	TRDV1	(360 rxn)	212
X53849.1	APH6H7K	TRDV2	(360 rxn)	383
X13953.1	APNKZIG	TRDV3	(360 rxn)	393

4.9.7. Kvantifikacija genske ekspresije metodom 2- $\Delta\Delta C_t$

Relativna kvantifikacija genske ekspresije provedena je korištenjem metode 2- $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001), a rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel. Mjerenja ciljnih i referentnih gena izvedena su u duplikatu, a najprije su izračunate srednje C_t vrijednosti. Srednje C_t vrijednosti ciljnih gena u uzorcima polipa i srednje nosne školjke (SNŠ) normalizirane su u odnosu na srednje C_t vrijednosti referentnog gena ACTB1, prema sljedećim formulama:

- $\Delta C_t \text{ KRS (polip)} = C_t \text{ ciljni gen} - C_t \text{ referentni gen}$
- $\Delta C_t \text{ KRS (SNŠ)} = C_t \text{ ciljni gen} - C_t \text{ referentni gen}$
- $\Delta C_t \text{ kontrola (SNŠ)} = C_t \text{ ciljni gen} - C_t \text{ referentni gen}$

Za izračun $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti, normalizirane ΔC_t vrijednosti uzoraka oduzimaju se od ΔC_t vrijednosti kalibratora prema sljedećoj formuli:

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

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

Na kraju, veličina razlike (engl. *fold difference*) normaliziranih razina genske ekspresije u uzorcima PV i CTRL određena je pomoću formule:

- $Fc = 2^{-\Delta\Delta CT}$

4.10. Statističke metode

Deskriptivna analiza

Kategorijski podaci opisani su apsolutnim (N) i relativnim frekvencijama (%). Omjerni podaci opisani su medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Normalnost distribucije omjernih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom.

Razlike omjernih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim testom, a za 3 i više neovisnih skupina Kruskal-Wallis testom. U potonjem slučaju, za post-hoc usporedbe korišten je Conover test (PMCMRplus knjižnica). Tablice kontingencije analizirane su Fisherovim egzaktnim testom s Freeman-Halton ekstenzijom za tablice višeg reda.

Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je neparametrijskim Spearmanovim koeficijentom korelacije rangova (ρ). Sve P vrijednosti dvostrane su uz prag značajnosti $P < 0.05$ ako nije drugačije naznačeno.

Ternarni dijagrami izrađeni su u Ternary knjižnici. Sva obrada učinjena je u R4.3.1 programu (RStudio sučelje, <https://www.R-project.org>).

Redukcija podataka

Citometrijski podaci analizirani su u izvornom obliku. U genskoj ekspresiji korišten je $\log_2$ omjera izražaja, osim za TRDV1 gen, za koji je provedena inverzna normalna transformacija rangova (INRT, rankNormal funkcija u RNOomni paketu, *Bloom offset* 3/8). Za serumski IgE, korišten je $\log(\text{IgE})$. Za Lund-Mackay CT zbroj, provedena je ekviparticipija uzorka koristeći medijan zbroja u oboljelih ispitanika (<12 , ograničena bolest=l, vs. ≥ 12 , proširena bolest=h).

Generalizirani linearni model (genska ekspresija)

Generalni linearni mješoviti model (GLMM) korišten je za fiksne i ugniježdene prediktore, odnosno za ponavljana mjerenja genske ekspresije (Y_i) u različitim sijelima istih ispitanika.

S obzirom na veličinu uzorka, modelirani su prvenstveno glavni efekti, sa slobodnim članom (odsječkom) koji se razlikuje od ispitanika do ispitanika (ID_i):

Za procjenu parametara korištena je lme4 i lmerTest knjižnica (lmer rutina). Prikazani su samo modeli koji su uspješno konvergirali. U pravilu, poredbenu skupinu činile su kontrole. Globalni značaj procijenjen je analizom varijance (ANOVA, F-statistika, suma kvadrata tipa III, Satterthwaiteovmetoda, lmerModLmerTest funkcija) i parametrijskim bootstrap testom (PBmodcomp funkcija u pbkrtest paketu, 1000 iteracija). Za sve konstruirane modele, detalji su dostupni u legendama tablica i grafova.

Za višerazinske faktore u poredbene svrhe prikazane su i post-hoc P-vrijednosti za broj parnih kontrasta u omnibus testu (Tukey metoda, emmeans knjižnica).

Za grafički prikaz marginalnih učinaka korišteni su sjPlot, marginaeffects, effects i jtools paketi. Za sve modele provedena je dijagnostika, uključujući procjenu inflacije varijance, inspekciju kvantilnih (q-q) krivulja, inspekciju linearnosti te kontrolu normalnosti i homogenosti reziduala (performance paket). Grafički prikazi temelje se na ggplot2, ggdist, corplot i RColorBrewer knjižnici. Svi kodovi potrebni za reprodukciju slika i rezultata raspoloživi su na opravdan zahtjev.

Za breme bolesti (SNOT/JESREC upitnici) i faktorske kovarijate (Lund-Mackay l/h particija, Malm gradacija, prisustvo eozinofila u obrisku nosa), korištena je analiza kovarijance na združenom uzorku dvije najveće skupine neovisnih opažanja (polipi oboljelih i kontrole, p+c).

Takav pristup motiviran je prvenstveno ograničenim brojem uzoraka, osobito u SNŠ skupini, što zahtijeva ekonomizaciju broja slobodnih parametara u modelu. Za procjenu parametara korištena je lme4 knjižnica (glm funkcija, F-statistika). Radi preglednosti, neznačajni su modeli izostavljeni iz prikaza, ali su dostupni na razuman zahtjev.

Bayesovo modeliranje (protočna citometrija)

Za stanične subpopulacije čije su proporcije (x) vezane sumom korištena je Dirichletova regresija u Bayesovoj formulaciji. Tipičan su primjer relativne frekvencije

V δ 1+V δ 2- (D1), V δ 1-V δ 2+ (D2) i V δ 1-V δ 2- (DN) frakcija unutar roditeljske populacije gdT stanica.

Modeliranje je provedeno zasebno za dva sijela (p+c, sns+c), a takav pristup motiviran je kompromisom između veličine uzorka i broja slobodnih parametara u konačnom modelu. Za najjednostavniji multivarijatni linearni model, procjena parametara učinjena je u brms paketu, (D1,D2,DN) ~ Sijelo+Spol+Dob, seed = 1234, iter = 1000, chains = 4, cores = 4, family = "dirichlet") koristeći neinformativne, unifomne apriorne distribucije za regresijske koeficijente, gama distribuciju (0.01, 0.01) za preciznost (ϕ) i Student_t distribuciju (3,0,2.5) za D2 i DN odsječke (intercept). Za referentnu kategoriju, odabrana je D1 subpopulacija.

Procjena parametara ponovljena je koristeći alternativne apriorne distribucije, poput informativnih uniformnih, Cauchy i normalnih distribucija N(0,2.5), uz minimalni učinak na konačne vrijednosti parametara (druga i treća decimala). Prikazani rezultati zbog toga se odnose na neinformativne apriorne distribucije.

Umjesto sijela, kao prediktor korištena je i eozinofilija, proširenost bolesti (Lund-Mackay CT zbroj na ordinalnoj ljestvici) i endoskopski Malm gradus.

Za preostale stanične vrste (s), korištena je (s, 1-s) formulacija (Dirichletova varijabla; limfociti, T stanice i udjel gdT stanica u roditeljskim populacijama). Izbor parametrizacije u ovom slučaju ne utječe bitno na konačni rezultat. Naime, modeli s izoliranim Gaussovim ovisnim varijablama daju podudarne procjene (podaci nisu prikazani).

Za generiranje slučajnih uzoraka korištena su četiri Monte Carlo Markovljeva lanca (MCMC) s 500 koraka zagrijavanja (burn-in) i 2000 koraka nakon toga (*total post-warmup draws* = 2000). Efektivne veličine uzoraka bile su uvijek >1000, redovito >2000, uz potvrdu kovergencije numerički ($R_{hat}=1-1.01$) i vizualno (*trace plot*). Divergentne tranzicije nisu zapažene. Upotreba 2000 iteracija po lancu nije promijenila rezultat. Aposteriori distribucija parametra s procijenjenom gustoćom vizualizirana je grafički, i prikazana srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom i dvostranim 95 % intervalom vjerodostojnosti (*credible interval*). Značajan učinak definiran je striktno-pozitivnim ili striktno-negativnim 95 % CI (95 % CI isključuje 0). Za posteriornu predikciju kontrasta korištena je *marginal effects*

knjižnica (`avg_comparisons`, medijan s 95 % CI), a vizualizacija posteriornih predikcija učinjena je uporabom `conditional_effects` funkcije.

Testovi podudarnosti (ICC)

Za procjenu sličnosti rezultata u parnim uzorcima iz dvije lokacije (SNŠ+p) istog ispitanika, korišten je ICC2 (*intraclass correlation coefficient*, *psych* knjižnica, Shrout i Fleiss nomenklatura).

Sekvenciranje jednostanične RNK (scRNASeq)

Javno dostupni podatci sekvenciranja jednostanične RNK (scRNASeq) nosne sluznice čovjeka preuzeti su iz GEO (*Gene Expression Omnibus*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), *Single Cell Portal* (SCP253 studija, *Broad Institute*, Cambridge, Massachusetts, SAD) i UCSC portala (*Nasal Lifespan* studija, <http://genome.ucsc.edu/>, CC-BY 4.0 licence).

Za vizualizaciju podataka korištene su `DimPlot` i `FeaturePlot` funkcije *Seurat v5.0.0* programa (satijalab.org/seurat) u UMAP reprezentaciji (*Uniform Manifold Approximation Projection*), odnosno *Nebulosa/viridis* knjižnica.

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

PERMANOVA

Permutacijska ANOVA neparametrijska je ekstenzija multivarijatne analize varijance za matricu parnih udaljenosti. Za mikrobiom je korištena Jaccardova udaljenost, nefilogenetska mjera različitosti, i to u binarnoj varijanti (prisustvo-odsustvo). Za omjerne varijable korištena je Bray-Curtis udaljenost. Testiranje značajnosti i proračun pseudo-F omjera počiva na 1000 permutacija (`adonis2` funkcija, *vegan* paket). Slični rezultati dobiveni su i upotrebom linearnog dekompozicijskog modela (LDM-A rutina, `ldm` funkcija, *LDM* paket, podaci nisu prikazani).

5. REZULTATI

5.1. imunofenotipizacija mononuklearnih stanica izoliranih iz tkiva nosnih polipa i sluznice nosa

U citometrijskoj analizi korišteni su tkivni uzorci 10 kontrolnih i 21 oboljelog ispitanika. Dvije se grupe značajno razlikuju po spolu: među kontrolama, većina ispitanika su žene, a među oboljelima muškarci (Tablica 4.). Kontrolni ispitanici nešto su mlađi od oboljelih (Tablica 4.), poglavito na račun niže dobi ženskih ispitanika [medijan 39 (26-49) vs. 54 (39- 65) g., $\check{Z}$ vs. M, Mann-Whitney $P=0,062$]. U pojedinim upitnicima (SNOT22, *Nose.score*), oboljeli ispitanici razlikuju se značajno nižom kvalitetom života, no nema razlike u analiziranim biološkim obilježjima (IgE, CRP, prevalencija atopijske dijateze) u usporedbi s kontrolama.

Tablica 4. Klinička i demografska obilježja ispitanika, protočna citometrija (medijan, [interkvartilni raspon])

Obilježje	Kontrole (N=10)	KRSsNP (N=21)	P
Dob (god) [Min, Max]	40 [30, 50] [20, 50]	50 [40, 70] [20, 80]	0.057 ⁺
Spol			
Ženski	7 (70,0%)	5 (23,8%)	0.021*
Muški	3 (30,0%)	16 (76,2%)	
SNOT22 [Min, Max]	30 [20, 40] [0, 90]	40 [30, 60] [1, 80]	0.183 ⁺
SNOT20 [Min, Max]	10 [2, 20] [0, 50]	40 [20, 50] [0, 70]	0.0059⁺
Japan [Min, Max]	10 [5, 30] [2, 60]	20 [10, 50] [2, 60]	0.099 ⁺
Nose.score [Min, Max]	7 [5, 10] [3, 20]	20 [10, 20] [0, 20]	0.0036⁺
Lund-Mackay [Min, Max]	- -	10 [8, 20] [2, 20]	-
Malm			
0 (kontrola)	10 (100%)	0 (0%)	-
1	0 (0%)	3 (14,3%)	
2	0 (0%)	9 (42,9%)	
3	0 (0%)	9 (42,8%)	
IgE [Min, Max]	60 [30, 100] [20, 3000]	90 [40, 200] [20, 2000]	0.386 ⁺
Inhalacijski alergeni			
negativni	4 (40,0%)	15 (71,4%)	0.127*
pozitivni	6 (60,0%)	6 (28,6%)	
Nutritivni alergeni			
negativni	10 (100%)	17 (81,0%)	0.277*
pozitivni	0 (0%)	4 (19,0%)	
hsCRP (mg/dL) [Min, Max]	1 [0,7, 2] [0,4, 10]	2 [1, 3] [0,6, 6]	0.103 ⁺
Eozinofili u obrisku			
negativni	8 (80,0%)	14 (66,7%)	0.677*
pozitivni	2 (20,0%)	7 (33,3%)	
Analiza obriska bakteriološki			
Negativan	1(10%)	0(0%)	-
Pozitivan	9(90%)	21(100%)	
Fiziološka flora	1(11,1%)	7(33,3%)	0,778*
Patogena flora	8(88,9%)	14(66,6%)	

* Fisher exact test; ⁺ Mann-Whitney U test

Protočna citometrija uspješno je realizirana za 35 uzoraka oboljele nosne sluznice (19 polipa, 16 uzoraka SNS) s ukupno 14 parnih uzoraka oba sijela (Tablica 5.).

Tablica 5. Usporedba kliničkih i demografskih obilježja ispitanika po sijelu, protočna citometrija (medijan, [interkvartilni raspon])

Obilježje	kontrole (N=10)	p, KRSsNP (N=19)	sns, KRSsNP (N=16)
Dob	40 [30, 50]	50 [40, 60]	60 [40, 70]
[Min, Max]	[20, 50]	[20, 80]	[20, 70]
Spol			
Ženski	7 (70,0%)	5 (26,3%)	2 (12,5%)
Muški	3 (30,0%)	14 (73,7%)	14 (87,5%)
SNOT22	30 [20, 40]	40 [30, 60]	40 [30, 60]
[Min, Max]	[0, 90]	[1, 80]	[1, 80]
SNOT2	10 [2, 20]	40 [20, 50]	40 [30, 50]
[Min, Max]	[0, 50]	[0, 70]	[0, 70]
Japan	10 [5, 30]	20 [10, 50]	20 [20, 40]
[Min, Max]	[2, 60]	[2, 60]	[2, 60]
Nose.score	7 [5, 10]	20 [10, 20]	20 [10, 20]
[Min, Max]	[3, 20]	[0, 20]	[0, 20]
Lund-Mackay	-	10 [8, 20]	10 [8, 20]
[Min, Max]	-	[2, 20]	[2, 20]
Malm			
0 (kontrole)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
1	0 (0%)	3 (15,8%)	3 (18,8%)
2	0 (0%)	7 (36,8%)	7 (43,7%)
3	0 (0%)	9 (47,4%)	6 (37,5%)
IgE	60 [30, 100]	100 [40, 300]	60 [40, 200]
[Min, Max]	[20, 3000]	[20, 2000]	[20, 700]
Inhalacijski alergeni			
negativni	4 (40,0%)	13 (68,4%)	12 (75,0%)
pozitivni	6 (60,0%)	6 (31,6%)	4 (25,0%)
Nutritivni alergeni			
negativni	10 (100%)	16 (84,2%)	13 (81,3%)
pozitivni	0 (0%)	3 (15,8%)	3 (18,8%)
hsCRP	1 [0,7, 2]	2 [1, 3]	2 [2, 3]
[Min, Max]	[0,4, 10]	[0,6, 6]	[0,6, 6]
Eozinofili u obrisku			
negativni	8 (80,0%)	12 (63,2%)	13 (81,3%)
pozitivni	2 (20,0%)	7 (36,8%)	3 (18,8%)

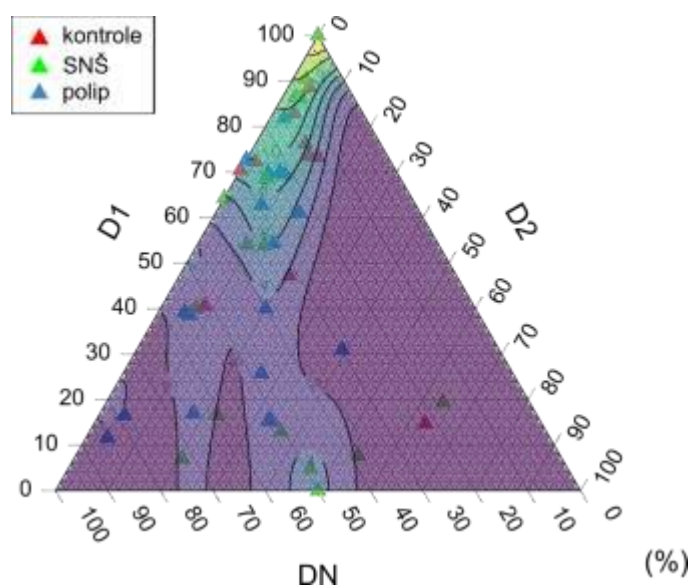
Rezultat citometrije po sijelima uzoraka pregledno je prikazan u Tablici 6.

Tablica 6. Razdioba staničnih frekvencija (sluznica nosa, protočna citometrija) po sijelima i statusu (medijan, [interkvartilni raspon])

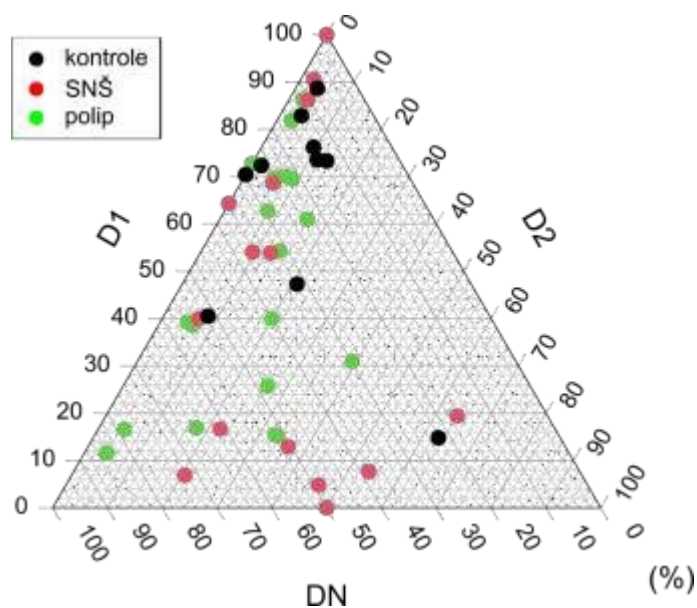
Stanice	kontrole (N=10)	p, KRSsNP (N=19)	sns, KRSsNP (N=16)
Ly (% Parent)	40 [30, 50]	40 [40, 60]	30 [20, 40]
[Min, Max]	[20, 70]	[10, 70]	[10, 70]
Ly (% Total)	30 [20, 40]	30 [20, 40]	20 [20, 30]
[Min, Max]	[20, 50]	[5, 60]	[8, 40]
T (%Parent)	40 [40, 50]	50 [30, 60]	30 [10, 50]
[Min, Max]	[6, 80]	[5, 80]	[6, 80]
T (% Total)	10 [8, 20]	10 [7, 20]	5 [4, 8]
[Min, Max]	[3, 30]	[2, 30]	[1, 20]
gd (% T)	4 [3, 8]	4 [3, 7]	4 [3, 6]
[Min, Max]	[2, 10]	[2, 20]	[0,9, 20]
gd (% ly)	0,5 [0,2, 1]	0,5 [0,3, 0,7]	0,3 [0,08, 0,4]
[Min, Max]	[0,09, 3]	[0,1, 2]	[0,03, 2]
D2 (% gd)	9 [4, 10]	8 [5, 20]	20 [5, 50]
[Min, Max]	[0, 60]	[0, 40]	[0, 60]
D1 (% gd)	70 [50, 80]	40 [20, 70]	30 [7, 70]
[Min, Max]	[10, 90]	[10, 90]	[0, 100]
DN (% gd)	20 [10, 30]	30 [20, 50]	40 [20, 50]
[Min, Max]	[7, 50]	[10, 80]	[0, 70]
D2 (% T)	0,3 [0,2, 0,5]	0,4 [0,2, 1]	0,5 [0,3, 1]
[Min, Max]	[0, 2]	[0, 3]	[0, 4]
D1 (% T)	2 [1, 6]	2 [0,8, 3]	1 [0,3, 3]
[Min, Max]	[0,5, 10]	[0,4, 10]	[0, 10]
DN (% T)	0,9 [0,6, 2]	2 [1, 3]	1 [0,9, 2]
[Min, Max]	[0,3, 2]	[0,4, 5]	[0, 6]
D2 (% ly)	0,04 [0,03, 0,05]	0,04 [0,02, 0,09]	0,02 [0,01, 0,08]
[Min, Max]	[0, 0,07]	[0, 0,3]	[0, 0,3]
D1 (% ly)	0,3 [0,1, 0,9]	0,1 [0,08, 0,4]	0,03 [0,02, 0,3]
[Min, Max]	[0,01, 2]	[0,05, 1]	[0, 1]
DN (% ly)	0,1 [0,04, 0,2]	0,2 [0,08, 0,3]	0,06 [0,03, 0,1]
[Min, Max]	[0,02, 0,7]	[0,05, 0,6]	[0, 0,5]

U nosnoj sluznici, udjel gd frakcije u T staničnoj populaciji odgovara redom veličine onom u krvnim gdT-stanicama. Sastav ovih tkivnih gd stanica, međutim, razlikuje se od krvne populacije gdT stanica, gdje prevladava Vδ2⁺ frakcija. U sastavu sluzničkih gdT stanica nosa, naprotiv, prevladavaju Vδ1⁺ stanice, a slijede ih Vδ1⁻ Vδ2⁻ (DN) stanice (Tablica 6., Slika 9.).

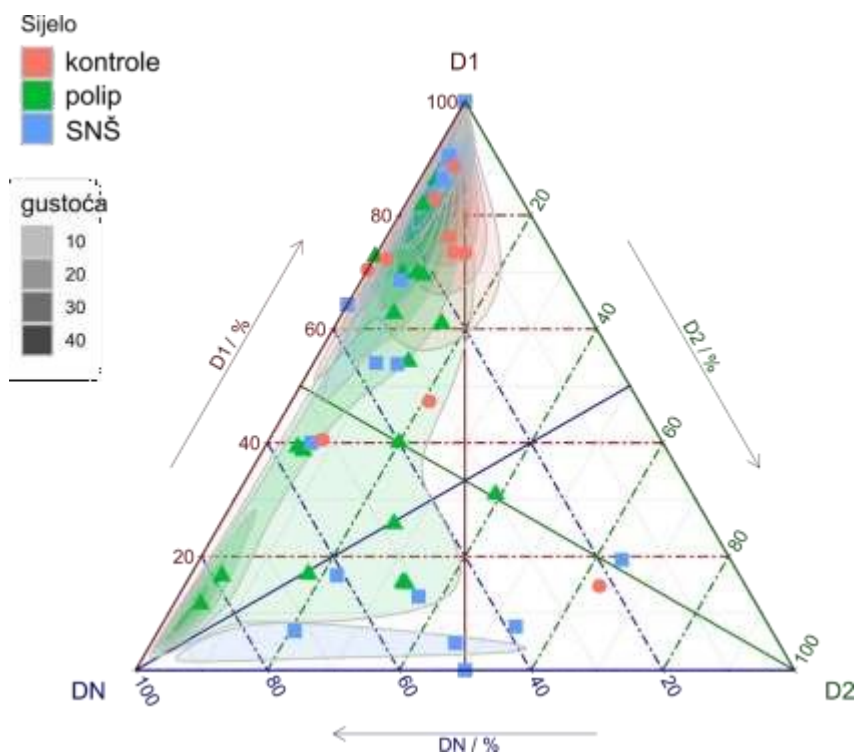
U ternarnim dijagramima sastava gdT stanica (Slika 10.) vidljivo je grupiranje kontrolnih uzoraka, i njihova separacija od polipa (Slika 10., Slika 11.), poglavito duž Vδ1 (D1) – DN osi (Slika 10.). Sastav gdT stanica SNŠ oboljelih znatno je varijabilniji i ukazuje na 2 podgrupe uzoraka (Slika 10.): jednu koja se sastavom gotovo ne razlikuje od kontrola, i drugu koja omeđuje krajnji suprotni pol spektra (Slika 11., izodenzne konture, plavo), i sastavom podsjeća na krvne gdT stanice ($V\delta 2^+ \sim DN > V\delta 1^+$). Nikakve demografske, biološke ni kliničke razlike nisu zapažene između ove dvije podgrupe SNŠ uzoraka, barem u analiziranim obilježjima.



Slika 9. Ternarni dijagram, sastav sluzničkih gdT stanica prema uporabi TRDV1 i TRDV2 lanaca (protočna citometrija). Konture i intenzitet podloge prate gustoću uzoraka (broj točaka u lokalnom prostoru)



Slika 10. Ternarni dijagram, sastav sluzničkih gdT stanica, razdioba uporabe TRDV1 i TRDV2 lanaca prema sijelu (protočna citometrija)



Slika 11. Ternarni dijagram, sastav sluzničkih gdT stanica nosa, razdioba uporabe TRDV1 i TRDV2 lanaca. Superponirane su izodenzne konture, zasebno za svako sijelo

S izuzetkom T stanica, nema bitnijih podudarnosti u staničnim frekvencijama dva sijela iste osobe (p vs. SNŠ, KRSsNP, Tablica 4.). S obzirom na razlike u prinosu tkiva između dva sijela [67 195 (22 150-165 978) vs. 21 440 (8 637-53 425) stanica, P vs. SNŠ, Mann-Whitney $P=0.046$], nejasno je radi li se o tehničkom ili biološkom obilježju.

Tablica 7. ICC2 (*intraclass*) koeficijenti, sličnost staničnih frekvencija u dva sijela, polip i sluznica SNŠ oboljelih (n=14)

Populacija	ICC2
ly (% P)	0,4
T (% ly)	0,8
gd (% T)	0,25
D1 (% gd)	0,59
D2 (% gd)	0,34
DN (% gd)	0,42

5.2. Sijelo, status i ostale kovarijate

S obzirom na nedostatak jasne razlike u staničnim frekvencijama između SNŠ i polipa (Tablica 6.), u uzorku ove statističke snage razlika SNŠ-p nije dalje analizirana. Zbog razlika u spolu i dobi između oboljelih i kontrolnih ispitanika (Tablica 4.) usvojen je multivarijantni model procjene parametara. Nakon Bayesovog modeliranja (Tablica 5., Slika 12.), korištene su posteriorne predikcije za vizualizaciju odnosa i interpretaciju rezultata.

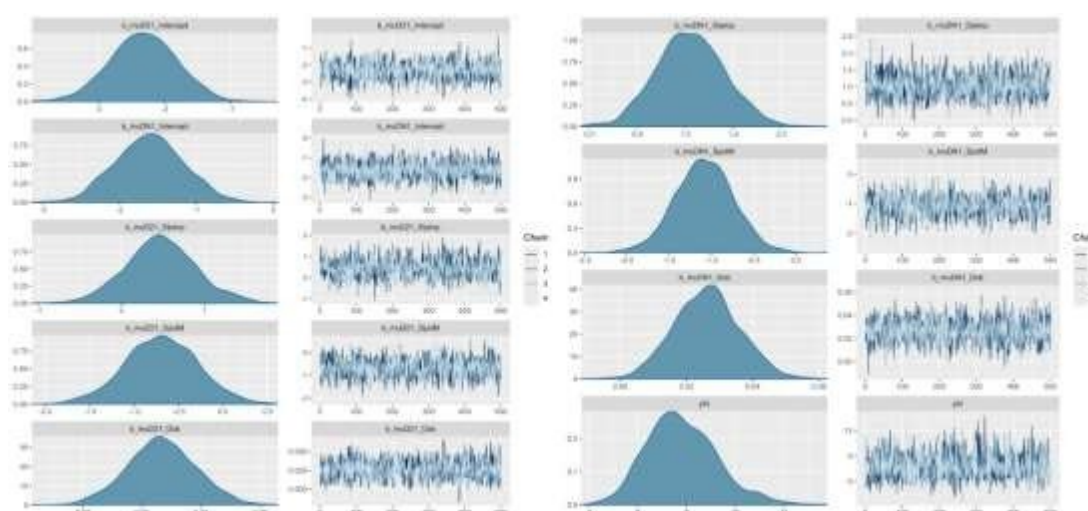
U usporedbi s uzorcima zdrave nosne sluznice, u polipima (ali ne i SNŠ) je značajna recipročna dinamika D1 i DN stanica (Tablica 9., Slika 13.), bez pomjene u ukupnom broju gdT i T-stanica. Značajan pad udjela D1 stanica u gdT frakciji praćen je značajnim porastom udjela DN stanica u sluznici polipa. Veličina ovih promjena dijelom je povezana s dobi i spolom: s porastom dobi, udjel D1 stanica u sluzničkoj gd frakciji značajno pada, a udjel DN stanica značajno raste. Također, muški spol povezan je sa značajno većim udjelom D1 stanica i značajno manjim udjelom DN stanica u usporedbi sa ženama.

Slična stanična dinamika (pad D1, porast DN frakcije među gdT stanicama) prisutna je i kod bolesnika s ograničenom i kod bolesnika s proširenom bolesti (za Malm gradus, podjednako 1+2 vs. 3), kao i duž cijelog raspona Lund-Mackay CT zbroja (Tablica 9., Slika 13.). U ovom posljednjem aspektu, izraženiji učinak zamijećen je kod bolesnika s najvišim

vrijednostima CT zbroja (≥ 12), poglavito za porast udjela DN stanica u gdT populaciji polipa.

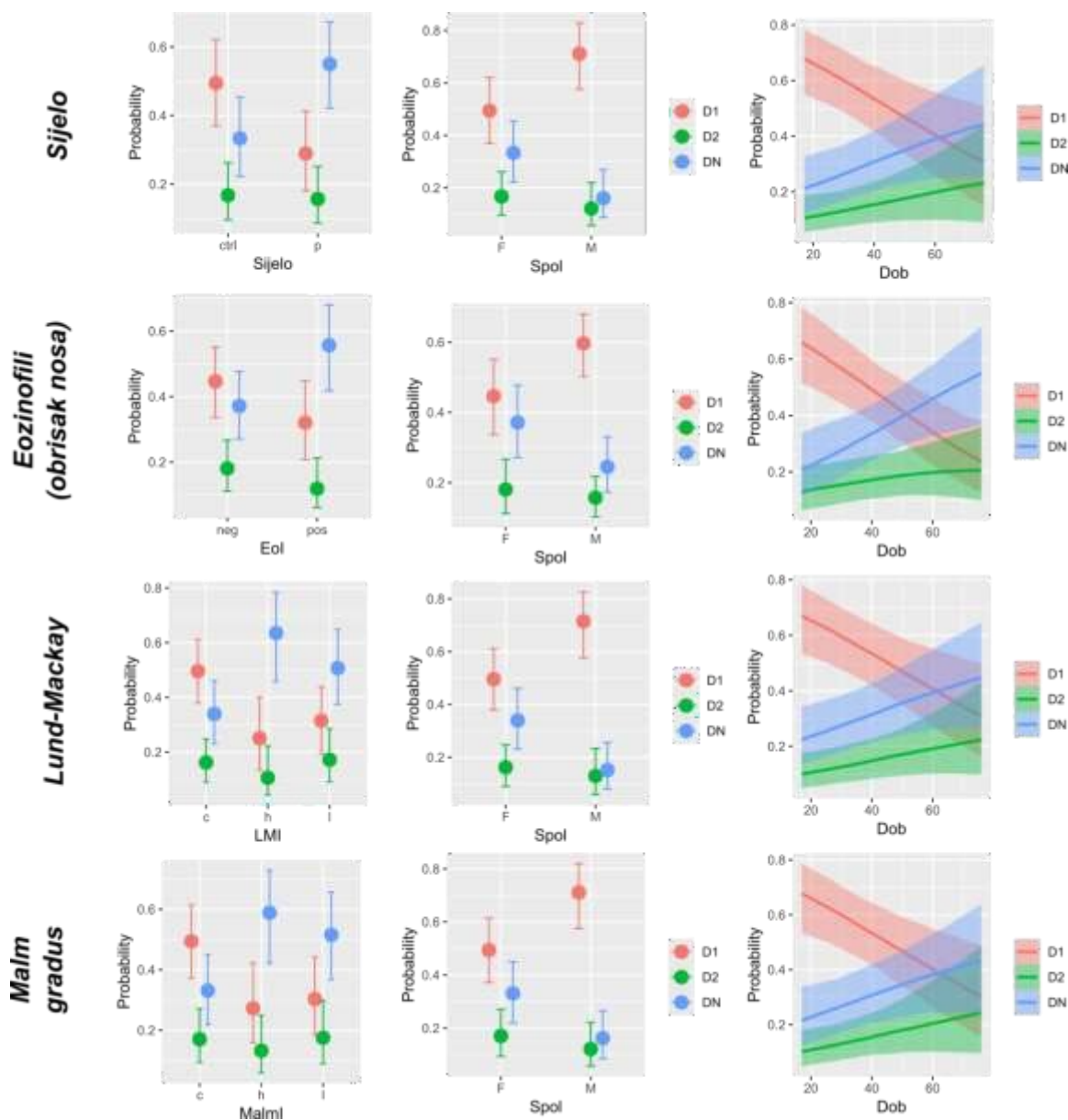
Za ostale kliničke prediktore prisustvo eozinofila u obrisku nosa prati značajno veći udjel DN stanica u gdT frakciji sluznice polipa (Tablica 9., Slika 13.). Nadalje, porast serumskog IgE povezan je s padom udjela D1 stanica u gd populaciji sluznice (Slika 14., Tablica 10.), u oba slučaja uz nepromijenjenu veličinu ukupnog gdT, T- i limfocitnog odjeljka. Robustnost dobni i spolnih razlika potvrđena je u svim spomenutim modelima, i perzistira neovisno o proširenosti bolesti i biološkim odlikama KRSsNP-a, poput prisustva ili odsustva eozinofilne komponente (Tablica 9.). Štoviše, značajan rezidualni učinak dobi perzistira za udio D1 stanica u T- i ukupnim limfocitima, unatoč diluciji gdT stanica preko 3 reda veličine (Tablica 11., polipi i SNŠ).

Za kvalitetu života nisu identificirani značajni učinci na D1-D2-DN podjelu u gd populaciji (podaci nisu prikazani). Isto vrijedi za limfocite, T-stanice i udjel gdT stanica u roditeljskim populacijama, za koje nisu pronađene robustne razlike po sijelu, spolu i dobi, ni u polipima ni kod SNŠ oboljelih.



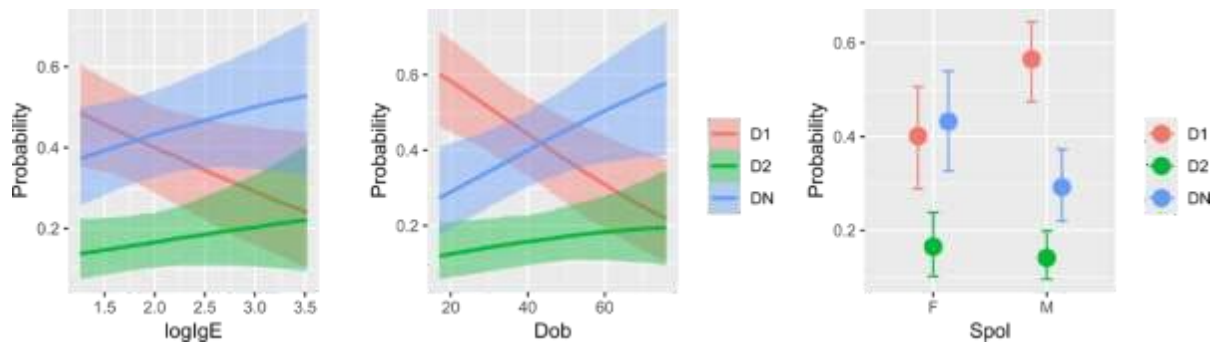
Slika 12. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole, T4). Populacijski i distribucijski parametri (*a posteriori*), *trace plots* za MCMC lance (4 lanca, 1000 iteracija/lanca). Refcat=D1, C

U usporedbi s uzorcima zdrave nosne sluznice, u sluznici SNŠ-a nisu zabilježeni značajni učinci sijela (Slika 15., Tablica 12.), proširenosti bolesti, eozinofila u obrisku, IgE i kvalitete života na D1-D2-DN podjelu u gd populaciji. U sluznici SNŠ-a, značajan učinak dobi jasnije je vidljiv u udjelu D1 stanica u ukupnoj T-staničnoj i limfocitnoj populaciji, koji opada s porastom dobi, slično kao i u polipima (Tablica 11.). Učinak spola kod SNŠ-a, s druge strane, ostaje nejasan.

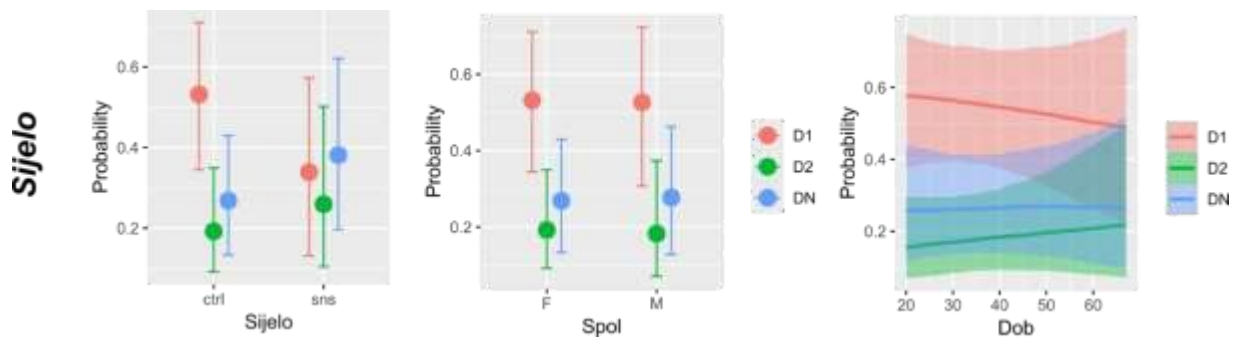


Slika 13. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole). Udjel D1,D2 i DN stanica u gdT populaciji, kondicionalni učinci, medijan (za kategorijske prediktore) s 95 %

vjerodostojnim intervalom. $LMI [h] \geq 12$, $LMI [l] < 12$. Malm-l=Malm [1+2], Malm-h=Malm [3]. EoI eozinofili u obrisku nosa, pos/neg



Slika 14. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole, serumski IgE). Udjel D1, D2 i DN stanica u gdT populaciji, kondicionalni učinci, medijan (za faktorske kovarijate) s 95 % vjerodostojnim intervalom



Slika 15. Dirichletova regresija, Bayesov model (SNŠ i kontrole). Udjel D1, D2 i DN stanica u gdT populaciji, kondicionalni učinci, medijan (za faktorske varijable) s 95 % vjerodostojnim intervalom

Tablica 8. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole). Populacijski i distribucijski parametri (*a posteriori*). Refcat=D1, C

Model	Parameters	Estimate	SD	l-95% CI	u-95% CI	Rhat	Bulk_ESS	Tail_ESS
Sijelo	D2_Intercept	-2,32	0,51	-3,29	-1,35	1	2528	1852
	DN_Intercept	-1,61	0,45	-2,44	-0,76	1	2940	1706
	D2_Sijelop	0,48	0,42	-0,36	1,34	1	1589	1579
	D2_SpolM	-0,7	0,41	-1,51	0,12	1	1603	1421
	D2_Dob	0,03	0,01	0	0,05	1	2144	1744
	DN_Sijelop	1,05	0,36	0,39	1,76	1	1547	1539
	DN_SpolM	-1,08	0,35	-1,79	-0,41	1	1578	1308
	DN_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	2578	1619
	phi	7,81	1,46	5,28	11,03	1	1896	1335
EoI	Parameters	Estimate	SD	l-95% CI	u-95% CI	Rhat	Bulk_ESS	Tail_ESS
	D2_Intercept	-2,09	0,53	-3,17	-1,09	1	2876	1722
	DN_Intercept	-1,74	0,51	-2,74	-0,76	1	3043	1793
	D2_EoIpos	-0,1	0,39	-0,87	0,68	1	2627	1394
	D2_SpolM	-0,44	0,35	-1,14	0,23	1	2084	1426
	D2_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	2827	1842
	DN_EoIpos	0,73	0,3	0,15	1,33	1	2618	1612
	DN_SpolM	-0,71	0,31	-1,34	-0,12	1	2253	1594
	DN_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	2697	1712
	phi	7,45	1,33	4,99	10,26	1	2514	1565
LMI	Parameters	Estimate	SD	l-95% CI	u-95% CI	Rhat	Bulk_ESS	Tail_ESS
	D2_Intercept	-2,37	0,51	-3,39	-1,41	1	2764	1328
	DN_Intercept	-1,52	0,44	-2,38	-0,66	1	2961	1707
	D2_LMI[≥12]	0,29	0,51	-0,7	1,32	1	1438	1527
	D2_LMI[<12]	0,53	0,45	-0,33	1,41	1	1665	1709
	D2_SpolM	-0,6	0,39	-1,4	0,18	1	1795	1428
	D2_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	2074	1236
	DN_LMI[≥12]	1,31	0,42	0,48	2,15	1	1180	1203
	DN_LMI[<12]	0,87	0,37	0,15	1,6	1	1450	1570
	DN_SpolM	-1,18	0,36	-1,92	-0,5	1	1595	1424
	DN_Dob	0,02	0,01	0,01	0,04	1	2472	1772
	phi	8,08	1,49	5,47	11,24	1	1950	1625

Tablica 8. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole). Populacijski i distribucijski parametri (*a posteriori*). Refcat=D1, C

Nastavak tablice 8. sa stranice 48.

Model	Parameters	Estimate	SD	l-95% CI	u-95% CI	Rhat	Bulk_ESS	Tail_ESS
Malm	D2_Intercept	-2,39	0,53	-3,51	-1,42	1	2113	1808
	DN_Intercept	-1,58	0,47	-2,48	-0,64	1	2776	1565
	D2_Malm[3]	0,35	0,51	-0,66	1,34	1,01	1226	1451
	D2_Malm[1+2]	0,52	0,46	-0,36	1,42	1	1226	1454
	D2_SpolM	-0,71	0,4	-1,53	0,1	1	1472	1342
	D2_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	1761	1596
	DN_Malm[3]	1,17	0,41	0,38	1,98	1,01	1111	1335
	DN_Malm[1+2]	0,93	0,39	0,23	1,74	1	1294	1478
	DN_SpolM	-1,08	0,34	-1,74	-0,38	1	1508	1487
	DN_Dob	0,03	0,01	0	0,04	1	1919	1479
	Phi	7,83	1,49	5,21	10,92	1	1740	1514

Masni otisak: značajni učinci. ESS efektivna veličina uzoraka (*effective sample size*). CI vjerodostojni interval (*credible interval*). Phi preciznost. SD standardna devijacija. l/u donja i gornja granica (2.5/97.5)

Tablica 9. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole), *a posteriori* kontrasti.

Udjel D1, D2 i DN stanica u gdT populaciji

Sijelo	Prediktor	Populacija	kontrast	median	2.5	97.5
	Dob	D1	1	-0,006	-0,009	-0,002
	Sijelo	D1	p – ctrl	-0,193	-0,326	-0,058
	Spol	D1	M – F	0,211	0,080	0,325
	Dob	D2	1	0,002	-0,001	0,005
	Sijelo	D2	p – ctrl	0,006	-0,096	0,094
	Spol	D2	M – F	-0,023	-0,107	0,057
	Dob	DN	1	0,004	0,001	0,007
	Sijelo	DN	p – ctrl	0,192	0,060	0,302
	Spol	DN	M – F	-0,186	-0,300	-0,060
Eozinofili (EoI)	Prediktor	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
	Dob	D1	1	-0,007	-0,011	-0,004
	EoI	D1	pos - neg	-0,114	-0,239	0,010
	Spol	D1	M – F	0,142	0,024	0,263
	Dob	D2	1	0,001	-0,001	0,004
	EoI	D2	pos - neg	-0,051	-0,126	0,036
	Spol	D2	M – F	-0,016	-0,100	0,060
	Dob	DN	1	0,006	0,002	0,009
	EoI	DN	pos - neg	0,164	0,049	0,285
	Spol	DN	M - F	-0,126	-0,245	-0,003

Tablica 9. Dirichletova regresija, Bayesov model (polipi i kontrole), *a posteriori* kontrasti.

Udjel D1, D2 i DN stanica u gdT populaciji

<i>Nastavak tablice 9. sa stranice 49</i>						
Sijelo	Prediktor	Populacija	kontrast	median	2.5	97.5
Lund-Mackay (LMI)	Dob	D1	1	-0,006	-0,009	-0,002
	LMI	D1	$[\geq 12] - c$	-0,227	-0,375	-0,060
	LMI	D1	$[< 12] - c$	-0,170	-0,306	-0,032
	Spol	D1	M - F	0,214	0,094	0,331
	Dob	D2	1	0,002	0,000	0,005
	LMI	D2	$[\geq 12] - c$	-0,029	-0,132	0,078
	LMI	D2	$[< 12] - c$	0,025	-0,084	0,129
	Spol	D2	M - F	-0,005	-0,091	0,070
	Dob	DN	1	0,004	0,000	0,007
	LMI	DN	$[\geq 12] - c$	0,258	0,101	0,397
	LMI	DN	$[< 12] - c$	0,140	0,015	0,269
	Spol	DN	M - F	-0,205	-0,327	-0,081
Malm	Prediktor	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
	Dob	D1	1	-0,006	-0,009	-0,002
	MalmI	D1	$[3] - c$	-0,207	-0,357	-0,044
	MalmI	D1	$[1+2] - c$	-0,176	-0,328	-0,035
	Spol	D1	M - F	0,209	0,074	0,321
	Dob	D2	1	0,002	0,000	0,005
	MalmI	D2	$[3] - c$	-0,015	-0,129	0,089
	MalmI	D2	$[1+2] - c$	0,020	-0,087	0,125
	Spol	D2	M - F	-0,025	-0,115	0,061
	Dob	DN	1	0,004	0,000	0,007
	MalmI	DN	$[3] - c$	0,224	0,072	0,371
	MalmI	DN	$[1+2] - c$	0,160	0,027	0,293
	Spol	DN	M - F	-0,184	-0,302	-0,055

Tablica 10. Dirichletova regresija, Bayesov model, parametri s *a posteriori* kontrastima. Udjel DN, D1 i D2 gd stanica u T-stanicama i limfocitima (P+C)

Populacijski i distribucijski parametri (<i>a posteriori</i>). Refcat=D1, C.							
Parametere rs	Estimate	SD	l-95% CI	u-95% CI	Rhat	Bulk_ESS	Tail_ESS
D21_Intercept	-3,09	0,77	-4,64	-1,62	1	1914	1552
DN1_Intercept	-2,21	0,65	-3,51	-1,02	1	2173	1336
D21_logIgE	0,52	0,31	-0,08	1,12	1	1764	1318
D21_SpolM	-0,51	0,38	-1,23	0,24	1	2144	1453
D21_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	1849	1427
DN1_logIgE	0,46	0,25	-0,03	0,97	1	2100	1314
DN1_SpolM	-0,74	0,34	-1,45	-0,08	1	1872	1234
DN1_Dob	0,03	0,01	0,01	0,05	1	1907	1543
phi	7,18	1,29	4,89	9,92	1	2328	1588

Prediktor	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
Dob	D11	1	-0.007	-0,010	-0,003
Spol	D11	M - F	0.152	0,016	0,277
logIgE	D11	1	-0.112	-0,201	-0,005
Dob	D21	1	0.002	-0,001	0,004
Spol	D21	M - F	-0.022	-0,104	0,060
logIgE	D21	1	0.040	-0,027	0,131
Dob	DN1	1	0.005	0,001	0,009
Spol	DN1	M - F	-0.129	-0,256	0,004
logIgE	DN1	1	0.065	-0,030	0,162

Masni otisak: značajni učinci. ESS efektivna veličina uzoraka (*effective sample size*). CI vjerodostojni interval (*credible interval*). Phi preciznost. SD standardna devijacija. l/u donja i gornja granica (2.5/97.5).

Tablica 11. Dirichletova regresija, Bayesov model, *a posteriori* kontrasti. Udjel DN, D1 i D2 gd stanica u T-stanicama i limfocitima (P+C, SNŠ+C)

% ly			POLIPI, C			% ly			SNŠ, C		
		diff	Median	2,5	97,5		diff	median	2,5	97.5	
Dob	D1	1	-8,93E-05	-0,00017	-1,34E-05	1	-0.00011	-0,0002	-2.19E-05		
Dob	D2	1	2,13E-06	-6,01E-05	6,62E-05	1	-1.04E-05	-8,96E-05	6.98E-05		
Dob	DN	1	-5,72E-06	-7,06E-05	6,39E-05	1	-3.75E-05	-0,00012	4.30E-05		
Dob	Ostalo	1	9,26E-05	-2,94E-05	0,000209	1	0.000161	2,13E-05	0.000298		
Sijelo	D1	p - ctrl	-0,00199	-0,00488	0,000624	sns - ctrl	-0.00282	-0,00621	0.000133		
Sijelo	D2	p - ctrl	0,000254	-0,00223	0,00249	sns - ctrl	0.000394	-0,00268	0.003341		
Sijelo	DN	p - ctrl	0,001254	-0,00111	0,003614	sns - ctrl	0.000105	-0,003	0.003044		
Sijelo	Ostalo	p - ctrl	0,000484	-0,00385	0,004953	sns - ctrl	0.002375	-0,00276	0.007842		
Spol	D1	M - F	0,001936	-0,00057	0,004441	M - F	0.001842	-0,0013	0.004941		
Spol	D2	M - F	-0,0001	-0,0023	0,002168	M - F	3.07E-05	-0,00319	0.002832		
Spol	DN	M - F	-0,00135	-0,00378	0,00107	M - F	-4.16E-05	-0,00326	0.002834		
Spol	Ostalo	M - F	-0,00048	-0,00472	0,003658	M - F	-0.00171	-0,00717	0.003768		
% T			POLIPI, C			% T			SNŠ, C		
Dob	D1	1	-0,00073	-0,00119	-0,00029	1	-0.0006	-0,00109	-6.79E-05		
Dob	D2	1	9,70E-06	-0,00016	0,000202	1	-3.29E-05	-0,00037	0.000323		
Dob	DN	1	6,29E-06	-0,00029	0,000296	1	-0.0002	-0,00058	0.000204		
Dob	Ostalo	1	0,000713	0,000166	0,001249	1	0.000831	7,09E-05	0.00151		
Sijelo	D1	p - ctrl	-0,00838	-0,02352	0,006374	sns - ctrl	-0.0107	-0,03078	0.005496		
Sijelo	D2	p - ctrl	0,00113	-0,00619	0,007382	sns - ctrl	0.004565	-0,00981	0.017377		
Sijelo	DN	p - ctrl	0,009362	-0,00025	0,019055	sns - ctrl	0.005935	-0,00826	0.0203		
Sijelo	Ostalo	p - ctrl	-0,00178	-0,02064	0,017367	sns - ctrl	0.001258	-0,02495	0.026473		
Spol	D1	M - F	0,01731	0,001591	0,033252	M - F	0.008696	-0,00927	0.02748		
Spol	D2	M - F	-0,00084	-0,00785	0,005343	M - F	-0.00106	-0,01496	0.011244		
Spol	DN	M - F	-0,0072	-0,02047	0,004206	M - F	0.000813	-0,0152	0.01451		
Spol	Ostalo	M - F	-0,00883	-0,02919	0,011868	M - F	-0.00801	-0,03369	0.018915		

Uz ove rezultate, treba primjetiti i neka ograničenja. U slučaju IgE, razvidan je malen broj ispitanika s jasnim ekscesom serumskog IgE, a slično vrijedi za broj ispitanika s jasnom eozinofilijom u obrisku nosa. Nadalje, za SNŠ ograničeni broj uzoraka u kombinaciji sa skromnim brojem stanica po uzorku ograničava pouzdanost procjene citometrijskih parametara i tako pridonosi ukupnom budžetu greške. Unatoč prednostima, fleksibilnosti i snazi Bayesove analize, jedna od potencijalnih posljedica različitog budžeta greške u dva sijela (polipi vs. SNŠ) nemogućnost je replikacije rezultata iz polipoidne sluznice kod SNŠ-a. Zbog toga su svi rezultati kod SNŠ-a uvjetne naravi, i traže reparametrizaciju u kohorti adekvatnog broja i kvalitete uzoraka. Takav uzorak omogućio bi i uporabu Bayesovog modeliranja u punom opsegu i snazi, simultanom eksploracijom cijelog parametarskog prostora.

Tablica 12. Dirichletova regresija, Bayesov model (SNŠ i kontrole), *a posteriori* kontrasti.

Udjel D1, D2 i DN stanica u gdT populaciji

Sijelo	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
Dob	D1	1	-0,002	-0,008	0,005
Sijelo	D1	sns - ctrl	-0,189	-0,396	0,041
Spol	D1	M - Ž	-0,002	-0,246	0,217
Dob	D2	1	0,001	-0,003	0,006
Sijelo	D2	sns - ctrl	0,066	-0,120	0,236
Spol	D2	M - Ž	-0,011	-0,222	0,164
Dob	DN	1	0,000	-0,006	0,006
Sijelo	DN	sns - ctrl	0,122	-0,072	0,306
Spol	DN	M - Ž	0,021	-0,198	0,217
EoI	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
Dob	D1	1	-0,003	-0,008	0,003
EoI	D1	pos - neg	-0,070	-0,276	0,156
Spol	D1	M - Ž	-0,127	-0,320	0,079
Dob	D2	1	0,001	-0,003	0,006
EoI	D2	pos - neg	-0,078	-0,208	0,078
Spol	D2	M - Ž	0,034	-0,132	0,175
Dob	DN	1	0,001	-0,004	0,007
EoI	DN	pos - neg	0,145	-0,083	0,368
Spol	DN	M - Ž	0,098	-0,084	0,268

Tablica 12. Dirichletova regresija, Bayesov model (SNŠ i kontrole), *a posteriori* kontrasti.

Udjel D1, D2 i DN stanica u gdT populaciji

<i>Nastavak tablice 12. sa stranice 53</i>					
Lund-Mackay	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
Dob	D1	1	-0,001	-0,006	0,005
LMI	D1	$[\geq 12]$ - c	-0,335	-0,542	-0,073
LMI	D1	$[< 12]$ - c	-0,110	-0,307	0,129
Spol	D1	M - Ž	0,031	-0,188	0,226
Dob	D2	1	0,001	-0,004	0,006
LMI	D2	$[\geq 12]$ - c	0,130	-0,102	0,374
LMI	D2	$[< 12]$ - c	0,036	-0,148	0,194
Spol	D2	M - Ž	-0,023	-0,212	0,147
Dob	DN	1	0,000	-0,006	0,005
LMI	DN	$[\geq 12]$ - c	0,199	-0,078	0,454
LMI	DN	$[< 12]$ - c	0,074	-0,121	0,255
Spol	DN	M - Ž	-0,001	-0,195	0,186
Malm	Populacija	kontrast	median	2,5	97,5
Dob	D1	1	-0,002	-0,007	0,005
MalmI	D1	$[3]$ - c	-0,151	-0,417	0,143
MalmI	D1	$[1+2]$ - c	-0,196	-0,416	0,064
Spol	D1	M - Ž	-0,010	-0,268	0,202
Dob	D2	1	0,002	-0,003	0,007
MalmI	D2	$[3]$ - c	0,104	-0,117	0,355
MalmI	D2	$[1+2]$ - c	0,045	-0,139	0,221
Spol	D2	M - Ž	-0,029	-0,223	0,157
Dob	DN	1	0,000	-0,006	0,006
MalmI	DN	$[3]$ - c	0,042	-0,200	0,290
MalmI	DN	$[1+2]$ - c	0,151	-0,078	0,350
Spol	DN	M - Ž	0,045	-0,167	0,242

5.3. PCR

U analizi genske ekspresije korišteni su tkivni uzorci 14 kontrolnih i 21 oboljelog ispitanika. Nisu zabilježene razlike prema spolu među skupinama, ali su oboljeli ispitanici bili značajno stariji u usporedbi s kontrolnom skupinom (Tablica 13.). Također, viša dob zabilježena je u skupni muških ispitanika [medijan 51 (38-60) vs. 31 (21-58) g., M vs. Ž, Mann-Whitney $P=0.076$]. U svim demografskim i kliničkim obilježjima (Tablica 13.), dvije su kontrolne skupine (FACS vs. PCR) bile vrlo slične, kao i obje skupine oboljelih ispitanika. U oba eksperimenta (FACS i PCR) uključeno je bilo 14 ispitanika.

Tablica 13. Klinička i demografska obilježja ispitanika, kvantifikacija genske ekspresije (medijan, [interkvartilni raspon]).

Obilježje	Kontrole (N=14)	KRSsNP (N=21)	P
Dob (god)	40 [30, 50]	60 [40, 60]	0,009 ⁺
[Min, Max]	[20, 60]	[20, 80]	
Spol			
Ž	4 (28,6%)	6 (28,6%)	0,651*
M	10 (71,4%)	15 (71,4%)	
SNOT22	20 [10, 20]	40 [30, 60]	0,00063 ⁺
[Min, Max]	[0, 40]	[1, 70]	
SNOT20	10 [8, 20]	40 [20, 50]	0,00085 ⁺
[Min, Max]	[0, 30]	[0, 60]	
JESREC	20 [9, 20]	30 [20, 40]	0,015 ⁺
[Min, Max]	[2, 40]	[10, 60]	
Nose.Score	8 [5, 10]	20 [10, 20]	0,0013 ⁺
[Min, Max]	[2, 10]	[0, 20]	
Lund-Mackay	-	10 [8, 20]	-
[Min, Max]	-	[2, 20]	
Malm			
3	-	9 (42,9%)	-
2	-	4 (19,0%)	
1	-	8 (38,1%)	
IgE	60 [30, 80]	90 [20, 200]	0,219 ⁺
[Min, Max]	[20, 100]	[7, 2000]	
Inhalacijski alergeni			
negativno	10 (71,4%)	13 (61,9%)	0,827*
pozitivno	4 (28,6%)	8 (38,1%)	
Nutritivni alergeni			
negativno	14 (100%)	15 (71,4%)	1*
pozitivno	0 (0%)	6 (28,6%)	
hsCRP (mg/L)	1.3 [0,60, 1,6]	1,8 [1,4, 3,0]	0,015 ⁺
[Min, Max]	[0,10, 16]	[0,60, 5,7]	
Eozinofili-obrisak	9 (64,3%)		
Negativno	9 (64,3%)	17 (81,0%)	0,432*
pozitivno	5 (35,7%)	4 (19,0%)	

* Fisher exact test; + Mann-Whitney U test

Parni uzorci oboljele sluznice iz oba sijela (SNŠ i polipa) dostupni su bili za 6 ispitanika. Najveći broj uzoraka prikupljen je za polipoidno tkivo (n=19, Tablica 14.), potom zdravu sluznicu kontrolnih ispitanika (N=14), a najmanji za SNŠ oboljelih (n=8).

Izvorni rezultati kvantifikacije po sijelu su sažeti u Tablici 14.

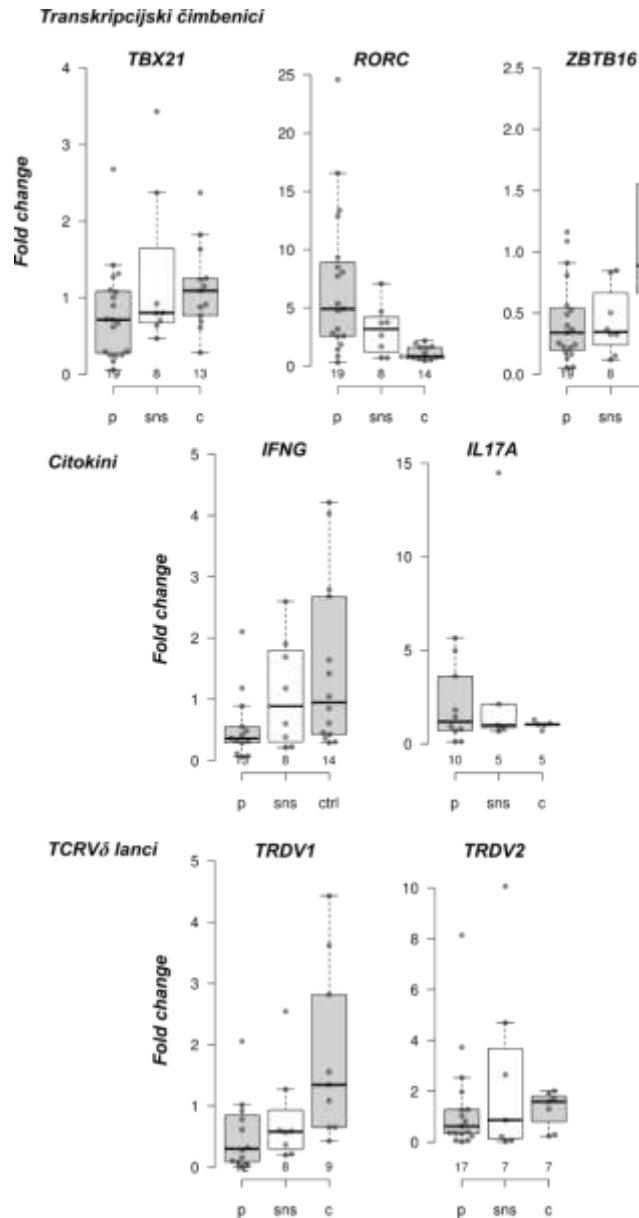
Tablica 14. Razdioba genske ekspresije po sijelima i statusu, omjer izražaja (*fold change*)

Gen	kontrole (N=14)	p, KRSsNP (N=19)	sns, KRSsNP (N=8)
<i>IFNG</i>	N=14	N=18	N=8
Median [Q1, Q3]	0,95 [0,43, 2,4]	0,32 [0,14, 0,54]	0,89 [0,34, 1,7]
[Min, Max]	[0,29, 4,2]	[0,057, 3,2]	[0,21, 2,6]
<i>ZBTB16</i>	N=13	N=19	N=8
Median [Q1, Q3]	0,89 [0,66, 1,6]	0,34 [0,20, 0,54]	0,35 [0,28, 0,58]
[Min, Max]	[0,43, 2,1]	[0,053, 1,2]	[0,12, 0,85]
<i>TBX21</i>	N=13	N=19	N=8
Median [Q1, Q3]	1,1 [0,77, 1,3]	0,71 [0,28, 1,1]	0,80 [0,69, 1,3]
[Min, Max]	[0,28, 2,4]	[0,057, 2,7]	[0,47, 3,4]
<i>RORC</i>	N=14	N=19	N=8
Median [Q1, Q3]	0,82 [0,74, 1,6]	4,9 [2,6, 8,9]	3,2 [1,4, 4,0]
[Min, Max]	[0,46, 2,2]	[0,30, 25]	[0,71, 7,1]
<i>IL17A</i>	N=5	N=10	N=5
Median [Q1, Q3]	1,0 [1,0, 1,1]	1,2 [0,72, 3,2]	0,99 [0,86, 2,1]
[Min, Max]	[0,70, 1,3]	[0,11, 5,7]	[0,67, 14]
<i>TRDV1</i>	N=12	N=12	N=5
Median [Q1, Q3]	1,2 [0,59, 1,9]	0,30 [0,095, 0,82]	0,59 [0,57, 0,60]
[Min, Max]	[0,19, 4,4]	[0,0020, 2,1]	[0,37, 2,5]
<i>TRDV2</i>	N=12	N=17	N=7
Median [Q1, Q3]	1,6 [0,80, 1,8]	0,63 [0,33, 1,3]	0,87 [0,15, 3,7]
[Min, Max]	[0,24, 2,0]	[0,015, 8,1]	[0,022, 10]

5.4. Q kvartila

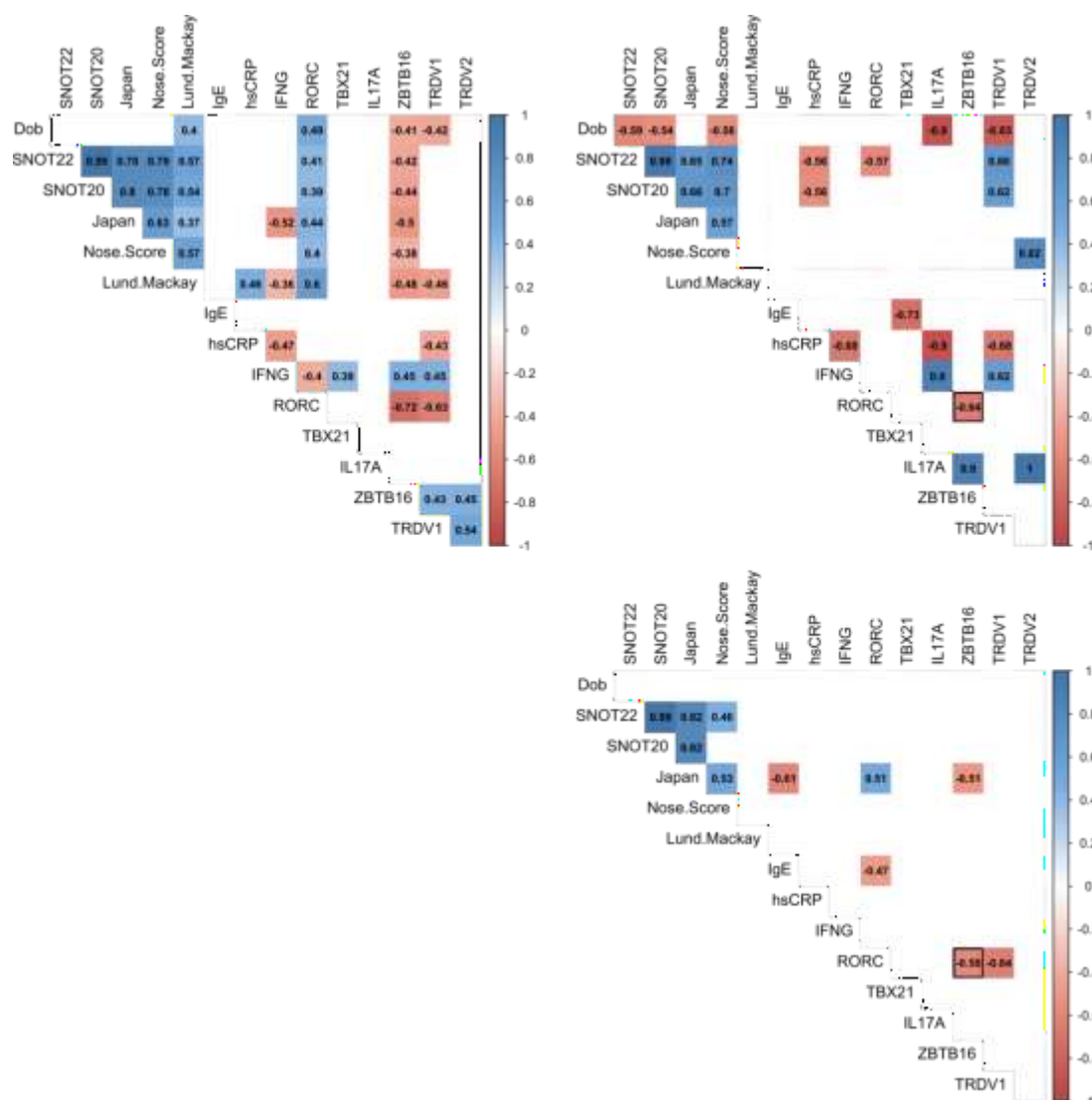
Veća varijabilnost genske ekspresije (*min.-max.* raspon) zablježena je u grupi RORC, IL17A i TRDV2 prijepisa, osobito u oboljelom tkivu (Tablica 14., Slika 17.). Za preostale gene dominira nehomogenost varijanci s većom disperzijom (IQR) u kontrolnoj skupini

(Slika 16.). Posljedično, za stabilizaciju varijance ovih mjerenja (poglavito TRDV1 i IFNG), u GLM(M) korištena je inverzna normalna transformacija rangova (INRT).



Slika 16. Grafički prikaz, genska ekspresija po sijelima, omjer izražaja (*fold change*). Horizontalna linija označava medijan, a graničnici prvu (Q1) i treću kvartilu (Q3). Točkaste T-linije obuhvaćaju $1.5 \times \text{IQR}$ (interkvartilni raspon, $Q3 - Q1$). Svaka točka odgovara jednom uzorku. Sns i p označavaju sluznicu srednje nosne školjke i polipa u skupini oboljelih (eKRSsNP), c kontrole

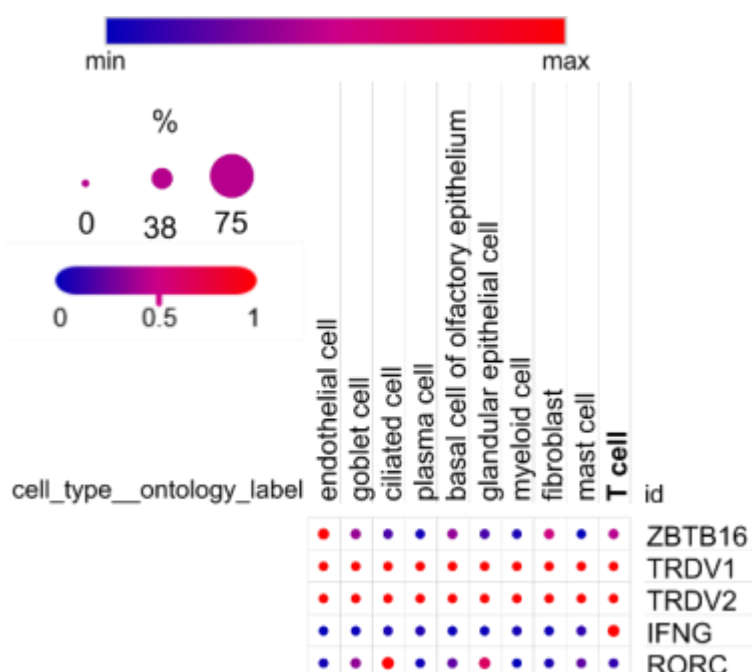
Povezanost genskog izražaja i sličnosti ekspresije pojedinih gena u različitim uzorcima prikazani su pregledno u Slici 16. Od sijela do sijela (zdrava sliznica, polipi) obrasci se povezanosti razlikuju, odražavajući razlike u staničnom sastavu među različitim stanjima (kontrola vs. KRSsNP) i razlike u veličini, snazi i reprezentativnosti uzoraka. Među postojećim asocijacijama izdvajaju se: I) inverzna korelacija izražaja RORC i ZBTB16, II) inverzna korelacija izražaja RORC i TRDV1, III) pozitivna korelacija izražaja IFNG i TRDV1, i IV) povezanost ZBTB16 s izražajem i TRDV1 i TRDV2.



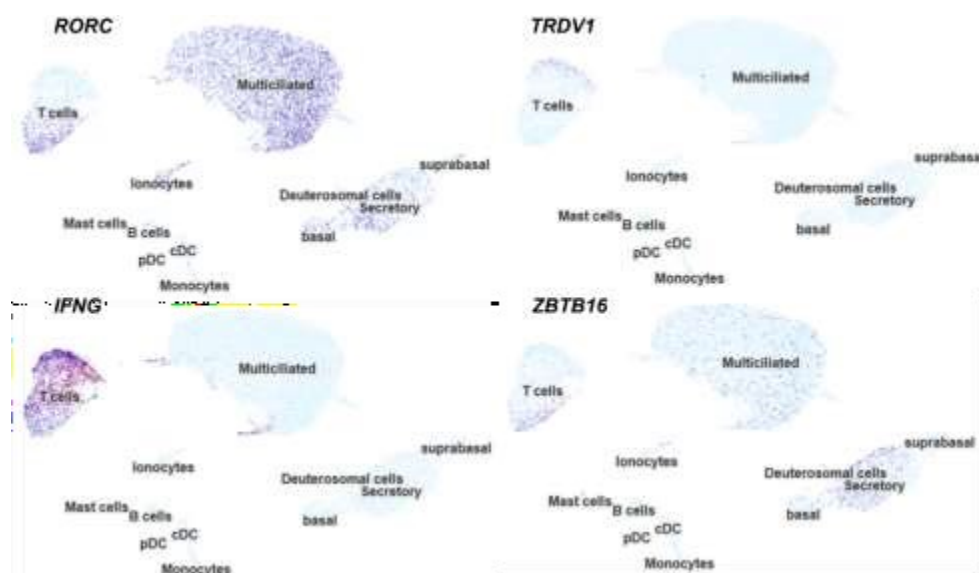
Slika 17. Korelogram demografskih, kliničkih obilježja i genske ekspresije u sluzničkim mononuklearnim stanicama. Gore lijevo: p+c, gore desno: c, dolje desno: p. Brojevi odgovaraju Spearmanovim koeficijentima korelacije rangova u intervalu [-1, 1], a intenzitet boje kodira snagu i smjer povezanosti (vertikalna vrpca). Prikazani su samo nominalno

značajni rezultati ($P < 0.05$). Crno uokvireni kvadrati označavaju koherentni rezultat među skupinama

Stanični kontekst ovih obrazaca ilustriran je scRNASeq podacima za nosnu sluznicu iz dvije kohorte (SCP253 i *Nasal Lifespan*, Slika 18. i Slika 19.).



Slika 18. Sekvenciranje jednostanične RNK, kronični rinosinuitis (kirurški uzorci, 18036 stanica), http://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP253/allergic-inflammatory-memory-in-human-respiratory-epithelial-progenitor-cells#study-visualize (*Single Cell Portal, Broad Institute*). Masni otisak: T stanice. Veličina kruga odgovara postotku stanica (%) s izražajem pripadnog gena



Slika 19. Genska ekspresija, stanični ekosustav nosne sluznice (sekvenciranje jednostanične RNK, *Nasal Lifespan Atlas*, GSE162864, 29917 stanica, *UCSC Cell Browser*). Relevantne populacije: T/B stanice, monociti. Paleta: viridis-plasma. Svaka točka odgovara jednoj stanici.

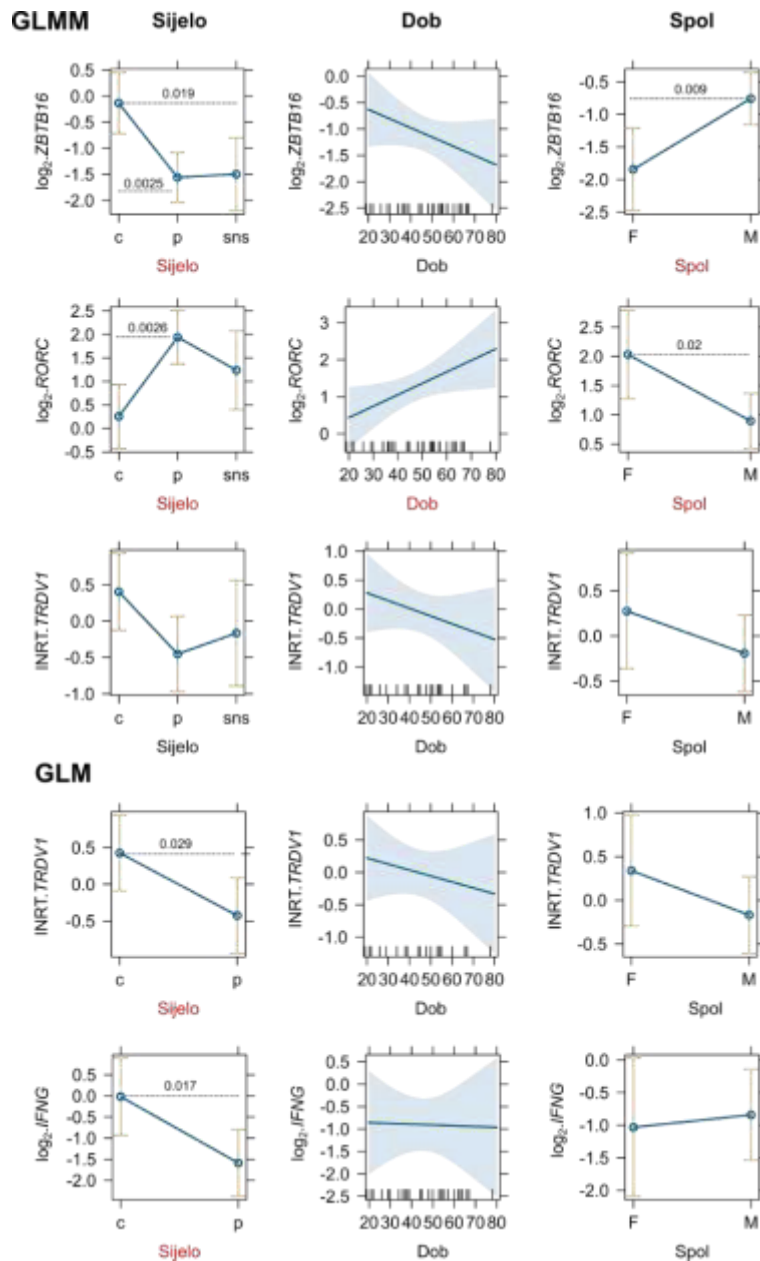
Dostupno na: <http://cells.ucsc.edu/?ds=lifespan-nasal-atlas+lifespan-nasal>,

<https://explore.data.humancellatlas.org/projects/8d566d35-d8d3-4975-a351-be5e25e9b2ea>

(Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY 4.0)

5.5. Sijelo i status

Nakon korekcije za ugniježđenost i međuovisnost parnih uzoraka, značajna razlika u genskoj ekspresiji zapažena je za ZBTB16, RORC i TRDV1 prijepise, ali ne i za ostale analizirane gene (Tablica 15., Slika 20.). Za ZBTB16, značajno niža ekspresija pronađena je podjednako u mononuklearnim stanicama sluznice polipa i sinonazalne sluznice oboljelih (u usporedbi s kontrolnim ispitanicima; Tablica 16., Slika 20.), i to neovisno o radiološkoj (Tablica 18., Slika 21.) i endoskopskoj proširenosti bolesti (Tablica 19.). Nadalje, u bivarijatnom modelu zabilježen je progresivni pad ekspresije ZBTB16 s porastom dobi (Slika 20., Slika 22.), poglavito kod muškaraca (Slika 2.), kod kojih je vidljiva postojano viša ekspresija ZBTB16 duž dobne putanje u usporedbi sa ženama (barem do 60-ih godina života). Rezultat je neovisna spolna razlika u ekspresiji ZBTB16 sa značajno višim vrijednostima u sluzničkim mononuklearima odraslih muškaraca u usporedbi sa ženama (Tablica 16., Slika 20.). Kako je već naznačeno, i bolesnici s ograničenom bolesti i bolesnici s proširenom bolesti jednako dijele ove obrasce (Tablica 18., Tablica 19., Slika 21.).



Slika 20. Marginalni efekti za sijelo, generalizirani linearni mješoviti model (GLMM) za izražaj odabranih genskih prijevsa u mononuklearima sluznice nosa ($\log_2$ omjera izražaja, srednja vrijednost s 95 % intervalom pouzdanosti). Za *TRDV1* i *IFNG*, prikazan je i generalni linearni model s fiksnim efektom sijela (GLM). Crvenim slovima su označene značajne kovarijate. U poredbene svrhe, prikazane P vrijednosti odgovaraju Tukey *post-hoc* testu

(prikazane su samo značajne razlike, $P < 0.05$, kategorijske kovarijate). Pojedinačna opažanja prikazana su duž apscise ("|"). U korelacijskim grafovima (srednji stupac), plava linija odgovara regresijskoj osi (metoda najmanjih kvadrata), a sjenčana vrpca 95 % intervalu pouzdanosti

Rezultati za RORC dijelom inverzno zrcale ZBTB16, odražavajući negativnu korelaciju iz Slika 17. Značajno viša ekspresija pronađena je u sluznici polipa (i pripadnim stanicama) u usporedbi s kontrolama, uz intermedijarni porast izražaja u sluznici srednje nosne školjke oboljelih (Tablica 15., Tablica 16., Slika 20.). I u slučaju RORC porast izražaja podjednak je kod bolesnika s ograničenom bolesti i proširenom bolesti (Tablica 18., Tablica 19.), i u obje kategorije značajno je viši nego kod kontrolnih ispitanika (Slika 21.), tako i u endoskopskoj (Tablica 19.), i u CT evaluaciji (Tablica 18.). Pritom, višu dob ispitanika neovisno prati značajno viša ekspresija RORC (Tablica 16, Slika 22.), osobito kod muškaraca (Slika 23.). U cjelini, muškarci se odlikuju značajno nižom ekspresijom RORC-a u izoliranim mononuklearima sluznice nosa (Tablica 16.), uz trend smanjenja razlika između muškaraca i žena u poznijoj dobi (Slika 23.).

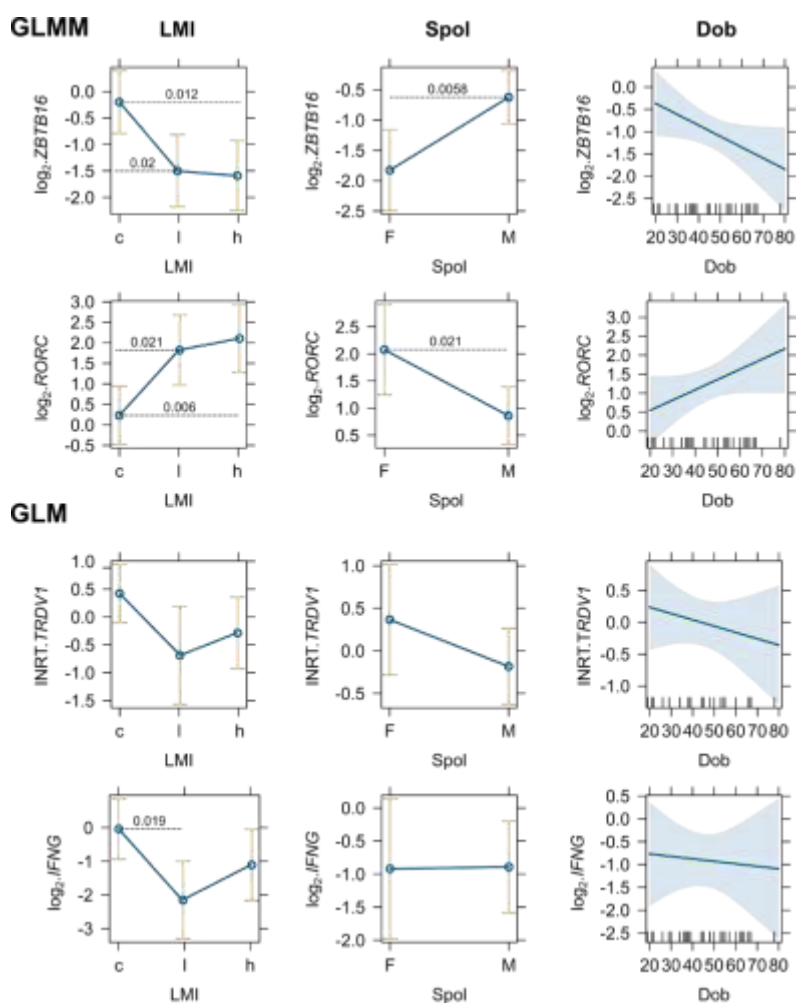
U slučaju *TRDVI*, generirana su dva modela, sa SNŠ skupinom (Tablica 16A.) i bez SNŠ skupine (Tablica 17.), prvenstveno zbog malobrojnosti tkivnih uzoraka u potonjoj skupini, čija je posljedica deficit statističke snage u mješovitom modeliranju (GLMM). Rezultat stoga prvenstveno osigurava kontekst za buduća istraživanja.

U GLMM niža ekspresija (u usporedbi s kontrolama) pronađena je u sluznici srednje nosne školjke, i nešto izraženije, u sluznici polipa oboljelih (Tablica 16., Slika 20.), bez razlike u izravnoj usporedbi između ova dva sijela (nepolipoidna i polipoidna sluznica SNŠ-a). Nominalno značajan rezultat opažen je samo za polipe (Tablica 16.), uglavnom na razini indicije (Tablica 15.) za čiju je potvrdu ili isključenje potreban masovniji uzorak s većom statističkom snagom. Iz tog razloga, u sljedećem koraku analiziran je GLM koristeći samo 2 najbrojnije, neovisne skupine uzoraka (Slika 20.) i fiksni učinak sijela kojim je potvrđena značajno niža ekspresija *TRDVI* u mononuklearnom infiltratu polipa u usporedbi sa zdravom, referentnom sluznicom nosa (Tablica 17). Ovaj efekt vidljiv je duž cijelog raspona LM CT zbroja, uz kulminaciju kod ispitanika s nižim ukupnim zbrojem (Slika 21., Tablica 18.).

Zasebno, dob i spol nisu značajno povezani s izražajem *TRDVI* u analiziranim sijelima (Tablica 16.). U interakciji (dob x spol), muškarci, ali ne i žene, pokazuju značajan pad izražaja *TRDVI* s rastućom dobi (Slika 23., bivarijatni pristup).

Za *IFNG* prikazan je samo GLM s fiksnim učinkom sijela za dvije neovisne skupine uzoraka (polipi i kontrole, Tablica 17., Slika 20.), a razlog tomu nedovoljan je broj opažanja u SNŠ skupini za uspješnu konvergenciju GLMM.

Slično je za *TRDVI* i za *IFNG* zabilježeno značajno smanjenje izražaja u polipima u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Slika 20.), uz nešto izraženiji efekt kod ispitanika s nižim LM zbrojem (Slika 21., Tablica 18.). Ovaj posljednji rezultat razvidan je već u univarijatnoj analizi (Slika 24.). Dob i spol nisu povezani s izražajem *IFNG-a*. Za preostale prijeipse nema značajnih rezultata (podaci nisu prikazani).



Slika 21. Marginalni efekti prema Lund-Mackay CT zbroju (ekviparticipija, LMI), generalizirani linearni mješoviti model (GLMM) za izražaj odabranih genskih prijevika u mononuklearima sluznice nosa ($\log_2$ omjera izražaja, srednja vrijednost s 95 % intervalom pouzdanosti). Za *TRDVI* i *IFNG*, prikazan je generalni linearni model s fiksnim efektom LMI (GLM). Crvenim slovima su označene značajne kovarijate ($\text{Pr}(> F)$, Tablica 15). U poredbene svrhe, prikazane P vrijednosti odgovaraju Tukey *post-hoc* testu (prikazane su samo značajne razlike, $P < 0.05$, kategorijske kovarijate). Pojedinačna opažanja prikazana su duž apscise ("|"). U korelacijskim grafovima (srednji stupac), plava linija odgovara regresijskoj osi (metoda najmanjih kvadrata), a sjenčana vrpca 95 % intervalu pouzdanosti. LMI [h] $\geq$ 12, LMI [l]<12

5.6. Breme simptoma, kvaliteta života (SNOTs, JESREC, Nose score)

Za SNOT22 i JESREC upitnik zapažena je povezanost bremena simptoma s izražajem ZBTB16 i RORC gena (Tablica 20.), ali gotovo isključivo na račun razlike u bremenu simptoma između zdravih i oboljelih ispitanika (Tablica 13.). Nakon kontrole za status i sijelo, nije preostala nikakva robustna rezidualna poveznica između genske ekspresije i težine simptoma u KRSsNP-u (Tablica 21.). Serumska razina IgE, eozinofili u brisu nosa i serumski hsCRP nisu povezani s genskom ekspresijom.

Tablica 15. Linearni mješoviti model, genski izražaj, suma kvadrata tipa III, Satterthwaitova metoda.

$\log_2 ZBTB16$	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value	Pr(>F)	LRT	PBT
Sijelo	10,889	5,444	2	23,567	7,338	0,0033	5,9x10⁻⁵	0,002
Dob	1,645	1,645	1	30,136	2,217	0,147		
Spol	6,023	6,023	1	31,155	8,118	0,0077		
$\log_2 RORC$	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value	Pr(>F)	LRT	PBT
Sijelo	14,735	7,368	2	21,568	6,759	0,0053	1,9x10⁻⁵	0,001
Dob	5,277	5,277	1	29,361	4,842	0,036		
Spol	6,807	6,807	1	30,808	6,245	0,018		
<i>INRT. TRDVI</i>	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value	Pr(>F)	LRT	PBT
Sijelo	1,825	0,912	2	8,132	2,670	0,128	0,014	0,037
Dob	0,462	0,462	1	21,426	1,350	0,258		
Spol	0,512	0,512	1	20,119	1,498	0,235		

Sum Sq...zbroj kvadrata odstupanja, Mean Sq...sredine kvadrata, NumDF...broj stupnjeva slobode u brojniku, DenDF...broj stupnjeva slobode u nazivniku, F value...F omjer, Pr(>F)...empirijska razina značajnosti, LRT...*likelihood ratio* test (globalni model), PBT...parametrijski *bootstrap* test, razina značajnosti (1000 iteracija). INRT inverzna normalna transformacija rangova za omjer izražaja).

Tablica 16. Linearni mješoviti model, genski izražaj, raščlamba rezultata za Tablicu 3 ($\log_2$..logaritam omjera izražaja, INRT inverzna normalna transformacija rangova za omjer izražaja).

Tablica 16. GLMM

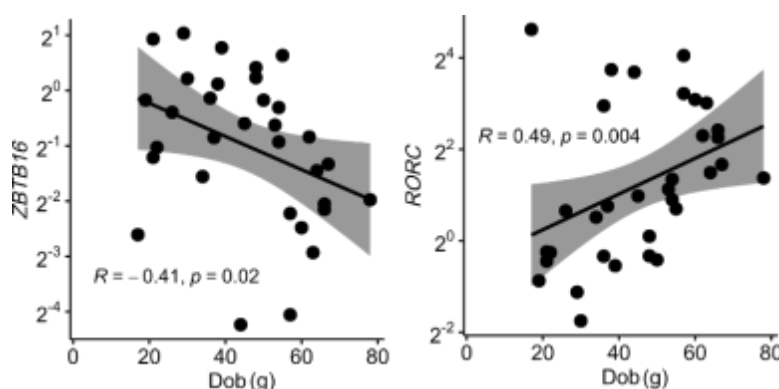
log ₂ (ZBTB16)				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	-0,09	-1,14 – 0,95	0,857	28,08
Sijelo [p]	-1,43	-2,22 – -0,63	0,001	33,8
Sijelo [sns]	-1,36	-2,33 – -0,39	0,007	35
Dob	-0,02	-0,04 – 0,01	0,156	28,08
Spol [M]	1,09	0,29 – 1,88	0,009	29,45
N=40	Marginal R ² / Conditional R ²		0,452 / 0,582	
log ₂ (RORC)				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	-0,35	-1,59 – 0,89	0,565	28,52
Sijelo [p]	1,68	0,74 – 2,63	0,001	34,82
Sijelo [sns]	0,98	-0,17 – 2,13	0,093	35,99
Dob	0,03	0,00 – 0,06	0,04	28,72
Spol [M]	-1,14	-2,08 – -0,19	0,02	30,28
N=41	Marginal R ² / Conditional R ²		0,463 /0,582	
INRT(TRDVI)				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	1,32	0,31 – 2,33	0,013	22,02
Sijelo [p]	-0,86	-1,63 – -0,08	0,032	22,94
Sijelo [sns]	-0,57	-1,55 – 0,41	0,24	22,33
Dob	-0,01	-0,04 – 0,01	0,26	21,75
Spol [M]	-0,47	-1,27 – 0,34	0,24	20,58
N=29	Marginal R ² / Conditional R ²		0,329 / 0,680	

Estimates - regresijski koeficijenti, Intercept - odsječak na ordinati, CI – 95 % interval pouzdanosti (*confidence interval*), p...razina značajnosti, df...broj stupnjeva slobode, M...muški spol, Kontrole su referentna skupina, p polip sluznice oboljelih, sns sluznica srednje nosne školjke oboljelih. F - F-statistika s pripadnim stupnjevima slobode, R² koeficijent determinacije.

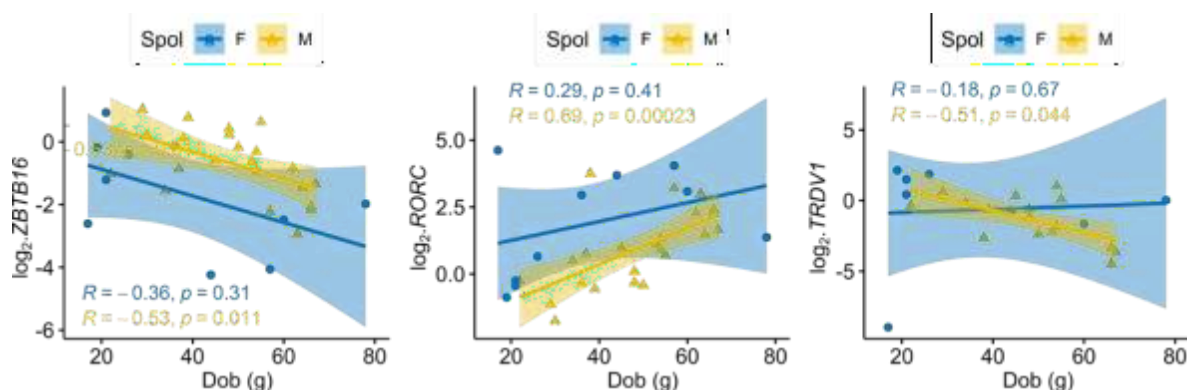
Tablica 17. GLM

INRT. <i>TRDV1</i>				
Predictors	Estimates	CI	<i>P</i>	Df
(Intercept)	1,17	0,24 – 2,10	0,014	20
Sijelo [p]	-0,85	-1,56 – -0,14	0,019	20
Spol [M]	-0,51	-1,26 – 0,24	0,183	20
Dob	-0,01	-0,03 – 0,01	0,414	20
N=24	R ² a=0,281	F (3,20)=3,992, P=0,022		
log ₂ . <i>IFNG</i>				
Predictors	Estimates	CI	<i>P</i>	Df
(Intercept)	-0,07	-1,73 – 1,59	0,933	28
Sijelo [p]	-1,57	-2,78 – -0,36	0,011	28
Spol [M]	0,19	-1,05 – 1,44	0,764	28
Dob	0	-0,04 – 0,04	0,93	28
N=32	R ² a=0,146	F (3,20)=2,763, P=0,061		

Estimates - regresijski koeficijenti, Intercept - odsječak na ordinati, CI - 95% interval pouzdanosti (*confidence interval*), p...razina značajnosti, df...broj stupnjeva slobode, M...muški spol, Kontrole su referentna skupina, p polip sluznice oboljelih, sns sluznica srednje nosne školjke oboljelih. F - F-statistika s pripadnim stupnjevima slobode, R² koeficijent determinacije.



Slika 22. Korelacija rangova, sluznički izražaj izabranih genskih prijevsa vs. dob, za skup neovisnih mjerenja (polipoidna sluznica oboljelih i kontrole). Regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata, s 95 % intervalom pouzdanosti). R = Spearman rho. Ordinata je pseudo-logaritamska os



Slika 23. Korelacija rangova, zasebno po spolu, sluznički izražaj izabranih genskih prijevise vs. dob, za skup neovisnih mjerenja (polipoidna sluznica oboljelih i kontrole). Regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata, sjenčana vrpca označava 95 % interval pouzdanosti). R = Spearman rho. Za ZBTB16 i RORC ordinata je pseudo-logaritamska os. INRT TRDV1

Tablica 18. Linearni model (kontrole i polipi oboljelih), genski izražaj prema Lund-Mackay CT zbroju

log ₂ .ZBTB16				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	0,09	-0,94 – 1,13	0,858	27
LMI [h]	-1,39	-2,27 – -0,51	0,002	27
LMI [l]	-1,3	-2,18 – -0,42	0,004	27
Spol [M]	1,2	0,42 – 1,99	0,003	27
Dob	-0,02	-0,05 – -0,00	0,045	27
N=32	R ² a=0,484	F (4,27) =8,285, P=0,00017		
log ₂ .RORC				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	-0,15	-1,43 – 1,13	0,818	28
LMI [h]	1,87	0,78 – 2,96	0,001	28
LMI [l]	1,59	0,50 – 2,68	0,004	28
Spol [M]	-1,21	-2,19 – -0,24	0,015	28
Dob	0,03	-0,00 – 0,06	0,076	28
N=33	R ² a=0,433	F (4,28) =7,992, P=0,0002		

Tablica 18. Linearni model (kontrole i polipi oboljelih), genski izražaj prema Lund-Mackay CT zbroju

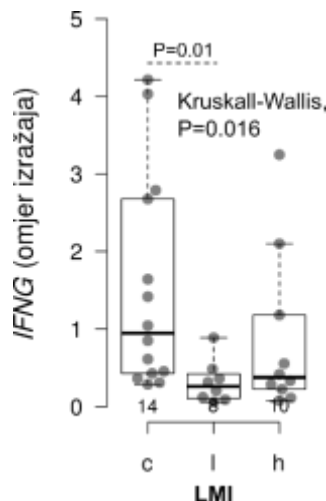
Nastavak Tablice 18. sa stranice 67				
INRT. <i>TRDVI</i>				
Predictors	Estimates	CI	<i>P</i>	df
(Intercept)	1,22	0,27 – 2,17	0,011	19
LMI [h]	-0,71	-1,51 – 0,09	0,083	19
LMI [l]	-1,11	-2,08 – -0,14	0,025	19
Spol [M]	-0,55	-1,31 – 0,21	0,158	19
Dob	-0,01	-0,03 – 0,01	0,387	19
N=24	R ² a=0,266	F (4,19) =3,084, P=0,041		
log ₂ . <i>IFNG</i>				
Predictors	Estimates	CI	<i>P</i>	df
(Intercept)	0,19	-1,49 – 1,86	0,828	27
LMI [h]	-1,07	-2,46 – 0,32	0,132	27
LMI [l]	-2,11	-3,53 – -0,69	0,004	27
Spol [M]	0,03	-1,22 – 1,27	0,967	27
Dob	-0,01	-0,04 – 0,03	0,783	27
N=32	R ² a=0,172	F (4,27) =8,285, P=0,058		

Estimates...regresijski koeficijenti, Intercept...odsječak na ordinati, CI...95 % interval pouzdanosti (*confidence interval*), LMI Lund Mackay zbroj, p...razina značajnosti, df...broj stupnjeva slobode, M...muški spol, Kontrole su referentna skupina. LMI [h]≥12, LMI [l]<12. F...F-statistika s pripadnim stupnjevima slobode, R² koeficijent determinacije.

Tablica 19. Linearni model (kontrole i polipi oboljelih), genski izražaj prema endoskopskoj gradaciji/klasifikaciji (Malm)

log ₂ .ZBTB16				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	0,1	-0,93 – 1,12	0,852	27
MalmI [3]	-1,45	-2,40 – -0,49	0,003	27
MalmI [1+2]	-1,29	-2,11 – -0,47	0,002	27
Spol [M]	1,17	0,39 – 1,96	0,003	27
Dob	-0,02	-0,05 – 0,00	0,052	27
N=32	R ² a=0,486	F (4,27) =8,285, P=0,00016		
log ₂ .RORC				
Predictors	Estimates	CI	P	df
(Intercept)	-0,19	-1,47 – 1,08	0,768	28
MalmI [3]	1,82	0,63 – 3,01	0,003	28
MalmI [1+2]	1,68	0,66 – 2,70	0,001	28
Spol [M]	-1,16	-2,13 – -0,18	0,02	28
Dob	0,03	-0,00 – 0,06	0,08	28
N=33	R ² a=0,463	F (4,28) =7,892, P=0,00022		

Estimates - regresijski koeficijenti, Intercept - odsječak na ordinati, CI...95 % interval pouzdanosti (*confidence interval*), p...razina značajnosti, df...broj stupnjeva slobode, M...muški spol, Kontrole su referentna skupina. Malm [1] + Malm [2] su grupirani zajedno zbog malog broja opažanja u Malm [2] skupini (n=3). F - F-statistika s pripadnim stupnjevima slobode, R² koeficijent determinacije.



Slika 24. Razdioba *TRDVI* izražaja prema Lund-Mackay CT zbroju (izvorna mjerenja, omjer genskog izražaja, Kruskal-Walis test, *post-hoc* Conover test, prikazane su samo značajne razlike). LMI [h]≥12, LMI [l]<12, c...kontrole

Tablica 20. Linearni mješoviti model, genski izražaj prema bremenu simpotoma (SNOT22 zbroj i JESREC)

log ₂ .ZBTB16					log ₂ .ZBTB16						
	β	CI	P	df		β	CI	P	df		
	β ₀	0,83	-0,48 – 2,14	0,207	31,4		β ₀	1,14	-0,19 – 2,47	0,091	34,37
	SNOT22	-0,03	-0,05 – -0,01	0,005	25,87		JESREC	-0,04	-0,06 – -0,02	0,001	27,99
	Dob	-0,03	-0,06 – -0,01	0,005	29,87		Dob	-0,04	-0,06 – -0,01	0,002	30,39
	Spol [M]	0,96	0,11 – 1,80	0,028	29,38		Spol [M]	0,79	-0,05 – 1,63	0,064	30,73
Marginal R ² / Conditional R ²			0,399 / 0,575		Marginal R ² / Conditional R ²			0,435 / 0,544			
log ₂ .RORC					log ₂ .RORC						
	β	CI	P	df		β	CI	P	df		
	β ₀	-1,13	-2,74 – 0,49	0,165	32,16		β ₀	-1,41	-3,07 – 0,25	0,092	35,4
	SNOT22	0,02	0,00 – 0,05	0,049	26,41		JESREC	0,03	0,01 – 0,06	0,022	28,48
	Dob	0,05	0,02 – 0,08	0,001	30,57		Dob	0,05	0,02 – 0,08	0,001	30,96
	Spol [M]	-1,12	-2,18 – -0,05	0,04	30,2		Spol [M]	-0,99	-2,05 – 0,07	0,066	31,61
Marginal R ² / Conditional R ²			0,358 / 0,546		Marginal R ² / Conditional R ²			0,382 / 0,482			

β - regresijski koeficijenti, β₀...odsječak na ordinate (*intercept*), CI...95% interval pouzdanosti (*confidence interval*), p...razina značajnosti, df...broj stupnjeva slobode, M...muški spol. R² koeficijent determinacije.

Tablica 21. Linearni mješoviti model, genski izražaj prema sijelu i bremenu simpotoma (SNOT22 zbroj i JESREC), suma kvadrata tipa III, Satterthwaitova metoda

	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value	Pr(>F)
log₂.ZBTB16						
Sijelo	4,257	2,129	2	23,262	2,675	0,090
SNOT22	1,109	1,109	1	27,985	1,393	0,247
Dob	2,364	2,364	1	29,328	2,971	0,095
Spol	5,194	5,194	1	28,85	6,527	0,016
log₂.RORC						
Sijelo	8,675	4,338	2	21,4	4,018	0,033
SNOT22	0,077	0,077	1	28,707	0,071	0,792
Dob	5,063	5,063	1	29,944	4,690	0,038
Spol	5,728	5,7282	1	29,608	5,306	0,028
log₂.ZBTB16						
Sijelo	5,732	2,866	2	23,706	3,301	0,054
JESREC	4,332	4,332	1	29,34	4,989	0,033
Dob	3,405	3,405	1	29,302	3,922	0,057
Spol	4,178	4,178	1	28,99	4,812	0,036
log₂.RORC						
Sijelo	8,732	4,366	2	21,607	3,916	0,035
JESREC	1,301	1,301	1	30,56	1,167	0,288
Dob	6,458	6,458	1	30,612	5,792	0,022
Spol	4,506	4,506	1	30,824	4,041	0,0532

Sum Sq...zbroj kvadrata odstupanja, Mean Sq...sredine kvadrata, NumDF...broj stupnjeva slobode u brojniku, DenDF...broj stupnjeva slobode u nazivniku, F value...F omjer, Pr(>F)...empirijska razina značajnosti.

5.7. Mikrobina flora

Tablica 22. Taksonomija izolata

Koljeno	Razred	Red	Porodica	Rod	Vrsta	N
<i>Bacillota</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	16*
					<i>S. aureus</i>	13*
<i>Bacillota</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	1
					<i>S. oralis</i>	1
					<i>S. vestibularis</i>	1
<i>Bacillota</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	<i>V. atypica</i>	1
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. Koseri</i>	2
				<i>Klebsiella</i>	<i>K. aerogenes</i>	1
				<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	1
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	2
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	<i>N. flavescens</i>	1
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	<i>P. buccae</i>	1

* uključujući meticilin-rezistentne sojeve

Mikrobna flora nije povezan s izražajem niti jednog gena (Tablica 23.), barem u analiziranom dijelu.

Tablica 23. Genski izražaj vs. mikrobiom, permutacijska analiza varijance (n=999, Jaccardov indeks)

Gen	F	df1, df2	Pr(>F)
<i>ZBTB16</i>	0,854	1, 30	0,436
<i>RORC</i>	0,804	1, 31	0,465
<i>IL17A</i>	1,735	1, 13	0,132
<i>TBX21</i>	0,479	1, 31	0,751
<i>IFNG</i>	0,808	1, 31	0,472
<i>TRDV1</i>	1,379	1, 23	0,278
<i>TRDV2</i>	1,047	1, 23	0,344

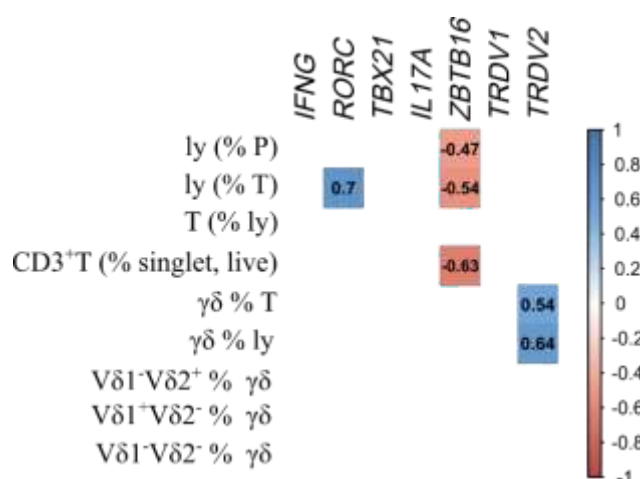
F...pseudo-F-statistika s pripadnim stupnjevima slobode (df1, df2).

5.8. PCR i FACS

Povezanost staničnih frekvencija s intenzitetom izražaja odabranih gena prikazana je korelogramom (14 ispitanika, Slika 25.). Inverzna korelacija zastupljenosti CD3⁺ T-stanica s izražajem *ZBTB16* smješta dominantni dio izmjerene izražaja *ZBTB16* gena u CD3⁺ frakciju mononuklearnih stanica (NK, ILC1-3 stanice). U prilog tomu, NK, ILC2 i ILC3 populacije doista su jednako brojne ili brojnije od gdT stanica (<http://www.nature.com/articles/s41590-022-01312-0#Sec41>) u nosnoj sluznici oboljelih, i češće su umnožene, osobito u CRSwNP (scNASEq kohorte). Nadalje, postnatalni izražaj *ZBTB16* u Vδ1⁺ gdT-stanicama (koje prevladavaju u nazalnoj populaciji γδT limfocita) vrlo je skroman (Slika 26., Slika 27.), i zaostaje za izražajem u Vδ2⁺ stanicama (Slika 26., Slika 28.).

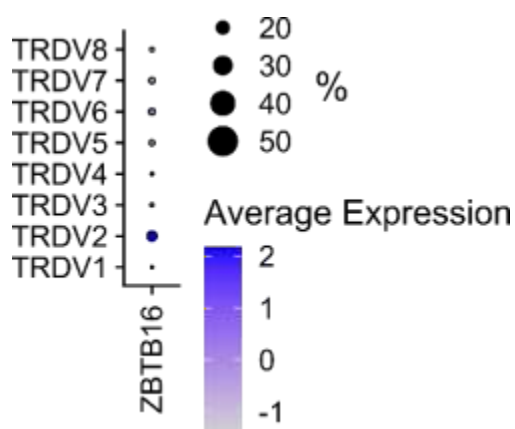
Rezultat također potvrđuje povezanost izražaja TRDV2 gena s proporcijom γδT stanica, a nedostatak slične relacije za *TRDV1* vjerojatno je dijelom odraz razlike u potpunosti opažanja (TRDV2>TRDV1). Među drugim razlozima tehničke naravi, mali broj izoliranih stanica - koji je posljedica skromne količine tkivnog materijala – ograničava pouzdanost procjene parametara u staničnoj populaciji. S biološke strane, tome treba dodati i

netrivijalni odnos između genske ekspresije i membranskog izražaja proteinskih produkata u njihovom konačnom odredištu, čemu pridonose i razlike u specifičnosti i avditetu komercijalno dostupnih protutijela. U tom smislu, za testiranje povezanosti izražaja TRDV1 i TRDV2 gena s udjelom $V\delta 1^+V\delta 2^-$ i $V\delta 1^-V\delta 2^+$ stanica prilagođeniji je RNASeq u čistoj populaciji $\gamma\delta$ T stanica.

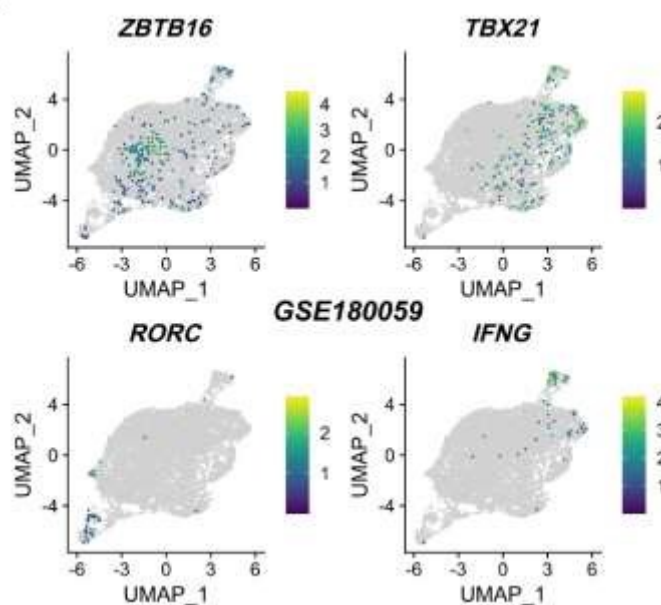


Slika 25. Korelogram, povezanost staničnih frekvencija s intenzitetom genskog izražaja u istih ispitanika (n=14). Brojevi odgovaraju Spearmanovim koeficijentima korelacije rangova u intervalu [-1, 1], a intenzitet boje kodira snagu i smjer povezanosti (vertikalna vrpca).

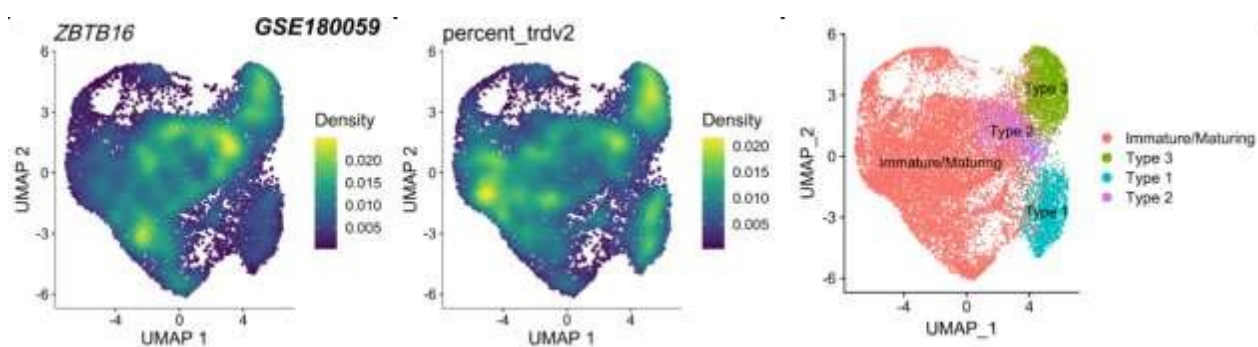
Prikazani su samo nominalno značajni rezultati ($P < 0.05$)



Slika 26. Ljudske gdT stanice, GSE149356.



Slika 27. Ljudske postnatalne gdT stanice periferne krvi, GSE180059



Slika 28. Ljudske gdT stanice fetalne krvi pupkovine, GSE180059

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju bolesnici s KRS+NP-om bili su starije životne dobi, s prevladavanjem muškaraca među oboljelima, dok je u kontrolnoj skupini većina bila mlađe životne dobi i ženskog spola. Slično tome, u nedavnom istraživanju Mihalja H. i suradnika, bolesnici s KRS+NP-om također su bili značajno stariji od zdravih kontrola (67).

Oboljeli ispitanici značajno se razlikuju nižom kvalitetom života, jednako kao u studiji autora Mukkase i suradnika iz 1999., no u usporedbi s kontrolama nisu utvrđene razlike u analiziranim biološkim obilježjima (IgE, CRP, prevalencija atopijske dijateze).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisutnosti bakterija u maksilarnom sinusu između dviju skupina bolesnika, iako su gotovo svi bolesnici s KRS+NP-om imali prisutnu barem jednu bakteriju u maksilarnom sinusu. Uloga bakterija, osobito enterotoksina *S. aureus*, u patogenezi nosnih polipa još uvijek nije potpuno razjašnjena. Međutim, učestala prisutnost gram-pozitivnih bakterija kod bolesnika s KRSsNP-om bez ekspresije IL-5, a time i bez izražene Th2 upale, upućuje na alternativne, bakterijski posredovane mehanizme u razvoju nosne polipoze (68).

6.1. Zastupljenost subpopulacija gamma delta T stanica u tkivu polipa bolesnika s KRSsNP i u tkivu SNŠ bolesnika s KRS te kontrolnih ispitanika značajno se razlikuje

U ovoj studiji udio $\gamma\delta$ T stanica u nosnoj sluznici bio je usporediv s onim u krvi $\gamma\delta$ T stanica. Međutim, sastav tih tkivno rezidentnih $\gamma\delta$ T stanica razlikovao se od onih u krvi, gdje su dominirale V δ 2+ frakcije, dok su u nosnoj sluznici prevladavale V δ 1+ stanice. Nalazi studije u skladu su s prethodnim studijama iz 2011. Hao i suradnika i iz 2022. Mullol i suradnika, koje su pokazale povećanu V δ 1+ frakciju u usporedbi s kontrolnim skupinama, sugerirajući značajnu protuupalnu ulogu ovih stanica u lokalnom imunitetu (69, 70). Druge studije ukazuju da u muškom reproduktivnom traktu prevladavaju V δ 6+ frakcije, dok se kod žena, tijekom implantacije embrija u maternici, primarno regrutiraju V δ 4+ frakcije, čija je ekspresija ovisna o IL-17 kao odgovoru na mikrobnu upalu (71-73).

U kontrolnoj skupini ove studije ternarni dijagram grupiranja otkrio je razdvajanje sastava $\gamma\delta$ T stanica prvenstveno duž osi V δ 1- V δ 2- (dvostruko negativne). Nasuprot tome,

sastav $\gamma\delta$ T stanica u bolesnoj skupini ukazivao je na dvije podskupine: jednu koja je blisko nalikovala kontrolama i drugu koja je odražavala sastav krvnih $\gamma\delta$ T stanica ($V\delta 2+ \sim DN > V\delta 1+$). Druge studije izvijestile su o smanjenim vrijednostima $V\delta 1+$ u kontrolnim skupinama (69, 70, 74).

U ovoj je studiji naglasak bio na udio frakcija $\gamma\delta$ T stanica u populaciji T stanica unutar nosne sluznice. Različite funkcije $\gamma\delta$ T stanica i dalje su predmet istraživanja i hipoteza, osobito u vezi s njihovom preferencijalnom lokalizacijom u perifernim tkivima u odnosu na limfoidne organe, što može pružiti ključne uvide (75). Ova atipična anatomska raspodjela $\gamma\delta$ T stanica usklađena je tijekom razvoja u timusu. Sekvencijalni „valovi“ sazrijevanja $\gamma\delta$ T stanica osiguravaju sveobuhvatnu kolonizaciju perifernih tkiva dugovječnim $\gamma\delta$ T stanicama, optimalno pozicioniranim za ispunjavanje ključnih uloga *in situ* (76). Infektivni patogeni predstavljaju značajne prijetnje za homeostazu tkiva. Zbog svoje strateške anatomske pozicije, $\gamma\delta$ T stanice služe kao prva linija obrane, izvršavajući odgovor sličan urođenom imunitetu, uključujući izravnu citotoksičnost protiv zaraženih stanica, regrutiranje neutrofila, aktiviranje fagocita i formaciju granuloma (77, 78).

Ovi rezultati pokazuju da za razliku od značajno manje zastupljenih $\delta 2+$ stanica u tkivu polipa, $\delta 1+$ stanice moguće imaju patogenu ulogu u razvoju KRSsNP-a, gdje djeluju poput okidača Th1 upale te se stoga ističu kao meta za buduća istraživanja u stvaranju upale tipa 1 u nosnoj polipozi.

6.2. Povezanost kliničkih faktora i kvalitete života bolesnika sa subpopulacijom gamma delta T-limfocita

U ovoj studiji usredotočili smo se na udio $\gamma\delta$ T stanica u populaciji T stanica unutar nosne sluznice. Među kontrolnim subjektima većina su bile žene, skupina s KRSsNP-om uglavnom sastojala od muškaraca, dok je u istraživanju Songa iz 2017. godine i u kontrolnoj i u KRS+NP bilo više muškaraca (79). Kontrolni subjekti bili su nešto mlađi od bolesnih i imali su znatno bolju kvalitetu života, što je logično s obzirom na dizajn studije. U skladu s dobro poznatim negativnim utjecajem nosne polipoze na kvalitetu života bolesnika s KRS+NP-om (80), rezultati također potvrđuju značajno više vrijednosti SNOT-22 upitnika kod ispitanika s KRSsNP-om. Kontrolni subjekti primarno su dolazili u kliniku radi septoplastike i rinoplastike, zahvata koji se obično izvode na mlađim osobama, uglavnom ženama, koje

nisu imale bolesnu nosnu sluznicu već određene anatomske deformacije septuma koje toliko ne utječu na kvalitetu života. Nasuprot tome, pacijenti s KRS+NP-om pokazali su izrazito smanjenu kvalitetu života, kao i kod drugih studija od kojih izdvajam studiju iz 2022. Mullol i suradnika (42).

Kasnije analize pokazale su recipročnu dinamiku između D1 i DN stanica, koju karakterizira značajno smanjenje udjela D1 stanica uz porast DN frakcija u sluznici polipa. Ove promjene bile su povezane s napredovanjem dobi i muškim spolom, pri čemu je udio D1 stanica u mukoznoj $\gamma\delta$ frakciji opadao, dok su DN stanice značajno rasle. Slična dinamika stanica primijećena je kod pacijenata s ekstenzivnom bolešću (Malm stupanj), s izraženijim učinkom kod pacijenata s najvišim Lund-Mackay rezultatima, što posebno odražava povećanje DN frakcija u $\gamma\delta$ T stanicama polipa. Opseg bolesti podrazumijeva veće mase polipa u više zahvaćenim paranazalnim sinusima, koji su endoskopski i radiološki na CT snimkama ocijenjeni višim ocjenama. To uvijek korelira s lošijom kvalitetom života pacijenata, što se odražava u anketama o kvaliteti života. Ovo je potvrđeno u nekoliko studija koje se bave ovom temom, a ovastudija potvrđuje te nalaze (81).

6.3. ZBTB16 ekspresija i povezanost s dobi, spolom i kliničkim parametrima

ZBTB16 ili PLZF – (promijelocitni leukemijski cinkov prst proteina) smatra se determinantom diferencijacije urođenih stanica jer je neophodan za stjecanje efektorskih funkcija u iNKT stanicama i $\gamma\delta$ NKT stanicama. Transgenska ekspresija PLZF tijekom razvoja T-stanica dovoljna je za pružanje nekih „urođenih“ efektorskih funkcija konvencionalnim T-stanicama. Transkripcijski faktor PLZF, za koji je pokazano da je važan za stjecanje efektorskog programa u razvoju NKT-stanica, ima sličnu ulogu u podskupinama $\gamma\delta$ T stanica (82).

U ovom istraživanju za ZBTB16, u usporedbi s kontrolnim ispitanicima, značajno niža ekspresija pronađena je podjednako u mononuklearnim stanicama sluznice polipa i sinonazalne sluznice oboljelih, i to neovisno o radiološkoj i endoskopskoj proširenosti bolesti. Nadalje, u bivarijatnom modelu zabilježen je progresivni pad ekspresije ZBTB16 s porastom dobi, poglavito kod muškaraca kod kojih je vidljiva postojano viša ekspresija ZBTB16 duž dobne putanje u usporedbi sa ženama (barem do 60-ih godina života). Rezultat je neovisna spolna razlika u ekspresiji ZBTB16, sa značajno višim vrijednostima u sluzničkim mononuklearima odraslih muškaraca u usporedbi sa ženama. Kako je već

naznačeno, i bolesnici s ograničenom bolesti i bolesnici s proširenom bolesti jednako dijele ove obrasce. Izražavanje PLZF-a čini se nužno, dovoljno i stanično intrinzično za mnoge istaknute značajke koje karakteriziraju funkciju i fenotip urođenih T-stanica (83).

6.4. RORC ekspresija i povezanost s dobom, spolom i kliničkim parametrima

RORC (retinoidno kiselinski-povezan receptor siročeta C) pokazao je da inducira diferencijaciju naivnih CD4⁺ T stanica u Th17 stanice (84). U našoj studiji povećana ekspresija pronađena je u sluznici polipa (i pripadnim stanicama) u usporedbi s kontrolama, uz intermedijarni porast izražaja u sluznici srednje nosne školjke oboljelih, jednake rezultate dobili su kineski znanstvenici Wang i Ciao u dvije odvojene studije (85)(86). Za razliku od nealergijskog KRS+NP-a, ekspresija RORC mRNA značajno je smanjena kod bolesnika s atopijskim EoKRS+NP-om (87). I u slučaju RORC-a porast izražaja podjednak je kod bolesnika s ograničenom bolesti i proširenom bolesti te je u obje kategorije značajno viši nego kod kontrolnih ispitanika, i u endoskopskoj, i u CT evaluaciji. Pritom, višu dob ispitanika neovisno prati značajno viša ekspresija RORC, osobito kod muškaraca. U cjelini, muškarci se odlikuju značajno nižom ekspresijom RORC-a u izoliranim mononuklearima sluznice nosa, uz trend smanjenja razlika između muškaraca i žena u poznijoj dobi.

6.5. TRDV1 ekspresija i povezanost s dobom, spolom i kliničkim parametrima

U slučaju TRDV1, generirana su dva modela, s SNŠ skupinom i bez SNŠ skupine, prvenstveno zbog malobrojnosti tkivnih uzoraka u potonjoj skupini, čija je posljedica deficit statističke snage u mješovitom modeliranju (GLMM). Rezultat stoga prvenstveno osigurava kontekst za buduća istraživanja.

U GLMM niža ekspresija (u usporedbi s kontrolama) pronađena je u sluznici srednje nosne školjke, i nešto izraženije u sluznici polipa oboljelih bez razlike u izravnoj usporedbi između ova dva sijela (nepolipoidna i polipoidna sluznica SNŠ-a). Nominalno značajan rezultat opažen je samo za polipe, uglavnom na razini indicije za čiju je potvrdu ili isključenje potreban masovniji uzorak s većom statističkom snagom. Zbog toga je u sljedećem koraku analiziran GLM koristeći samo dvije najbrojnije, neovisne skupine uzoraka i fiskni učinak sijela, kojim je potvrđena značajno niža ekspresija TRDV1 u mononuklearnom infiltratu polipa u usporedbi sa zdravom, referentnom sluznicom nosa. Ovaj efekt vidljiv je

duž cijelog raspona LM CT zbroja, uz kulminaciju kod ispitanika s nižim ukupnim zbrojem.

Zasebno, dob i spol nisu značajno povezani s izražajem TRDV1 u analiziranim sijelima. U interakciji (dob x spol), muškarci, ali ne i žene, pokazuju značajan pad izražaja TRDV1 s rastućom dobi.

6.6. Međugenska povezanost između ispitivanih gena

Povezanost genskog izražaja i sličnosti ekspresije pojedinih gena u različitim uzorcima prikazani su pregledno u F2. Od sijela do sijela (zdrava sliznica, polipi) obrasci se povezanosti razlikuju odražavajući razlike u staničnom sastavu među različitim stanjima (kontrola vs. KRSsNP-a) i razlike u veličini, snazi i reprezentativnosti uzoraka. Među postojanim asocijacijama izdvajaju se: I) inverzna korelacija izražaja RORC i ZBTB16, II) inverzna korelacija izražaja RORC i TRDV1, III) pozitivna korelacija izražaja IFNG i TRDV1, i IV) povezanost ZBTB16 s izražajem i TRDV1 i TRDV2.

6.7. Povezanost staničnih frekvencija s intenzitetom izražaja odabranih gena

Inverzna korelacija zastupljenosti CD3⁺ T-stanica s izražajem ZBTB16 smješta dominantni dio izmjerene izražaja ZBTB16 gena u CD3⁻ frakciju mononuklearnih stanica (NK, ILC1-3 stanice). U prilog tome, NK, ILC2 i ILC3 populacije doista su jednako brojne ili brojnije od gdT stanica (u nosnoj sluznici oboljelih, i češće su umnožene, osobito kod KRSsNP-a (scNASEq kohorte). Nadalje, postnatalni izražaj ZBTB16 u Vδ1⁺ gdT-stanicama (koje prevladavaju u nazalnoj populaciji γδT limfocita) vrlo je skroman, i zaostaje za izražajem u Vδ2⁺ stanicama.

Rezultat također potvrđuje povezanost izražaja TRDV2 gena s proporcijom γδT stanica, a nedostatak slične relacije za TRDV1 vjerojatno je dijelom odraz razlike u kompletnosti opažanja (TRDV2>TRDV1).

6.8. Ograničenje istraživanja

Među drugim razlozima tehničke naravi, mali broj izoliranih stanica - koji je posljedica skromne količine tkivnog materijala – ograničava pouzdanost procjene parametara u staničnoj populaciji. S biološke strane, tome treba dodati i netrivialni odnos između genske ekspresije i membranskog izražaja proteinskih produkata u njihovom konačnom odredištu, čemu pridonose i razlike u specifičnosti i avditetu komercijalno dostupnih protutijela. U tom smislu, za testiranje povezanosti izražaja TRDV1 i TRDV2 gena s udjelom $V\delta 1^+V\delta 2^-$ i $V\delta 1^-V\delta 2^+$ stanica prilagođeniji je RNASeq u čistoj populaciji $\gamma\delta T$ stanica.

7. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati iznjedrili su sljedeće zaključke:

- Tkivni udjeli i fenotip $\gamma\delta$ T stanica, kao i transkripcijski profil delta-lanaca, gena u kontroli prirođenih obilježja limfocita te gena uključenih u tip 1 i tip 3 imunološki odgovor mononuklearnih stanica u sinonazalnoj sluznici i nosnim polipima oboljelih od nealergijskog kroničnog rinosinuitisa s nosnom polipozom (KRS+NP) značajno se razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.
- Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisutnosti bakterija u srednjem nosnom hodniku između dviju skupina bolesnika, iako su gotovo svi bolesnici s KRS+NP-om imali prisutnu barem jednu bakteriju u srednjem nosnom hodniku.
- U bolesnoj nosnoj sluznici utvrđena je povećana V δ 1+ frakcija $\gamma\delta$ T stanica u usporedbi s kontrolnim skupinama, sugerirajući značajnu protuupalnu ulogu ovih stanica u lokalnom imunitetu.
- U kontrolnoj skupini ove studije ternarni dijagram grupiranja otkrio je razdvajanje sastava $\gamma\delta$ T stanica prvenstveno duž osi DN (V δ 1- V δ 2-).
- Utvrđena je značajno niža ekspresija TRDV1 i ZBTB16(PLZF) te viša ekspresija RORC u mononuklearnom infiltratu polipa u usporedbi sa zdravom, referentnom sluznicom nosa.
- Oboljeli ispitanici značajno se razlikuju nižom kvalitetom života, no u usporedbi s kontrolama nisu utvrđene razlike u analiziranim biološkim obilježjima (IgE, CRP, prevalencija atopijske dijateze).

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Etiopatogeneza kroničnog neozinofilnog rinosinuzitisa s nosnom polipozom (KRS+NP) još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, što je do sada rezultiralo terapijskim pristupom usmjerenim na ublažavanje posljedica, a ne rješavanjem uzroka bolesti. Ovo istraživanje usmjereno je na istraživanje staničnih i genetskih osnova KRS+NP-a, s fokusom na subpopulacije $\gamma\delta$ T-limfocita (V δ 1+V δ 2-, V δ 1-V δ 2+, V δ 1-V δ 2-) i ekspresiju ciljnih gena (TRDV1, TRDV2, IFNG, ZBTB16, IL-17A, RORC, TBX21), kao i referentnog gena (ACTB1). Praćeni su ovi parametri u nosnim polipima i sluznici srednje nosne školjke (SNŠ) oboljelih te uspoređeni s kontrolnim uzorcima SNŠ-a. Dodatno su analizirani i uspoređeni klinički pokazatelji bolesti.

Materijali i metode: U istraživanju je sudjelovao ukupno 71 ispitanik, od čega 30 bolesnika s dijagnosticiranim neozinofilnim KRS+NP-om te 41 kontrolni ispitanik. Kod svih ispitanika obavljen je klinički pregled, a bolesnicima s KRS+NP-om napravljen je i CT paranazalnih sinusa (PNS). Svi su ispitanici podvrgnuti laboratorijskim pretragama, uključujući alergološku obradu, mjerenje visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP) te briseve nosa za eozinofile i bakteriološku analizu. Također, ispitanici su ispunili upitnik za procjenu simptoma rinosinuzitisa (SNOT-22). Tkivni su uzorci pripremljeni za imunofenotipizaciju $\gamma\delta$ T-limfocita putem protočne citometrije te je pomoću RT-PCR analiziran transkriptom.

Rezultati: Sastav $\gamma\delta$ T-limfocita u nosnoj sluznici oboljelih od KRS+NP-a razlikovao se od onoga u perifernoj krvi, gdje su dominirale V δ 2+ frakcije, dok su u nosnoj sluznici oboljelih prevladavale V δ 1+ stanice, čija je ekspresija bila ovisna o IL-17 kao odgovoru na mikrobnu upalu. U kontrolnoj skupini, ternarni dijagram grupiranja otkrio je razdvajanje $\gamma\delta$ T-stanica duž osi V δ 1-V δ 2- (dvostruko negativne stanice). S druge strane, u skupini oboljelih otkrivena su dva fenotipska podtipa: jedan sličan kontrolnoj skupini i drugi, čiji je sastav bio sličan $\gamma\delta$ T-stanicama periferne krvi (V δ 2+ ~ DN > V δ 1+). Nije uočena statistički značajna razlika u prisutnosti bakterija u maksilarnom sinusu između oboljelih i kontrola, iako je većina bolesnika s KRS+NP-om imala barem jednu bakteriju prisutnu u maksilarnom sinusu. Bolesnici su pokazali značajno lošiju kvalitetu života. Genska ekspresija ZBTB16 bila je značajno niža kod oboljelih, i to u mononuklearnim stanicama nosnih polipa i sinonazalne sluznice, dok je ekspresija RORC bila povećana u polipnom tkivu. Ekspresija TRDV1 bila je niža u nosnim polipima. Postnatalna ekspresija ZBTB16 u V δ 1+ $\gamma\delta$ T-stanicama, koje

dominiraju u nosnoj sluznici, bila je niska u usporedbi s V δ 2+ stanicama.

Zaključak: Povećana prisutnost V δ 1+ $\gamma\delta$ T-limfocita u nosnoj sluznici bolesnika u usporedbi s kontrolama upućuje na njihovu značajnu ulogu u lokalnom imunološkom odgovoru i regulaciji upale. Nadalje, otkrivena je značajno niža ekspresija TRDV1 i ZBTB16 (PLZF) te viša ekspresija RORC u mononuklearnom infiltratu nosnih polipa, što sugerira da ove stanice imaju specifičnu protuupalnu funkciju u patogenezi neKRS+NP-a.

9. SUMMARY

Research objectives: The etiopathogenesis of chronic non-eosinophilic rhinosinusitis with nasal polyposis (CRS+NP) is still not fully understood, which has led to treatment approaches aimed at alleviating the symptoms rather than addressing the underlying cause of the disease. This study focuses on investigating the cellular and genetic basis of CRS+NP, with an emphasis on $\gamma\delta$ T-cell subpopulations (V δ 1+V δ 2-, V δ 1-V δ 2+, V δ 1-V δ 2-) and the expression of target genes (TRDV1, TRDV2, IFNG, ZBTB16, IL-17A, RORC, TBX21), as well as the reference gene (ACTB1). These parameters were examined in nasal polyps and the mucosa of the middle nasal turbinate (MNT) of affected individuals and compared with control MNT samples. Additionally, clinical indicators of the disease were analyzed and compared.

Materials and methods: A total of 71 participants were included in the study, 30 of whom had been diagnosed with non-eosinophilic CRS+NP, and 41 served as a control group. All participants underwent a clinical examination, and those with CRS+NP also had a CT scan of the paranasal sinuses (PNS). Laboratory tests were performed on all participants, including allergy tests, measurement of high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), nasal swabs for eosinophils, and bacteriological analysis. Additionally, the participants completed the Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-22) questionnaire to assess rhinosinusitis symptoms. Tissue samples were prepared for $\gamma\delta$ T-cell immunophenotyping via flow cytometry, and transcriptomic analysis was conducted using RT-PCR.

Results: The composition of $\gamma\delta$ T-cells in the nasal mucosa of CRS+NP patients differed from that in peripheral blood, where V δ 2+ fractions predominated, while V δ 1+ cells prevailed in the nasal mucosa of affected individuals. The expression of these cells was dependent on IL-17 in response to microbial inflammation. In the control group, a ternary diagram of grouping revealed a separation of $\gamma\delta$ T-cells along the V δ 1-V δ 2- axis (double negative cells). Conversely, in the diseased group, two phenotypic subtypes were identified: one resembling the control group and the other reflecting the composition of peripheral blood $\gamma\delta$ T-cells (V δ 2+ ~ DN > V δ 1+). No statistically significant difference was found in the presence of bacteria in the maxillary sinus between patients and the control group, although most CRS+NP patients had at least one bacterium present in the maxillary sinus. Patients exhibited a significantly lower quality of life. Gene expression of ZBTB16 was significantly lower in patients, particularly in the mononuclear cells of nasal polyps and sinonasal mucosa, while

RORC expression was increased in polyp tissue. TRDV1 expression was lower in nasal polyps. Postnatal expression of ZBTB16 in V δ 1+ $\gamma\delta$ T-cells, which dominate in the nasal mucosa, was low compared to V δ 2+ cells.

Conclusion: The increased presence of V δ 1+ $\gamma\delta$ T-cells in the nasal mucosa of patients compared to the control group suggests their significant role in local immune response and inflammation regulation. Furthermore, the significantly lower expression of TRDV1 and ZBTB16 (PLZF), along with higher RORC expression in the mononuclear infiltrate of nasal polyps, indicates that these cells have a specific anti-inflammatory function in the pathogenesis of CRS+NP.

10. REFERENCE

1. Bumber, Katić i suradnici, Otorinolaringologija, Medicinska biblioteka, Zagreb, 2004.
2. Krmpotić-Nemanić, Marušić, Anatomija čovjeka, Medicinska naklada, Zagreb 2007.
3. Jang Y. J., Myong N.-H., Park K. H., Koo T. W., and Kim H.-G., Mucociliary transport and histologic characteristics of the mucosa of deviated nasal septum, *Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. (2002) 128, no. 4, 421–424, <https://doi.org/10.1001/archotol.128.4.421>, 2-s2.0-0036216660.
4. Espinosa W., Genito R., and Ramos R. Z., Anatomic variations of the nasal cavity and paranasal sinus and their correlation with chronic rhinosinusitis using Harvard staging system, *Journal of Otolaryngology-ENT Research*. (2018) 10, no. 4, 190–193, <https://doi.org/10.15406/joentr.2018.10.00343>.
5. Rudmik L., Mace J., Ferguson B. J., and Smith T. L., Concurrent septoplasty during endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis: does it confound outcomes assessment?, *The Laryngoscope*. (2011) 121, no. 12, 2679–2683, <https://doi.org/10.1002/lary.22361>, 2-s2.0-82155162380.
6. Collet S., Bertrand B., Cornu S., Eloy P., and Rombaux P., Is septal deviation a risk factor for chronic sinusitis? review of literature, *Acta Oto-Rhino-Laryngologica Belgica*. (2001) 55, no. 4, 299–304.
7. Li L., Han D., Zhang L., Li Y., Zang H., Wang T., and Liu Y., Aerodynamic investigation of the correlation between nasal septal deviation and chronic rhinosinusitis, *The Laryngoscope*. (2012) 122, no. 9, 1915–1919, <https://doi.org/10.1002/lary.23428>, 2-s2.0-84865632472.
8. Madani S. A., Hashemi S. A., and Modanloo M., The incidence of nasal septal deviation and its relation with chronic rhinosinusitis in patients undergoing functional endoscopic sinus surgery, *JPM. The Journal of the Pakistan Medical Association*. (2015) 65, no. 6, 612–614.
9. Orlandi R. R., A systematic analysis of septal deviation associated with rhinosinusitis, *The Laryngoscope*. (2010) 120, no. 8, 1687–1695, <https://doi.org/10.1002/lary.20992>, 2-s2.0-77955879299.
10. Gregurić T., Baudoin T., Tomljenović D., Grgić M., Štefanović M., and Kalogjera L., Relationship between nasal septal deformity, symptoms and disease severity in chronic rhinosinusitis, *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. (2016) 273, no. 3, 671–677, <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3615-8>, 2-s2.0-84959122608.
11. Jones N. S., Strobl A., and Holland I., A study of the CT findings in 100 patients with rhinosinusitis and 100 controls, *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*. (1997) 22, no. 1, 47–51, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1997.00862.x>, 2-s2.0-0031401437.
 12. Ballengers, *Otorhinolaryngology, Head and neck surgery*, 3 Suppl S1-32 (2003.)
 13. Blackwell D.C.J., Coles R. Summary health statistics for US adults: National Health Interview Survey 1997. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat*. 2002; 10(205):15.
 14. Kaliner MA, Osguthorpe JD, Fireman P, Anon J, Georgitis J, Davis ML, Naclerio R, Kennedy D. Sinusitis: bench to bedside. Current findings, future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99(6 Pt 3):S829-48. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol* 1997 Oct;100(4):510. PMID: 9212027.
 15. Melén I. Chronic sinusitis: clinical and pathophysiological aspects. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1994;515:45-8. doi: 10.3109/00016489409124323. PMID: 8067243.
 16. Lethbridge – Cejku M., Rose D., Vickerie J., Summary Health Statistics For U.S. Adults: National Health Interview Survey, 2004. In: National Center for Health Statistics, *Vital Health Stat*, 10 (2006.) 228.
 17. Lethbridge – Cejku M., Schiller J.S., Bernadel L., Summary Health Statistics For U.S. Adults: National Health Interview Survey, 2002. In: National Center For Health Statistics, *Vital Health Stat*, 10 (2004.) 222.
 18. Yuan Zhang, Elieen Gevaert, Hongfei Lou, Xiangdong Wang, Luo Zhang, Claus Bachert, Nan Zhang, Chronic rhinosinusitis in Asia, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 140, Issue 5, 2017, Pages 1230-1239.
 19. Miljkovic Dijana, Psaltis Alkis J., Wormald Peter J., Vreugde Sarah, Chronic Rhinosinusitis with Polyps Is Characterized by Increased Mucosal and Blood Th17 Effector Cytokine Producing Cells, *Frontiers in Physiology*, 8, 2017, 898.
 20. Dijana Miljkovic, Alkis Psaltis, Peter-John Wormald, Sarah Vreugde, T regulatory and Th17 cells in chronic rhinosinusitis with polyps *Int Forum Allergy Rhinol*. volume 6, issue 8, P826-834 2016.

21. Tos M. The pathogenic theories on the formation of nasal polyps. *Am J Rhinol.* 1990.;4:51-56.
22. Mullol J, Azar A, Buchheit KM, Hopkins C, Bernstein JA. Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: Quality of Life in the Biologics Era. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022 Jun;10(6):1434-1453.e9. doi: 10.1016/j.jaip.2022.03.002. Epub 2022 Mar 16. PMID: 35306180.
23. Bachert C, Gevert P., Van Cauwenberge P., Staphylococcus aureus superantigens and airway disease. *Curr Allergy Asthma, Rep* 2 (2002.) 252-258
24. Shin S.H., Ponikau J.U., Sherris D.A., Congdon D., Frigas E., Homburger H.A., *J Allergy Clin Immunol*, 114 (2004.) 1369-1375.
25. Benninger M.S. , Anon j., Mabry R. (1997.) The medical management of rhinosinuitis *Otolaryngol – Head Neck Surg* 117:41-419.
26. Van Zele T., Vaneecoutte M., Holtappels G., Gevaert P., van Cauwenbere P., BAchert C. Detection of enterotoxin DNA in Staphylococcus aureus strains obtained from the middle meatus in controls and nasal polyp patients. *Am J Rhinol.* 2008 May-Jun;22(3):223-227.
27. Zheng J, Liu Y, Lau YL, Tu W. $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol.* 2013 Jan;10(1):50-7. doi: 10.1038/cmi.2012.43. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23064104; PMCID: PMC4003172.
28. Haruna S., Simada C., Ozawa M., Fukami S., Moryama H. A study of poor responders for long term, low dose macrolide administration for chronic sinusitis. *Rhinology* 2009. Mar; 47 (1): 66-71.
29. Witherden DA, Havran WL: Molecular aspects of epithelial $\gamma\delta$ T cell regulation. *Trends Immunol* 2011;32: 265–271.
30. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology.* 1993 Dec;31(4):183-4. PMID: 8140385.
31. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH et al. International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2016;6(Suppl1): S22-209.
32. Vatrella A, Fabozzi I, Calabrese C, Maselli R, Pelaia G (2014) Dupilumab: a novel treatment for asthma. *J Asthma Allergy* 7:123–130. <https://doi.org/10.2147/jaa.S52387> - DOI - PubMed - PMC

33. Fokkens WJ, Viskens AS, Backer V, Conti D, De Corso E, et al. EPOS/EUFOREA update on indication and evaluation of Biologics in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps 2023. *Rhinology*. 2023 Jun 1;61(3):194-202. doi: 10.4193/Rhin22.489. PMID: 36999780.
34. Dennis SK, Lam K, Luong A. A review of classification schemes for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis endotypes. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2016;1:130–134
35. Groger M, Bernt A, Wolf M, et al. Eosinophils and mast cells: a comparison of nasal mucosa histology and cytology to markers in nasal discharge in patients with chronic sino-nasal diseases. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270:2667–2676
36. Huvenne W, van Bruaene N, Zhang N, et al. Chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: what is the difference? *Curr Allergy Asthma Rep* 2009;9:213–220.
37. Rosenfeld RM, Andes D, Bhattacharyya N, et al. Clinical practice guideline: adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:S1–S31
38. Levy JM, Mace JC, Rudmik L, Soler ZM, Smith TL. Low 22-item sinonasal outcome test scores in chronic rhinosinusitis: why do patients seek treatment? *Laryngoscope* 2017;127:22–28.
39. Pastacaldi C, Lewis P, Howarth P. Staphylococci and staphylococcal superantigens in asthma and rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2010;66:549–555.
40. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:607–614.
41. Tantilipikorn P, Bunnag C, Nan Z, Bachert C. Staphylococcus aureus superantigens and their role in eosinophilic nasal polyp disease. [Review]. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012;30:171–176.
42. Ba L, Zhang N, Meng J, et al. The association between bacterial colonization and inflammatory pattern in Chinese chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps. *Allergy*. 2011;66:1296–1303.
43. Gold SM, Tami TA. Role of middle meatus aspiration culture in the diagnosis of chronic sinusitis. *Laryngoscope*. 1997;107(12 Pt 1):1586–1589.

44. Oczan M, Unal A, Aksaray S, et al. Correlation of middle meatus and ethmoid sinus microbiology in patients with chronic sinusitis. *Rhinology*. 2002;40:24–27.
45. Dubin MG, Ebert CS, Coffey CS, et al. Concordance of middle meatal swab and maxillary sinus aspirate in acute and chronic sinusitis; a meta-analysis. *Am J Rhinol*. 2005;19:462–470
46. Zhang N, Van Zele T, Perez-Novo C, Van Bruaene N, Holtappels G, DeRuyck N, et al. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:961-8
47. Shi LL, Song J, Xiong P, Cao PP, Liao B, Ma J, et al. Disease-specific T-helper cell polarizing function of lesional dendritic cells in different types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:628-38.
48. Zhong B, Du J, Liu F, Liu Y, Liu S, Zhang J, et al. Hypoxia-induced factor-1alpha induces NLRP3 expression by M1 macrophages in noneosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* 2021;76:582-6
49. Wang H, Pan L, Liu Z. Neutrophils as a protagonist and target in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2019;12:337-47.
50. Cao Y, Chen F, Sun Y, Hong H, Wen Y, Lai Y, et al. LL-37 promotes neutrophil extracellular trap formation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Allergy* 2019;49:990-9.
51. Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Jaman S, Novosadová E, Petrková J, Navratilova Z, Suver- Stević M, Petrek M. The expression of T-cell FOXP3 and T-bet is upregulated in severe, but not euthyroid Hashimoto's thyroiditis. // *Mediators of Inflammation* 2016; Article ID 3687420; 1-9.
52. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip S, Rosen F, Krangel MS. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*. 1986 Jul 10-16;322(6075):145-9. doi: 10.1038/322145a0. PMID: 3755221.
53. O'Brien RL, Born WK: $\gamma\delta$ T cell subsets: a link between TCR and function? *Semin Immunol* 2010;22:193–198.
54. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ: Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology* 2012;136:283–290.

55. Gu S, Nawrocka W, Adams EJ. Sensing of Pyrophosphate Metabolites by V γ 9V δ 2 T Cells. *Front Immunol*. 2015 Jan 22;5:688. doi: 10.3389/fimmu.2014.00688. PMID: 25657647; PMCID: PMC4303140.
56. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, Glass D, Strominger JL, Brenner MB J Exp Med*. 1990 May 1; 171(5):1597-612.
57. Plužarić V, Štefanić M, Mihalj M, et al. Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris. *Front Immunol*. 2020;11:572924. Published 2020 Dec 3. doi:10.3389/fimmu.2020.572924
58. Venken K, Jacques P, Mortier C, Labadia ME, Decruij T, Coudenys J, Hoyt K, Wayne AL, Hughes R, Turner M, Van Gassen S, Martens L, Smith D, Harcken C, Wahle J, Wang CT, Verheugen E, Schryvers N, Varkas G, Cypers H, Wittoek R, Piette Y, Gyselbrecht L, Van Calenbergh S, Van den Bosch F, Saeys Y, Nabozny G, Elewaut D. ROR γ t inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and $\gamma\delta$ -T cells enriched in Spondyloarthritis patients. *Nat Commun*. 2019 Jan 2;10(1):9. doi: 10.1038/s41467-018-07911-6. PMID: 30602780; PMCID: PMC6315029.
59. Likai tan, Alina Suzann Fichtner, Elena Bruni, Ivan Odak, Inga Sandrock, Anja Bubke, Alina Aborchers, christian Schultze-Florey, Christian Koenecke, Reinhold Förster, Michael Jarek, Constantin von Kaisenberg, Ansgar Schulz, Xiaojing Chu, Cowen Zhang, Yang li, Ulf Panzer, Christian F. Krebs, Sarina Ravens, Immo prinz a fetal wave of human type 3 effector $\gamma\delta$ cells with restricted tcr diversity persists into adulthood, *Science immunology* 23 apr 2021, vol. 6, issue 58.
60. Gutierrez-Arcelus, M., Teslovich, N., Mola, A.R. *et al*. Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions. *Nat Commun* **10**, 687 (2019).
61. Pant H, Hughes A, Schembri M, Miljkovic D, Krumbiegel D. CD4⁺ and CD8⁺ Regulatory T Cells in Chronic Rhinosinusitis Mucosa. *American Journal of Rhinology & Allergy*. 2014;28(2):e83-e89.
62. Pant H, Hughes A, Miljkovic D, et al. Accumulation of Effector Memory CD8⁺ T Cells in Nasal Polyps. *American Journal of Rhinology & Allergy*. 2013;27(5):e117-e126.
63.)Lee W, Chang L, Huang Z, Huang J, Yang L, Wang Z, Zhang G. A Retrospective Analysis of $\gamma\delta$ T Cell Expression in Chronic Rhinosinusitis and Its Association with

- Recurrence of Nasal Polyps. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2017;79(5):251-263. doi: 10.1159/000458444. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28858878.
64. Lee W, Chang L, Huang Z, Huang J, Yang L, Wang Z, Zhang G. A Retrospective Analysis of $\gamma\delta$ T Cell Expression in Chronic Rhinosinusitis and Its Association with Recurrence of Nasal Polyps. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2017;79(5):251-263. doi: 10.1159/000458444. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28858878.
 65. Wytske J. Fokkens , Valerie J. Lund, Claire Hopkins, Peter W. Hellings, Robert Kern , Sietze Sanna Toppila-Salmi , Manuel BernalSprekelsen , Joaquim Mullol ,on behalf of the EPOS2020 group, *Rhinology* 58: 2, 82- 111, 2020.
 66. Snidvongs K, Lam M, Sacks R, Earls P, Kalish L, Phillips PS, et al. Structured histopathology profiling of chronic rhinosinusitis in routine practice. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2012 Sep;2(5):376–85.
 67. 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.
 68. 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.
 69. Mullol J, Azar A, Buchheit KM, Hopkins C, Bernstein JA. Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: Quality of Life in the Biologics Era. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022 Jun;10(6):1434-1453.e9.
 70. Hao J, Dong S, Xia S, He W, Jia H, Zhang S, et al. Regulatory Role of $V\gamma 1$ $\gamma\delta$ T Cells in Tumor Immunity through IL-4 Production. *J Immunol.* 2011 Nov 15;187(10):4979–86.
 71. Huber SA, Graveline D, Newell MK, Born WK, O'Brien RL. $V\gamma 1+$ T Cells Suppress and $V\gamma 4+$ T Cells Promote Susceptibility to Cocksackievirus B3-Induced Myocarditis in Mice. *J Immunol.* 2000 Oct 15;165(8):4174–81.
 72. Wilharm A, Brigas HC, Sandrock I, Ribeiro M, Amado T, Reinhardt A, et al. Microbiota-dependent expansion of testicular IL-17-producing $V\gamma 6+$ $\gamma\delta$ T cells upon

- puberty promotes local tissue immune surveillance. *Mucosal Immunol.* 2021 Jan;14(1):242–52.
73. Mukasa A, Hiromatsu K, Matsuzaki G, O'Brien R, Born W, Nomoto K. Bacterial infection of the testis leading to autoaggressive immunity triggers apparently opposed responses of alpha beta and gamma delta T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995 Aug 15;155(4):2047–56.
 74. Lee W, Chang L, Huang Z, Huang J, Yang L, Wang Z, et al. A Retrospective Analysis of $\gamma\delta$ T Cell Expression in Chronic Rhinosinusitis and Its Association with Recurrence of Nasal Polyps. *ORL.* 2017;79(5):251–63.
 75. Pleis JR, Lethbridge-Cejku M. Summary Health Statistics for U.S. Adults: National Health Interview Survey, 2006: (403882008-001) [Internet]. 2007 [cited 2024 Jun 28]. Available from: <https://doi.apa.org/doi/10.1037/e403882008-001>
 76. Sandstrom A, Peigné CM, Léger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, et al. The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Immunity.* 2014 Apr;40(4):490–500.
 77. Sheridan BS, Romagnoli PA, Pham QM, Fu HH, Alonzo F, Schubert WD, et al. $\gamma\delta$ T Cells Exhibit Multifunctional and Protective Memory in Intestinal Tissues. *Immunity.* 2013 Jul;39(1):184–95.
 78. Romagnoli PA, Sheridan BS, Pham QM, Lefrançois L, Khanna KM. IL-17A–producing resident memory $\gamma\delta$ T cells orchestrate the innate immune response to secondary oral *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2016 Jul 26;113(30):8502–7.
 79. Song W, Wang C, Zhou J, Pan S, Lin S. IL-33 Expression in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Its Relationship with Clinical Severity. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2017;79(6):323–330. doi: 10.1159/000484527. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29186722.
 80. Mozzanica, F., Preti, A., Gera, R., Gallo, S., Bulgheroni, C., Bandi, F., Ottaviani, F., & Castelnovo, 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.
81. Mukasa A, Born WK, O'Brien RL. Inflammation alone evokes the response of a TCR-invariant mouse gamma delta T cell subset. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Apr 15;162(8):4910–3.
 82. Kreslavsky T, et al. TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 28;106(30):12453-8. doi: 10.1073/pnas.0903895106. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19617548; PMCID: PMC2718370.
 83. Muñoz-Ruiz M, Sumaria N, Pennington DJ, Silva-Santos B. Thymic Determinants of $\gamma\delta$ T Cell Differentiation. *Trends Immunol*. 2017 May;38(5):336-344. doi: 10.1016/j.it.2017.01.007. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28285814.
 84. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $^{+}$ T helper cells. *Cell* 126:1121–1133, 2006.
 85. Wang XQ, Hu GH, Kou W, Shen Y, Kang HY, Hong SL. Reciprocal roles of STAT3 and STAT5 in nasal polyposis. *Am J Otolaryngol*. 2012 Nov-Dec;33(6):741-52. doi: 10.1016/j.amjoto.2012.07.009. Epub 2012 Sep 5. PMID: 22959364.
 86. Cao PP, Li HB, Wang BF, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:478-84, 484.e1-2.
 87. Shin SH, Kim YH, Ye MK, Choi SY. Immunopathologic characteristics of nasal polyps in adult Koreans: A single-center study. *Am J Rhinol Allergy*. 2017 May 1;31(3):168-173. doi: 10.2500/ajra.2017.31.4423. PMID: 28490401.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Vjeran Bogović, dr. med.

Adresa (kućna): Dragutina Neumana 6a, 31000 Osijek

Tel: 091/567-1059

e-mail: vjeranbogovic@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 3. 9. 1987., Osijek

Dr. Bogović završio je III. prirodoslovno matematičku Gimnaziju u Osijeku 2006. godine te potom upisao integrirani prediplomski i diplomski studij Medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, koji uspješno završava 2013. godine. Potom 2015. godine upisuje Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Osijek. Doktorski staž odradio je u HMP Osječko–baranjske županije (OBŽ) tijekom 2013. godine. U periodu od 2014. do 2016. godine radio je kao liječnik obiteljske medicine u Domu zdravlja Donji Miholjac, potom tijekom 2016. godine i kao liječnik u HMP OBŽ. Godine 2017. započinje specijalističko usavršavanje iz otorinolaringologije na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Osijek. U travnju 2022. godine polaže specijalistički ispit te stječe naziv specijalista otorinolaringologije. 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 2017. godine Vjeran Bogović član je Hrvatske liječničke komore i aktivan član Hrvatskog liječničkog zbora. Osim toga, dr. Bogović suprug je te ponosni otac dviju prekrasnih kćeri.

Popis radova i aktivno sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

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, 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).
4. Mihalj H, Včeva A, Zubčić Ž, Šestak A, Bogović V, Milanković SG, Prpić T, Abičić I, Rezo M. The effectiveness of diode laser in reduction of inferior turbinate. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti*.2020. (543=50- 51):17-24.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Včeva A, Đanić D, Đanić Hadžibegović A, Šimunjak Boris, 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.

Sudjelovanje na kongresima:

1. 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)
2. 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 (Suplement):30-30.
3. 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.
4. Zubčić Ž, Mihalj H, Včeva A, Kotromanović Ž, Bogović V, Milanković SG. Utjecaj pepsina na nastanak tumora larinksa. Med. Jad. 2019; (Supl):39- 40. 5. Maleš J, Milanković SG, Šestak A, Bogović V, Abičić I, Prpić T. Usporedba endoskopske i standardne septoplastike. Medica Jadertina, 2020;50 (Suplement):27- 27.
5. Bogović V, Milanković S.G., Mihalj H, Zubčić Ž - Synonasal characteristics and quality of life by SNOT 22 in adult patients with nasal polyposis in KBC Osijek, 6. kongres Europski ORL -HNS u Milanu 2022.- E poster
6. Milanković SG, Bogović V, Šestak A, Zubčić Ž, Maleš J, Mihalj H. Zastupljenost anosmije i ageuzije u COVID pozitivnih bolesnika u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Med Jad 52 (2022) Supplement.Med Jad 52 (2022) Supplement
7. T Mendeš, A Včeva, Ž Zubčić, H Mihalj, J Maleš, V Bogović, S G Milanković - Prehrambene navike djece s laringofaringealnim refluksom i hipertrofijom adenotonzilarnog limfatičnog tkiva - poster na 12. međunarodnom znanstveno-stručnom skupu hranom do zdravlja u sekciji: dijetetika i dijetoterapija.
8. Aktivno sudjelovanje na Europskom rinološkom kongresu u Sofiji, Bugarska, 2023.

Usavršavanja:

Tijekom specijalizacije pohađa brojne domaće i međunarodne tečajeve:

Tečaj „Novi šivaći materijali, transplantati i lokalni režnjevi, Zagreb, 2017.

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, 2020.

Tečaj iz ugradnje govornih proteza: "Global Postlaryngectomy Rehabilitation Academy"; Nizozemska, Amsterdam, 2021. I 2023. Poljska

Tečaj odizanja slobodnih režnjeva – "International Course for Stepwise Flap Raising" Aachen, Njemačka, 2023.

12. PRILOZI

SNOT 22 upitnik kvalitete života s KRS+NP-om

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 uspavljivanje	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: _____