

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Mecanisme fiziopatogenetice în rinosinuzita cronică

Doctorand **Diana-Maria Gavriliu (Vlad)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Silviu Albu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

Error! Bookmark not defined.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Error! Bookmark not defined.

1. Rinosinuzita cronică

Error! Bookmark not defined.

1. 1. Generalități

Error! Bookmark not defined.

1. 2. Impactul biopsihosocial al rinosinuzitei cronice

Error! Bookmark not

defined.

1.2.1. Epidemiologie

Error! Bookmark not defined.

1.2.2. Impactul economic

Error! Bookmark not defined.

1.2.3. Impactul individual

Error! Bookmark not defined.

1.2.4. Complicațiile

Error! Bookmark not defined.

2. Fiziopatologia rinosinuzitei cronice

Error! Bookmark not defined.

2. 1. Generalități

Error! Bookmark not defined.

2. 2. Factori exogeni în rinosinuzita cronică

Error! Bookmark not defined.

2.2.1. Bacteriile

Error! Bookmark not defined.

2.2.2. Fungii

Error! Bookmark not defined.

2.2.3. Toxinele și tutunul

Error! Bookmark not defined.

2.2.4. Alergenii

Error! Bookmark not defined.

2. 3. Factori endogeni în rinosinuzita cronică

Error! Bookmark not defined.

2.3.1. Variațiile anatomice

Error! Bookmark not defined.

2.3.2. Bariera mecanică

Error! Bookmark not defined.

2.3.3. Imunitatea înăscută

Error! Bookmark not defined.

2.3.4. Imunitatea dobândită

Error! Bookmark not defined.

2.3.5. Remodelarea

Error! Bookmark not defined.

2. 4. Factori de risc și comorbidități pentru rinosinuzita cronică

Error!

Bookmark not defined.

3. Etiopatogenia rinosinuzitei cronice

Error! Bookmark not defined.

3. 1. Teoria fungică

Error! Bookmark not defined.

3. 2. Teoria superantigenilor (SAg)

Error! Bookmark not defined.

3. 3. Teoria biofilmelor microbiene

Error! Bookmark not defined.

3. 4. Teoria microbiotei sinusale

Error! Bookmark not defined.

3. 5. Teoria barierei imune

Error! Bookmark not defined.

3. 6. Teoria eicosanoizilor/leucotrienelor

Error! Bookmark not defined.

4. Tratamentul rinosinuzitei cronice

Error! Bookmark not defined.

4. 1. Tratamentul rinosinuzitei cronice fără polipi

Error! Bookmark not

defined.

4. 2. Tratamentul rinosinuzitei cronice cu polipi

Error! Bookmark not defined.

4. 3. Tratatamentul rinosinuzitei cronice fungice alergice **Error! Bookmark not defined.**

4. 4. Tendințe terapeutice actuale **Error! Bookmark not defined.**

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ **Error! Bookmark not defined.**

1. Obiectivele cercetării **Error! Bookmark not defined.**

2. Studiul 1. Rolul arginazei în patologia rinosinuzitei cronice **Error! Bookmark not defined.**

2.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**

2.2. Obiective **Error! Bookmark not defined.**

2.3. Material și metodă **Error! Bookmark not defined.**

2.4. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

2.5. Discuții **Error! Bookmark not defined.**

2.6. Concluzii **Error! Bookmark not defined.**

3. Studiul 2. Rolul osteopontinei în fiziopatologia rinosinuzitei cronice **Error! Bookmark not defined.**

3.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**

3.2. Obiective **Error! Bookmark not defined.**

3.3. Material și metodă **Error! Bookmark not defined.**

3.4. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

3.5. Discuții **Error! Bookmark not defined.**

3.6. Concluzii **Error! Bookmark not defined.**

4. Studiul 3. Biofilmele microbiene în rinosinuzita cronică **Error! Bookmark not defined.**

4.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**

4.2. Obiective **Error! Bookmark not defined.**

4.3. Material și metodă **Error! Bookmark not defined.**

4.4. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

4.5. Discuții **Error! Bookmark not defined.**

4.6. Concluzii **Error! Bookmark not defined.**

5. Studiul 4. Modificarea homeostaziei redox în rinosinuzita cronică experimentală la șobolani prin expunerea la ozon și efectul administrării unor antioxidanți naturali **Error! Bookmark not defined.**

5.1. Introducere **Error! Bookmark not defined.**

5.2. Obiective **Error! Bookmark not defined.**

5.3. Material și metodă **Error! Bookmark not defined.**

5.4. Rezultate **Error! Bookmark not defined.**

5.5. Discuții **Error! Bookmark not defined.**

5.6. Concluzii **Error! Bookmark not defined.**

6. Studiul 5. Modificarea homeostaziei redox în rinosinuzita cronică experimentală la șobolani prin expunerea la silice și efectul administrării unor antioxidanți naturali	Error! Bookmark not defined.
6.1. Introducere	Error! Bookmark not defined.
6.2. Obiective	Error! Bookmark not defined.
6.3. Material și metodă	Error! Bookmark not defined.
6.4. Rezultate	Error! Bookmark not defined.
6.5. Discuții	Error! Bookmark not defined.
6.6. Concluzii	Error! Bookmark not defined.
7. Concluzii generale	Error! Bookmark not defined.
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	Error! Bookmark not defined.
REFERINȚE	Error! Bookmark not defined.

INTRODUCERE

Rinosinuzita cronică este o inflamație simptomatică comună a tractului respirator superior, la nivelul mucoasei rinosinusale, cu o durată de peste 12 săptămâni, care afectează 1-15% din populația adultă și care are un impact negativ atât din punct de vedere individual, cât și socioeconomic.

Fiziopatologia bolii este complexă și multifactorială, condiționată de factori multipli:

- endogeni: variațiile anatomice, bariera mecanică, imunitatea înăscută și dobândită, anomalile metabolice;
- exogeni: bacteriile, fungii, aeropoluanții.

Deși mecanismele de producere și perpetuare ale inflamației locale sunt variate, tratamentul rinosinuzitei cronice este puțin individualizat și deseori de lungă durată. Acesta cuprinde irigații saline, antiinflamatoare steroidiene locale și sistemice, antibiotice, macrolide pe termen lung, eventual anihistaminice și tratament chirurgical (Functional endoscopic sinus surgery-FESS). Cu toate acestea, răspunsul la terapie este variabil și ne confruntăm în practica curentă cu un număr tot mai mare de pacienți, care nu răspund la tratamentul maximal aplicat. Având în vedere cele de mai sus, există o motivație puternică științifică de a continua cercetarea în acest domeniu, pentru o mai bună înțelegere a patogenezei rinosinuzitei cronice și dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare, care vor permite optimizarea îngrijirii acestor pacienți.

Astfel, în lucrarea de față, mi-am propus să studiez clinic și experimental mecanismele fiziopatogenetice mai puțin cunoscute, care ar putea fi implicate în rinosinuzita cronică și care ar putea servi la dezvoltarea de noi strategii terapeutice eficiente de îmbunătățire a rezultatelor curative.

Am urmărit, pe pacienți cu rinosinuzită cronică:

- expresia genică a arginazei și interleukinei 13;

- exprimarea osteopontinei;
- analiza bacteriologică și histopatologică a mucoasei rinosinusale;
- prezența biofilmelor microbiene.

Experimental, pe animale de laborator, la care am indus rinosinuzită cronică cu ozon și dioxid de siliciu, am urmărit:

- modificările homeostaziei redox la nivel seric și tisular în mucoasa sinusală;
- efectul suplimentării cu unii antioxidanți (quercitininul și vitamina E) asupra homeostaziei redox.

Cercetările au vizat și recomandări terapeutice, cum ar fi: influența crioterapiei și suplimentarea cu antioxidanți în tratamentul rinosinuzitei cronice.

CERCETAREA PERSONALĂ

Studiul 1. Rolul arginazei în patologia rinosinuzitei cronice

Obiective

Am urmărit, în mucoasa pacienților cu RSC:

- nivelele de exprimare ale arginazei 1 și 2,
- nivelele de exprimare ale interleukinei 13,
- nivelele de exprimare ale arginazei 1 și 2 și interleukinei 13 la diferitele subtipuri de pacienți RSC.

Material și metodă

Loturi

Am realizat un studiu prospectiv pe 94 pacienți internați în Departamentul de Otorinolaringologie al Spitalului Clinic CFR Cluj-Napoca, în perioada iunie - decembrie 2016. Pacienții au fost grupați în două loturi: un lot martor (n=29) și unul experimental (n= 65).

Pentru studiu, informarea a fost realizată pentru toți pacienții în legătură cu procedeele de evaluare și cele terapeutice aplicate, iar aceștia și-au dat acordul de participare, prin semnarea unui consimțământ informat. Prezentul studiu a fost aprobat și înregistrat la Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Criteriile de includere pentru lotul experimental au fost: pacienți diagnosticați cu RSC pe baza istoricului bolii, evaluării imagistice prin CT cranian și endoscopie nazală; pacienți la care tratamentul medicamentos administrat optimal nu s-a dovedit eficient necesitând tratament chirurgical.

Criteriile de includere în lotul martor au fost pacienți: care au fost diagnosticați cu deviație de sept nazal, fără o altă patologie rinosinusală asociată, fără teren alergic.

Criteriile de excludere ale pacienților au fost: fumători, vârsta sub 18 ani, afecțiuni acute respiratorii, imunocompromiși, afecțiuni autoimune sau vasculite, bolile predispozante la RSC: dischinezie ciliară primară/secundară (cu excepția

fibrozei chistice), administrarea de antibiotice sau corticosteroizi în ultimele 4 săptămâni anterior intervenției chirurgicale, non-compliance.

În baza de date au fost înregistrate datele demografice, simptomatologia, antecedentele, evoluția și tratamentele anterioare și actuale. Diagnosticul de astm bronșic a fost confirmat de un medic specialist pneumolog, pe baza criteriilor GINA. Testele Prick au fost efectuate, la toți pacienții, de către un medic specialist alergolog sau dermatolog, iar diagnosticul de alergii a fost stabilit pe baza ghidurilor clinice existente.

Tomografia computerizată (CT) craniană a fost realizată pentru toți pacienții și gradul de extindere al inflamației a fost apreciat pe baza rezultatelor imagistice, după sistemul Lund-Mackay.

Împărțirea pacienților a fost realizată pe criterii endoscopice, în cazuri cu RSC cu polipi nazali (CRSwNP) și RSC fără polipi (CRSsNP).

Am folosit în acest studiu clasificarea propusă de Han și col. și nu au fost înregistrate cazuri de rinosinuzită fungică sau fibroză chistică.

Recoltarea probelor biologice

S-a efectuat o analiză bacteriologică din secrețiile nazale, prin tehnica descrisă de Nadel, precum și analiza expresiei genice pentru ARG și IL-13, din ARN-ul extras din probele tisulare recoltate.

Pentru prelucrarea statistică, pentru datele dihotomice s-au folosit testele Chi-pătrat sau testul Fisher. Analiza datelor ordinale a fost realizată prin testul Kruskal-Wallis bilateral, urmat de Mann-Whitney U-test. În cazul distribuțiilor anormale, diferența de expresie genică între grupurile studiate a fost evaluată prin testul neparametric Kruskal-Wallis, urmat de testul Dunn pentru comparații multiple. Diferențele au fost considerate statistic semnificative la o valoare a lui $p < 0,05$.

Rezultate

Scorul CT este semnificativ crescut la pacienții cu RSC cu polipoză, față de cei fără polipoză.

Nivelul expresiei genice a ARG1 este scăzut la pacienții cu RSC și martorii control.

Nivelul expresiei genice a ARG2 este crescut semnificativ la pacienții cu RSC fără polipi, la cei non-alergici și non-astmatici și non-alergici non-astmatici, față de martori.

Nivelul expresiei genice a ARG2 este crescut semnificativ la pacienții cu sinuzită, comparativ cu cei fără sinuzită.

Nivelul expresiei genice a ARG2 este scăzut semnificativ la pacienții cu sinuzită și polipoză, față de cei cu sinuzită fără polipoză.

Nu s-au constatat modificări semnificative pentru ARG2 și IL-13 la pacienții alergici astmatici - non-astmatici, non-alergici astmatici vs. non-astmatici, non-astmatici și astmatici - alergici și non-alergici, astmatici vs. non-astmatici.

Expresia genică a ARG2 prezintă scăderi semnificative la pacienții non-astmatici - alergici vs. pacienții non-astmatici - non-alergici, la pacienții alergici față de cei non-alergici.

Expresia genică crescută a ARG2 la pacienții cu RSC susține implicația sa în patogeniza bolii. Expresia genică redusă a ARG1 și IL-13 la pacienții cu RSC exclude implicația lor în patogeniza bolii.

Studiul 2. Rolul osteopontinei în fiziopatologia rinosinuzitei cronice

Obiective

Am urmărit:

- gradul de exprimare a OPN în sinuzită, la nivelul mucoasei,
- interrelația dintre OPN și dezvoltarea locală de colonii bacteriene.

Material și metodă

Loturi

Am realizat un studiu prospectiv de tip caz-martor randomizat, în care au fost incluși 57 de pacienți, internați în perioada ianuarie - martie 2017 în cadrul Departamentului de Otorinolaringologie al Spitalului Clinic CFR Cluj-Napoca, în vederea tratamentului chirurgical rinosinusal, prin abord endoscopic. În lotul caz au fost incluși 28 de pacienți (n=28), iar în cel martor 29 de pacienți (n=29).

Criteriile de includere și excludere ale pacienților au fost similare cu cele menționate la Studiul 1.

Toți pacienții înrolați în studiu au fost informați în legătură cu procedurile inerente studiului, iar aceștia și-au dat acordul de participare prin semnarea unui consimțământ informat. Prezentul studiu a fost aprobat și înregistrat la Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Următoarele informații au fost introduse în baza de date pentru analiza statistică: date demografice, simptomatologia, antecedentele, evoluția și tratamentele anterioare și actuale ale pacienților, rezultatele examinărilor imagistice preoperatorii, eventuale detalii intraoperatorii. Diagnosticul de astm bronșic a fost realizat de către un medic specialist pneumolog la pacienții suspecți/deja cunoscuți pe baza criteriilor GINA care cuprind: mai mult de un simptom din următoarele (wheezing, dispnee, tuse) în special în cazul adulților, simptomatologia se înrăutățește noaptea sau dimineața devreme, simptomele variază în timp și ca intensitate, simptomele sunt declanșate de infecții virale, efort fizic, expunere la alergeni, modificări de climat, răs sau iritanți cum ar fi fum și mirosuri puternice. Un medic specialist alergolog sau dermatolog a realizat testele alergologice cutanate.

Ca tehnică imagistică de elecție pentru sinuzita este CT-ul cranian, iar rezultatele provenite de la aceasta au fost utilizate pentru determinarea gradului de extindere al inflamației conform sistemului Lund-Mackay.

Împărțirea pacienților a fost realizată pe criterii endoscopice în cazuri cu RSC cu polipi nazali (CRSwNP) și RSC fără polipi (CRSsNP).

Grupul caz a fost subîmpărțit, ca și în studiul precedent (Studiul 1), conform clasificării propuse de Han și col. în 5 subgrupuri distincte.

Recoltarea probelor biologice și analiza statistică

Analiza bacteriologică, a expresiei genice a OPN și analiza statistică s-au realizat similar cu cele descrise în Studiul 1.

Rezultate

Gradul de exprimare a OPN la pacienții cu sinuzită este semnificativ crescut față de pacienții fără sinuzită.

Nu se constată diferențe semnificative privind gradul de exprimare a OPN la pacienții alergici astmatici, față de cei non-astmatici; la pacienții non-alergici astmatici, față de cei non-astmatici; la pacienții non-astmatici alergici și non-alergici, la cei astmatici alergici, față de cei non-alergici și la cei astmatici, față de cei non-astmatici.

OPN a fost prezentă în cantități crescute la 35.7% din pacienții cu sinuzită, în culturi bacteriene, dar fără a fi semnificativă statistic. Dezvoltarea locală bacteriană nu este influențată semnificativ de OPN.

Studiul 3. Biofilmele microbiene în rinosinuzita cronică

Obiective

Am urmărit la pacienții cu rinosinuzită cronică cu și fără polipi:

- analiza bacteriologică a mucoasei respiratorii inflamate,
- analiza histopatologică a mucoasei rinosinusale în colorații cu hematoxilina eozină (HE) și albastru de toluidină (TB),
- prezența și analiza biofilmelor,
- influența crioterapiei spray asupra mucoasei rinosinusale *in vitro*.

Material și metodă

Loturi

Am realizat un studiu prospectiv, orb, comparativ, pe 23 de pacienți internați în Departamentul de Otorinolaringologie al Spitalului Clinic CFR Cluj-Napoca, în perioada decembrie 2016 – iunie 2017, cu diagnosticul de RSC bilaterală, cu (n=18) sau fără polipi nazali (n=5), care nu au răspuns la tratamentul medicamentos aplicat optimal, necesitând operația endoscopică a sinusurilor.

Pentru studiu, informarea a fost realizată pentru toți pacienții în legătură cu procedeele de evaluare și cele terapeutice aplicate, iar aceștia și-au dat acordul de participare prin semnarea unui consimțământ informat. Prezentul studiu a fost aprobat și înregistrat la Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

S-au respectat criteriile de includere și excludere în studiu, menționate în Studiul 1.

Datele medicale privind statusul alergic, astmul bronșic, intoleranța la aspirină, operația endoscopică a sinusurilor în antecedente, tratamentul topic cu steroizi și tratamentul antibiotic sistemic au fost documentate anterior operației. Extinderea bolii a fost evaluată prin tomografie computerizată și clasificată conform scorului de severitate Lund-Mackay.

Analiza probelor biologice și analiza statistică

S-a realizat analiza bacteriologică, din mucoasa respiratorie inflamată, analiza histopatologică și analiza biofilmelor, a căror identificarea și descriere a fost bazată pe prezența morfologiei caracteristice a microcoloniilor la examinarea prin microscopie optică și de prezența stratului de polizaharide înconjurător.

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului statistic SPSS (PASW statistics for Windows, Version 20.0, Chicago: SPSS Inc. USA). Datele adunate au fost analizate utilizând statistici descriptive și statistici inferențiale, după caz. Pentru testele statistice o valoare a lui $p < 0,05$, a fost considerată semnificativă.

Rezultate

Culturile bacteriene pozitive se corelează cu prezența biofilmelor.

Colorațiile histologice cu HE și TB se corelează la pacienții cu RSC, care sunt pozitivi pentru biofilme. Utilizarea colorației cu TB permite identificarea facilă a biofilmelor.

Prezența biofilmelor este asociată cu un infiltrat inflamator semnificativ și distrucție tisulară. Biofilmele sunt implicate în patogeneza RSC și în procesul inflamator în cazurile refractare la tratamentele curente cu antibiotice și persistența simptomelor.

Crioterapia spray *in vitro* asupra mucoasei rinossinuzale contribuie la reducerea semnificativă a biofilmelor rezistente la antibiotice.

Studiul 4. Modificarea homeostaziei redox în rinossinuzita cronică experimentală la șobolani prin expunerea la ozon și efectul administrării unor antioxidanți naturali

Obiective

Am urmărit pe un model experimental de RSC indusă prin expunerea la O_3 :

- modificările balanței O/AO la nivel seric;
- efectul administrării unor AO naturali, quercetin și gama-tocoferol (vitamină E), asupra balanței O/AO;
- modificările enzimelor antioxidante: superoxid dismutaza și catalaza la nivel eritrocitar și tisular, în mucoasa sinusurilor nazale.

•

Material și metodă

Loturi

În acest studiu experimental, prospectiv, desfășurat în perioada iunie 2018 - iulie 2018, în Centrul de Cercetare al Disciplinei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, s-au utilizat șobolani care au provenit de la Biobaza "Centrului de Medicină Experimentală" a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Înainte de începerea experimentului toate animalele au fost menținute pentru aclimatizare în condiții de vivarium adecvate timp de 10 zile. Animalele au beneficiat de o dietă normocalorică, standardizată și apă ad libitum, pe toată durata experimentului și au fost cântărite la începutul și la sfârșitul experimentului.

Șobolanii au fost sănătoși pe baza rapoartelor de sănătate și patologie oferite de furnizor.

Studiul experimental s-a desfășurat pe 6 loturi de animale (n=10 șobolani/lot), șobolani albi în vârstă de 12 săptămâni de gen masculin, rasa Wistar cu greutatea cuprinsă între 180-200 grame. Împărțirea pe loturi s-a făcut după cum urmează:

Lotul I (martor, M+SF) format din șobolani menținuți în condiții normale (M) și tratați cu carboximetilceluloză (CMC).

Lotul II (martor, M+vit. E) format din șobolani menținuți în condiții normale (M) și tratați cu vitamină E (vit. E).

Lotul III (martor, M+Que) format din șobolani menținuți în condiții normale (M) și tratați cu quercetin (Que).

Lotul IV (RSO+CMC) format din șobolani cu rinosinuzită, produsă prin expunerea cronică la O₃ (RSO) și tratați cu CMC.

Lotul V (RSO+vit. E) format din șobolani cu rinosinuzită, produsă prin expunerea cronică la O₃ (RSO) și tratați cu vit. E.

Lotul VI (RSO+Que) format din șobolani cu rinosinuzită, produsă prin expunerea cronică la O₃ (RSO) și tratați cu Que.

S-a realizat inducerea rinosinuzitei cu ozon (loturile IV-VI), administrarea de antioxidanți naturali (gama-tocoferolul - vitamina E și quercetinul), determinarea indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți (la sfârșitul experimentului, după sedare și inhalare de eter etilic, la toate animalele luate în studiu s-a recoltat sânge venos pe anticoagulant (EDTA) prin puncția sinusului retroorbital) și dozarea indicatorilor în ser și omogenatul tisular (dozarea malondialdehidei totale prin fluorescență și determinarea glutatationului redus).

Determinarea activității enzimelor antioxidante din lizatul eritrocitar și omogenatele tisulare s-a realizat prin obținerea lizatului eritrocitar, determinarea superoxid dismutazei și a catalazei.

Prelucrarea statistică s-a efectuat cu programul StatsDirect v.2.7.2. Reprezentarea grafică a rezultatelor s-a făcut cu aplicația Excel, din pachetul Microsoft Office 2010.

Rezultate

Expunerea cronică intermitentă a animalelor la O_3 , prin inhalare, determină creșteri ale SO la nivel seric și tisular în țesutul nazal, concomitent cu scăderea capacității de apărare AO la nivel seric, eritrocitar și tisular.

Asocierea expunerii cronice intermitente la O_3 , cu suplimentarea de antioxidanți naturali, determină scăderi semnificative ale SO la nivel seric și tisular în țesutul nazal, concomitent cu creșteri ale capacității de apărare AO la nivel seric, eritrocitar și tisular, față de martori.

Suplimentarea cu Que determină efecte de scădere semnificativă a SO, care sunt superioare celor produse de suplimentarea cu vit. E, cu creșteri semnificative ale apărării AO, la animalele expuse intermitent la O_3 .

Stresul oxidativ poate fi implicat în mecanismul fiziopatologic redox al RSC experimentale induse cu O_3 .

Expunerea la O_3 poate fi un model valid pentru studiul experimental al RSC.

Studiul 5. Modificarea homeostaziei redox în rinosinuzita cronică experimentală la șobolani prin expunerea la silice și efectul administrării unor antioxidanți naturali

Obiective

Am urmărit pe un model experimental de RSC indusă prin instilarea intranasală de dioxid de siliciu (SiO_2) sau silice:

- modificările balanței O/AO la nivel seric;
- efectul administrării unor AO naturali, quercetin și gama-tocoferol (vitamină E), asupra balanței O/AO;
- modificările enzimelor antioxidante: SOD și CAT la nivel eritrocitar și tisular, în mucoasa sinusurilor nazale.

•

Material și metodă

Loturi

În acest studiu experimental, prospectiv, desfășurat în perioada iunie 2018 - iulie 2018, în Centrul de Cercetare al Disciplinei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, s-au utilizat șobolani care au provenit de la Biobaza "Centrului de Medicină Experimentală" a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Înainte de începerea experimentului toate animalele au fost menținute pentru aclimatizare în condiții de vivarium adecvate timp de 10 zile. Animalele au beneficiat de o dietă normocalorică, standardizată și apă ad libitum, pe toată durata experimentului și au fost cântărite la începutul și la sfârșitul experimentului.

Șobolani au fost sănătoși pe baza rapoartelor de sănătate și patologie oferite de furnizor.

Studiul experimental s-a desfășurat pe 6 loturi de animale (n=10 șobolani/lot), șobolani albi în vârstă de 12 săptămâni de gen masculin, rasa Wistar cu greutatea cuprinsă între 180-200 grame. Împărțirea pe loturi s-a făcut după cum urmează:

Lotul I (martor, M+CMC) format din șobolani la care s-a instilat intranazal ser fiziologic și care au fost tratați cu carboximetilceluloză (CMC).

Lotul II (martor, M+vit E) format din șobolani la care s-a instilat intranazal ser fiziologic și care au fost tratați cu vitamină E (vit E).

Lotul III (martor, M+Que) format din șobolani la care s-a instilat intranazal ser fiziologic și care au fost tratați cu quercetin (Que).

Lotul IV (RSS+CMC) format din șobolani cu rinosinuzită, produsă prin instilarea intranazală de dioxid de siliciu (SiO₂) sau silice (52,5%) (RSS) și tratați cu CMC.

Lotul V (RSS+vit E) format din șobolani cu rinosinuzită, produsă prin instilarea intranazală de dioxid de siliciu (SiO₂) sau silice (52,5%) (RSS) și tratați cu vit E.

Lotul VI (RSS+Que) format din șobolani cu rinosinuzită, produsă prin instilarea intranazală de dioxid de siliciu (SiO₂) sau silice (52,5%) (RSS) și tratați cu Que.

Animalelor din loturile IV-VI li s-a indus rinosinuzită prin instilarea intranazală (IN) de dioxid de siliciu (SiO₂) sau silice 52,5%.

S-au determinat indicatorii balanței O/AO, conform metodologiei prezentate la **Studiul 4** (dozarea indicatorilor în ser și omogenatul tisular, determinarea activității enzimelor antioxidante din lizatul eritrocitar și omogenatele tisulare), iar metodele statistice utilizate sunt similare cu cele menționate la **Studiul 4**.

Rezultate

Rinosinuzita cronică indusă prin instilarea nazală de silice determină creșterea SO la nivel seric și tisular, concomitent cu scăderea apărării AO la nivel seric, eritrocitar și tisular.

Suplimentarea cu AO naturali la animalele cu RSC experimentală cu silice nu are efecte asupra scăderii SO la nivel seric și determină scăderi ale apărării AO la nivel seric, eritrocitar și tisular, față de martori.

Suplimentarea cu vit. E are efecte mai mari de scădere a SO la nivel seric și tisular și de creștere a apărării AO la nivel seric, eritrocitar și tisular, comparativ cu Que.

Stresul oxidativ poate fi implicat în mecanismul fiziopatologic redox al RSC experimentale induse cu SiO₂.

Instilarea nazală cu silice poate fi un model valid pentru studiul experimental al RSC.

Concluzii generale

Expresia genică a ARG2, crescută semnificativ la pacienții cu RSC fără polipi, non-alergici și non-astmatici și non-alergici non-astmatici, la pacienții cu sinuzită și polipoză pledează pentru implicația sa în patogeneza bolii.

Osteopontina este crescută semnificativ la pacienții cu sinuzită. Dezvoltarea bacteriană locală nu este influențată semnificativ de osteopontină.

Culturile bacteriene pozitive sunt asociate cu prezența biofilmelor de la nivelul mucoasei respiratorii inflamate la pacienții cu RSC, cu și fără polipi. Biofilmele pot fi implicate în patogeneza RSC.

Biofilmele rezistente la antibiotice pot fi reduse semnificativ prin crioterapia spray *in vitro*.

Expunerea cronică experimentală la O₃ și la silice determină creșterea SO la nivel seric și tisular în țesutul nazal, ceea ce pledează pentru implicarea mecanismului redox în procesul fiziopatologic al RSC.

Suplimentarea cu quercetin are efecte semnificativ favorabile, în scăderea SO la nivel seric și tisular, în RSC indusă experimental cu O₃.

Suplimentarea cu vitamină E nu are efecte favorabile la nivel seric de scădere a SO în RSC indusă experimental cu silice, dar are efecte la nivel tisular.

Crioterapia și suplimentele de quercetin ar putea fi recomandate în tratamentul RSC.

Studiile noastre pledează pentru necesitatea clasificării pe baza unor criterii cât mai adecvate a pacienților cu RSC, datorită patogenezei complexe, a diversității mecanismelor imune și a factorilor etiologici.

Bibliografie selectivă

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl.* 2012;23:1-298.
2. Bhattacharyya N, Lee LN. Evaluating the diagnosis of chronic rhinosinusitis based on clinical guidelines and endoscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;143(1):147-151.
3. Rosenfeld RM, Piccirillo FJ, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 Apr;152(2 Suppl):S1-S39.
10. Kennedy JL, Hubbard MA, Huyett P, Patrie JT, Borish L, Payne SC. Sino-nasal Outcome Test (SNOT-22): A predictor of post-surgical improvement in patients with chronic sinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013 Oct;111(4):246-251.
12. Likness MM, Pallanch JF, Sherris DA, Kita H, Mashtare TL Jr, Ponikau JU. Computed Tomography Scans as an Objective Measure of Disease Severity in Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Feb;150(2):305-311.
13. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993;107:183-184.
15. Han JK. Laryngoscope. Subclassification of chronic rhinosinusitis. 2013 Mar;123 Suppl 2:S15-S27.
19. Cho SH, Kim DW, Gevaert P. Chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;4:575-582.
20. Steinke JW, Borish L. Chronic rhinosinusitis phenotypes. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;117:234-240.

22. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis Executive Summary. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016;6 Suppl 1: S3-S21.
56. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Robbins KT, Thomas JR, et al. *Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery E-Book - Sixth edition, 2014.*
63. Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infectious Diseases* 2013;13:210.
107. London NR Jr., Tharakan A, Ramanathan M Jr. The Role of Innate Immunity and Aeroallergens in Chronic Rhinosinusitis. *Adv Otorhinolaryngol.* 2016;79:69-77.
109. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH, Smith TL, Alt JA, Baroody FM, et al. International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016; 6(suppl 1):S22-S209.
146. Kim JH, Choi GE, Lee BJ, Kwon SW, Lee SH, Kim HS, et al. Natural killer cells regulate eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Sci Rep.* 2016;6:27615.
180. Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2015;64:121-130.
183. Tan BK, Klingler AI, Poposki JA, Stevens WW, Peters AT, Suh LA, et al. Heterogeneous inflammatory patterns in chronic rhinosinusitis without nasal polyps in Chicago, Illinois. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:699-703.
185. Tan BK, Min JY, Hulse KE. Acquired Immunity in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17:49.
208. Liu WL, Zhang H, Zheng Y, Wang HT, Chen FH, Xu L, et al. Expression and regulation of osteopontin in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Allergy.* 2015 Feb;45(2):414-422.
218. Mahdavinia M, Keshavarzian A, Tobin MC, Landay AL, Schleimer RP. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS). *Clin Exp Allergy.* 2016 Jan;46(1):21-41.
246. Cho WS, Kim TH, Kim KH, Lee HM, Lee SH, Ju YH, et al. - Increased Expression of Arginase I and II in Allergic Nasal Mucosa. *Laryngoscope,* 2011;121:236-240.
253. Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012;130(4):829-842.
255. Vlad D, Trombitas V, Capusan M, Albu S. The role of nitric oxide in chronic rhinosinusitis. *Romanian Journal of Rhinology.* 2015;5(19):135-141.
256. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention,* 2017. Available from: www.ginaasthma.org.
271. Taruya T, Takeno S, Kubota K, Sasaki A, Ishino T, Hirakawa K. Comparison of arginase isoform expression in patients with different subtypes of chronic rhinosinusitis. *J*

- Laryngol Otol. 2015;129(12):1194-200.
307. Ramakrishnan Y, Shields RC, Elbadawey MR, Wilson JA. Biofilms in chronic rhinosinusitis: what is new and where next? J Laryngol Otol. 2015 Aug;129(8):744-751.
322. Vlad D, Dutu A, Apostol A, Trombitas V, Mihalca A, Albu S. The Effect of Spray Cryotherapy on Microbial Biofilms in Chronic Rhinosinusitis. Current Infectious Disease Reports. 2018;20:41.
345. Asher BF, Guilford FT. Oxidative Stress and Low Glutathione Ear, Nose, and Throat Conditions: A Systematic Review. Altern Ther Health Med. 2016 Sep;22(5):44-50.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Physiopathogenetic mechanisms in chronic rhinosinusitis

Doctoral candidate **Diana-Maria Gavriliu (Vlad)**

Doctoral supervisor **Prof. Dr. Silviu Albu**



CONTENTS

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	19
1. Chronic rhinosinusitis	21
1. 1. General aspects	21
1. 2. The biopsychosocial impact of chronic rhinosinusitis	23
1.2.1. Epidemiology	23
1.2.2. Economic impact	23
1.2.3. Individual impact	23
1.2.4. Complications	24
2. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis	25
2. 1. General aspects	25
2. 2. Exogenous factors in chronic rhinosinusitis	26
2.2.1. Bacteria	26
2.2.2. Fungi	26
2.2.3. Toxins and tobacco	27
2.2.4. Allergens	27
2. 3. Endogenous factors in chronic rhinosinusitis	28
2.3.1. Anatomical variations	28
2.3.2. The mechanical barrier	28
2.3.3. Innate immunity	29
2.3.4. Acquired immunity	32
2.3.5. Remodeling	34
2. 4. Risk factors and comorbidities of chronic rhinosinusitis	35
3. Etiopathogenesis of chronic rhinosinusitis	37
3. 1. The fungal theory	37
3. 2. The superantigen (SAg) theory	37
3. 3. The microbial biofilm theory	38
3. 4. The sinus microbiota theory	38
3. 5. The immune barrier theory	38
3. 6. The eicosanoid/leukotriene theory	39
4. Treatment of chronic rhinosinusitis	41
4. 1. Treatment of chronic sinusitis without polyps	41
4. 2. Treatment of chronic rhinosinusitis with polyps	41
4. 3. Treatment of chronic allergic fungal rhinosinusitis	42
4. 4. Current therapeutic trends	42

PERSONAL CONTRIBUTION	45
1. Objectives of the research	47
2. Study 1. The role of arginase in the pathology of chronic rhinosinusitis	49
2.1. Introduction	49
2.2. Objectives	51
2.3. Material and method	51
2.4. Results	54
2.5. Discussions	65
2.6. Conclusions	68
3. Study 2. The role of osteopontin in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis	69
3.1. Introduction	69
3.2. Objectives	70
3.3. Material and method	70
3.4. Results	71
3.5. Discussions	77
3.6. Conclusions	78
4. Study 3. Microbial biofilms in chronic rhinosinusitis	79
4.1. Introduction	79
4.2. Objectives	81
4.3. Material and method	81
4.4. Results	83
4.5. Discussions	87
4.6. Conclusions	89
5. Study 4. The alteration of redox homeostasis in experimental chronic rhinosinusitis in rats by ozone exposure and the effect of administration of some natural antioxidants	91
5.1. Introduction	91
5.2. Objectives	92
5.3. Material and method	92
5.4. Results	97
5.5. Discussions	109
5.6. Conclusions	112
6. Study 5. The alteration of redox homeostasis in experimental chronic rhinosinusitis in rats by silica exposure and the effect of administration of some natural antioxidants	113
6.1. Introduction	113
6.2. Objectives	113
6.3. Material and method	113
6.4. Results	116
6.5. Discussions	129

6.6. Conclusions	131
7. General conclusions	133
8. Originality and innovative contributions of the thesis	135
REFERENCES	137

INTRODUCTION

Chronic rhinosinusitis is a common symptomatic inflammation of the upper airways, involving the rhinosinusal mucosa, which lasts more than 12 weeks. It affects 1-15% of the adult population and has a negative individual as well as socio-economic impact.

The pathophysiology of the disease is complex, being conditioned by multiple factors:

- endogenous: anatomic variations, the mechanical barrier, innate and acquired immunity, metabolic abnormalities;
- exogenous: bacteria, fungi, air pollutants.

Although the mechanisms of initiation and perpetuation of local inflammation are varied, the treatment of chronic rhinosinusitis is little individualized and frequently of long duration. This comprises saline irrigation, local and systemic anti-inflammatory steroid drugs, antibiotics, long-term macrolides, possibly antihistaminic drugs and functional endoscopic sinus surgery - FESS. However, therapeutic response is variable and in current practice, an increasing number of patients do not respond to the maximum treatment applied. Given the above mentioned facts, there is a strong scientific motivation to continue research in this area, in order to better understand the pathogenesis of chronic rhinosinusitis and to develop innovative therapeutic strategies, which will allow optimizing health care for these patients.

In this thesis, we aimed to clinically and experimentally study the less known pathophysiological mechanisms that could be involved in chronic rhinosinusitis and might allow developing new effective therapeutic strategies for the improvement of curative results.

The following were investigated in patients with chronic rhinosinusitis:

- arginase and interleukin 13 gene expression;
- osteopontin expression;
- the bacteriological and histopathological analysis of the rhinosinusal mucosa;
- the presence of microbial biofilms.

Experimentally, in laboratory animals in which we induced chronic rhinosinusitis by ozone and silica dioxide, we monitored:

- the changes in redox homeostasis in serum and sinus mucosal tissue;
- the effect of supplementation with some antioxidants (quercetin and vitamin E) on redox homeostasis.

The research was also aimed at making therapeutic recommendations, such as: the influence of cryotherapy and antioxidant supplementation in the treatment of chronic rhinosinusitis.

PERSONAL RESEARCH

Study 1. The role of arginase in the pathology of chronic rhinosinusitis

Objectives

The following were investigated in the mucosa of patients with CRS:

- arginase 1 and 2 expression levels,
- interleukin 13 expression levels,
- arginase 1 and 2 and interleukin 13 expression levels in different subtypes of CRS patients.

Material and method

Groups

A prospective study was conducted on 94 patients admitted to the Department of Otorhinolaryngology of the Railway Clinical Hospital Cluj-Napoca, in the period June – December 2016. The patients were assigned to two groups: a control group (n=29) and an experimental group (n=65).

For the study, all patients were informed about the evaluation and therapeutic procedures used, and they gave their consent to participate in the study by signing an informed consent. The current study was approved and registered by the Ethics Committee of “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The inclusion criteria for the experimental group were: patients diagnosed with CRS based on disease history, imaging by cranial CT and nasal endoscopy; patients in whom the optimally administered drug therapy proved ineffective and surgical treatment was required.

The inclusion criteria for the control group were: patients diagnosed with nasal septum deviation, without other associated rhinosinusal pathology, without an allergic background.

The patients' exclusion criteria were: smokers, age under 18 years, acute respiratory infections, immunocompromised patients, autoimmune disorders or vasculitis, diseases predisposing to CRS: primary/secondary ciliary dyskinesia (except for cystic fibrosis), administration of antibiotics or corticosteroids within 4 weeks prior to surgery, non-compliance.

Demographic data, symptoms, history, evolution, and previous and current treatments were recorded in the database. The diagnosis of bronchial asthma was confirmed by a pneumologist, based on GINA criteria. Prick tests were performed for all patients by an allergist or a dermatologist, and the diagnosis of allergy was established based on available clinical guidelines.

Cranial computed tomography (CT) was carried out for all patients, and the extension of inflammation was assessed based on imaging results, according to the Lund-Mackay system.

The patients were divided based on endoscopic criteria into cases with CRS with nasal polyps (CRSwNP) and CRS without polyps (CRSSNP).

We used in this study the classification proposed by Han et al., and no cases of fungal rhinosinusitis or cystic fibrosis were recorded.

Biological sample collection

Bacteriological analysis of nasal secretions was performed using the technique described by Nadel, and gene expression analysis for ARG and IL-13 was carried out on the RNA extracted from the collected tissue samples.

For statistical processing, the chi-square test or Fisher's test was used for dichotomous data. Ordinal data analysis was conducted using the two-way Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney U-test. In the case of abnormal distributions, the difference in gene expression between the studied groups was assessed by the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant for a p value <0.05.

Results

The CT score significantly increased in patients with CRS with polyposis compared to those without polyposis.

The ARG1 gene expression level decreased in patients with CRS and controls.

The ARG2 gene expression level significantly increased in non-allergic and non-asthmatic patients and in non-allergic non-asthmatic patients with CRS without polyps, compared to controls.

The ARG2 gene expression level significantly increased in patients with sinusitis compared to those without sinusitis.

The ARG2 gene expression level significantly decreased in patients with sinusitis and polyposis compared to those with sinusitis without polyposis.

There were no significant ARG2 and IL-13 changes in allergic asthmatic – non-asthmatic, non-allergic asthmatic vs. non-asthmatic, non-asthmatic and asthmatic – allergic and non-allergic, asthmatic vs. non-asthmatic patients.

The ARG2 gene expression level showed significant decreases in allergic non-asthmatic vs. non-allergic non-asthmatic patients, in allergic vs. non-allergic patients.

The increased expression of the ARG2 gene in patients with CRS supports its implication in the pathogenesis of the disease. The reduced expression of ARG1 and IL-13 in patients with CRS excludes their implication in the pathogenesis of the disease.

Study 2. The role of osteopontin in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis

Objectives

The following were investigated:

- the OPN expression level in the mucosa, in sinusitis,
- the interrelation between OPN and the local development of bacterial colonies.

Material and method

Groups

We conducted a prospective randomized case-control study on 57 patients admitted to the Department of Otorhinolaryngology of the Railway Clinical Hospital Cluj-Napoca in the period January – March 2017, for rhinosinusitis surgical treatment, by endoscopic approach. The case group included 28 patients (n=28), and the control group comprised 29 patients (n=29).

Patient inclusion and exclusion criteria were similar to those mentioned in Study 1.

All patients enrolled in the study were informed about the procedures of the study, and they gave their consent for participation by signing an informed consent. The current study was approved and registered by the Ethics Committee of “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The following information was introduced in the database for statistical analysis: demographic data, symptomatology, history, evolution, and previous and current treatments of the patients, results of preoperative imaging examinations, possible intraoperative details. The diagnosis of bronchial asthma was established by a pneumologist in suspected/already known patients based on GINA criteria including: more than one symptom of the following (wheezing, dyspnea, cough) in the case of adults in particular, symptoms worsening at night or early in the morning, symptoms varying in time and intensity, symptoms triggered by viral infections, exercise, exposure to allergens, climate changes, laughter or irritating agents such as smoke and strong odors. An allergist or a dermatologist performed the skin allergy tests.

The imaging technique of choice for sinusitis is cranial CT, and its results were used to determine the extension of inflammation according to the Lund-Mackay system.

The patients were divided based on endoscopic criteria into cases with CRS with nasal polyps (CRS_{NP}) and CRS without polyps (CRS_{NP}).

Like in the previous study (Study 1), the case group was subdivided into 5 distinct subgroups, according to the classification proposed by Han et al.

Biological sample collection and statistical analysis

Bacteriological analysis, OPN gene expression analysis and statistical analysis were conducted similarly to those described in Study 1.

Results

OPN expression in patients with sinusitis was significantly increased compared to patients without sinusitis.

There were no significant differences regarding OPN expression in allergic asthmatic compared to non-asthmatic patients; in non-allergic asthmatic compared to non-asthmatic patients; in non-asthmatic allergic compared to non-allergic patients; in asthmatic allergic compared to non-allergic patients; and in asthmatic compared to non-asthmatic patients.

OPN was present in high amounts in 35.7% of patients with sinusitis, in bacterial cultures, but without being statistically significant. Local bacterial development was not significantly influenced by OPN.

Study 3. Microbial biofilms in chronic rhinosinusitis

Objectives

The following were studied in patients with chronic rhinosinusitis with and without polyps:

- the bacteriological analysis of the inflamed respiratory mucosa,
- the histopathological analysis of the rhinosinusal mucosa with hematoxylin-eosin (HE) and toluidine blue (TB) staining,
- the presence and analysis of biofilms,
- the influence of spray cryotherapy on the rhinosinusal mucosa *in vitro*.

Material and method

Groups

A comparative prospective blind study was conducted on 23 patients admitted to the Department of Otorhinolaryngology of the Railway Clinical Hospital Cluj-Napoca in the period December 2016 – June 2017, with the diagnosis of bilateral CRS, with (n=18) and without nasal polyps (n=5), who did not respond to optimally administered drug therapy and required endoscopic sinus surgery.

For the study, all patients were informed about the evaluation and therapeutic procedures used, and they gave their consent to participate in the study by signing an informed consent. The current study was approved and registered by the Ethics Committee of “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The inclusion and exclusion criteria mentioned in Study 1 were applied.

Medical data regarding allergy status, bronchial asthma, aspirin intolerance, history of endoscopic sinus surgery, topical steroid treatment and systemic antibiotic treatment were documented prior to surgery. Disease extension was assessed by computed tomography and classified according to the Lund-Mackay severity score.

Biological sample analysis and statistical analysis

Bacteriological analysis of the inflamed respiratory mucosa and histopathological analysis were performed, as well as an analysis of biofilms, which

were identified and described based on the presence of characteristic microcolony morphology under optical microscopy and on the presence of the surrounding polysaccharide layer.

Statistical analysis was performed using SPSS statistical software (PASW statistics for Windows, Version 20.0, Chicago: SPSS Inc. USA). The collected data were analyzed using descriptive statistics and differential statistics, depending on the case. For statistical tests, a p value <0.05 was considered significant.

Results

Positive bacterial cultures were correlated with the presence of biofilms.

Histological HE and TB stains were correlated in biofilm-positive patients with CRS. Using TB stain allowed an easy identification of biofilms.

The presence of biofilms was associated with significant inflammatory infiltrate and tissue damage. Biofilms were involved in CRS pathogenesis and in the inflammatory process in cases refractory to current antibiotic treatments, with persistent symptoms.

Spray cryotherapy *in vitro* contributed to a significant reduction of antibiotic-resistant biofilms on the rhinosinusal mucosa.

Study 4. The alteration of redox homeostasis in experimental chronic rhinosinusitis in rats by ozone exposure and the effect of administration of some natural antioxidants

Objectives

We monitored the following in an experimental model of CRS induced by exposure to O₃:

- changes in the serum O/AO balance;
- the effect of administration of natural AO, quercetin and gamma-tocopherol (vitamin E), on the O/AO balance;
- changes in antioxidant enzymes: superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and nasal sinus mucosal tissues.

Material and method

Groups

This prospective experimental study, conducted at the Research Center of the Physiology Department of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca in the period June 2018 – July 2018, used rats from the Biobase of the Experimental Medicine Center of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca. Before starting the experiment, all animals were kept for acclimatization under adequate vivarium conditions for 10 days. The animals received a standardized normocaloric diet and water ad libitum throughout the experiment, and they were weighed at the beginning and at the end of the experiment.

The rats were healthy based on the health and pathology reports provided by the supplier.

The experimental study was carried out on 6 groups of animals (n=10 rats/group), white male Wistar rats aged 12 weeks, with a weight of 180-200 grams. Group assignment was as follows:

Group I (control, M+CMC), formed by rats kept under normal conditions (M) and treated with carboxymethylcellulose (CMC).

Group II (control, M+vit E), formed by rats kept under normal conditions (M) and treated with vitamin E (vit E).

Group III (control, M+Que), formed by rats kept under normal conditions (M) and treated with quercetin (Que).

Group IV (RSO+CMC), formed by rats with rhinosinusitis induced by chronic exposure to O₃ (RSO), treated with CMC.

Group V (RSO+vit E), formed by rats with rhinosinusitis induced by chronic exposure to O₃ (RSO), treated with vit E.

Group VI (RSO+Que), formed by rats with rhinosinusitis induced by chronic exposure to O₃ (RSO), treated with Que.

Induction of rhinosinusitis by ozone (groups IV-VI), administration of natural antioxidants (gamma-tocopherol - vitamin E and quercetin), determination of oxidant/antioxidant balance indicators (at the end of the experiment, after sedation and inhalation of ethyl ether, venous blood from all animals included in the study was collected on anticoagulant (EDTA) by puncture of the retro-orbital sinus), and measurement of serum and tissue homogenate indicators (determination of total malondialdehyde by fluorescence and measurement of reduced glutathione) were performed.

The activity of antioxidant enzymes in the erythrocyte lysate and tissue homogenates was determined by obtaining the erythrocyte lysate and measuring superoxide dismutase and catalase.

Statistical processing was carried out using StatsDirect v.2.7.2 software. The results were graphically represented via the Excel application of Microsoft Office 2010.

Results

Chronic intermittent exposure of animals to O₃, by inhalation, causes an increase in serum and nasal tissue OS, concomitantly with a decrease in serum, erythrocyte and tissue AO defense.

Chronic intermittent exposure to O₃ associated with natural antioxidant supplementation induces a significant decrease in serum and nasal tissue OS, concomitantly with an increase in serum, erythrocyte and tissue AO defense, compared to controls.

Quercetin supplementation results in a significant decrease in OS, which is more pronounced than that induced by vitamin E supplementation, with a significant increase in AO defense, in animals intermittently exposed to O₃.

Oxidative stress may be involved in the pathophysiological redox mechanism of experimental CRS induced by O₃.

O₃ exposure can be a valid model for the experimental study of CRS.

Study 5. The alteration of redox homeostasis in experimental chronic rhinosinusitis in rats by silica exposure and the effect of administration of some natural antioxidants

Objectives

The following were monitored in an experimental model of CRS induced by intranasal instillation of silica dioxide (SiO₂) or silica:

- changes in the serum O/AO balance;
- the effect of administration of natural AO, quercetin and gamma-tocopherol (vitamin E), on the O/AO balance;
- changes in antioxidant enzymes: SOD and CAT in erythrocytes and nasal sinus mucosal tissues.

Material and method

Groups

This prospective experimental study, conducted at the Research Center of the Physiology Department of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca in the period June 2018 – July 2018, used rats from the Biobase of the Experimental Medicine Center of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca. Before starting the experiment, all animals were kept for acclimatization under adequate vivarium conditions for 10 days. The animals received a standardized normocaloric diet and water ad libitum throughout the experiment, and they were weighed at the beginning and at the end of the experiment.

The rats were healthy based on the health and pathology reports provided by the supplier.

The experimental study was carried out on 6 groups of animals (n=10 rats/group), white male Wistar rats aged 12 weeks, with a weight of 180-200 grams. Group assignment was as follows:

Group I (control, M+CMC), formed by rats that were intranasally instilled with physiological serum and treated with carboxymethylcellulose (CMC).

Group II (control, M+vit E), formed by rats that were intranasally instilled with physiological serum and treated with vitamin E (vit E).

Group III (control, M+Que), formed by rats that were intranasally instilled with physiological serum and treated with quercetin (Que).

Group IV (RSS+CMC), formed by rats with rhinosinusitis induced by intranasal instillation of silica dioxide (SiO₂) or silica (52.5%) (RSS), treated with CMC.

Group V (RSS+vit E), formed by rats with rhinosinusitis induced by intranasal instillation of silica dioxide (SiO₂) or silica (52.5%) (RSS), treated with vit E.

Group VI (RSS+Que), formed by rats with rhinosinusitis induced by intranasal instillation of silica dioxide (SiO₂) or silica (52.5%) (RSS), treated with Que.

In the animals of groups IV-VI, rhinosinusitis was induced by intranasal instillation (IN) of silica dioxide (SiO₂) or silica 52.5%.

The O/AO balance indicators were determined according to the methods presented in **Study 4** (measurement of serum and tissue homogenate indicators, determination of the activity of antioxidant enzymes in the erythrocyte lysate and tissue homogenates), and the statistical methods used were similar to those mentioned in **Study 4**.

Results

Chronic rhinosinusitis induced by nasal instillation of silica causes an increase in serum and tissue OS, concomitantly with a decrease in serum, erythrocyte and tissue AO defense.

Natural AO supplementation in animals with experimental CRS induced by silica has no effect on the decrease in serum OS and causes a decrease in serum, erythrocyte and tissue AO defense compared to controls.

Vitamin E supplementation has more pronounced effects in decreasing serum and tissue OS and increasing serum, erythrocyte and tissue AO defense compared to quercetin.

Oxidative stress may be involved in the pathophysiological redox mechanism of experimental CRS induced by SiO₂.

Nasal instillation of silica can be a valid model for the experimental study of CRS.

General conclusions

The expression of the ARG2 gene, significantly increased in non-allergic and non-asthmatic patients and in non-allergic non-asthmatic patients with CRS without polyps, in patients with sinusitis and polyposis, supports its implication in the pathogenesis of the disease.

Osteopontin is significantly increased in patients with sinusitis. Local bacterial development is not significantly influenced by osteopontin.

Positive bacterial cultures are associated with the presence of biofilms on the inflamed respiratory mucosa in patients with CRS, with and without polyps. Biofilms can be involved in the pathogenesis of CRS.

Antibiotic-resistant biofilms can be significantly reduced by spray cryotherapy *in vitro*.

Chronic experimental exposure to O₃ and silica induces an increase in serum and nasal tissue OS, which supports the implication of the redox mechanism in the pathophysiological process of CRS.

Quercetin supplementation has significant favorable effects in decreasing serum and tissue OS in CRS experimentally induced by O₃.

Cryotherapy and quercetin supplementation might be recommended for the treatment of CRS.

Our studies support the need to classify CRS patients based on adequate criteria, given the complex pathogenesis, the diversity of immune mechanisms and etiological factors.

Selective bibliography

4. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl.* 2012;23:1-298.
5. Bhattacharyya N, Lee LN. Evaluating the diagnosis of chronic rhinosinusitis based on clinical guidelines and endoscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;143(1):147-151.
6. Rosenfeld RM, Piccirillo FJ, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 Apr;152(2 Suppl):S1-S39.
11. Kennedy JL, Hubbard MA, Huyett P, Patrie JT, Borish L, Payne SC. Sino-nasal Outcome Test (SNOT-22): A predictor of post-surgical improvement in patients with chronic sinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013 Oct;111(4):246-251.
14. Likness MM, Pallanch JF, Sherris DA, Kita H, Mashtare TL Jr, Ponikau JU. Computed Tomography Scans as an Objective Measure of Disease Severity in Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Feb;150(2):305-311.
15. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993;107:183-184.
16. Han JK. Laryngoscope. Subclassification of chronic rhinosinusitis. 2013 Mar;123 Suppl 2:S15-S27.
21. Cho SH, Kim DW, Gevaert P. Chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;4:575-582.
22. Steinke JW, Borish L. Chronic rhinosinusitis phenotypes. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;117:234-240.
23. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis Executive Summary. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016;6 Suppl 1: S3-S21.
56. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Robbins KT, Thomas JR, et al. Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery E-Book - Sixth edition, 2014.
63. Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infectious Diseases* 2013,13:210.
107. London NR Jr., Tharakan A, Ramanathan M Jr. The Role of Innate Immunity and Aeroallergens in Chronic Rhinosinusitis. *Adv Otorhinolaryngol.* 2016;79:69-77.
109. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH, Smith TL, Alt JA, Baroody FM, et al. International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.*

- 2016; 6(suppl 1):S22–S209.
146. Kim JH, Choi GE, Lee BJ, Kwon SW, Lee SH, Kim HS, et al. Natural killer cells regulate eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Sci Rep*. 2016;6:27615.
180. Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2015;64:121–130.
183. Tan BK, Klingler AI, Poposki JA, Stevens WW, Peters AT, Suh LA, et al. Heterogeneous inflammatory patterns in chronic rhinosinusitis without nasal polyps in Chicago, Illinois. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139:699–703.
185. Tan BK, Min JY, Hulse KE. Acquired Immunity in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17:49.
208. Liu WL, Zhang H, Zheng Y, Wang HT, Chen FH, Xu L, et al. Expression and regulation of osteopontin in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Allergy*. 2015 Feb;45(2):414-422.
218. Mahdavinia M, Keshavarzian A, Tobin MC, Landay AL, Schleimer RP. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS). *Clin Exp Allergy*. 2016 Jan;46(1):21-41.
246. Cho WS, Kim TH, Kim KH, Lee HM, Lee SH, Ju YH, et al. - Increased Expression of Arginase I and II in Allergic Nasal Mucosa. *Laryngoscope*, 2011;121:236–240.
253. Ingram JL, Kraft M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(4):829–842.
255. Vlad D, Trombitas V, Capusan M, Albu S. The role of nitric oxide in chronic rhinosinusitis. *Romanian Journal of Rhinology*. 2015;5(19):135-141.
256. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2017. Available from: www.ginaasthma.org.
271. Taruya T, Takeno S, Kubota K, Sasaki A, Ishino T, Hirakawa K. Comparison of arginase isoform expression in patients with different subtypes of chronic rhinosinusitis. *J Laryngol Otol*. 2015;129(12):1194-200.
307. Ramakrishnan Y, Shields RC, Elbadawey MR, Wilson JA. Biofilms in chronic rhinosinusitis: what is new and where next? *J Laryngol Otol*. 2015 Aug;129(8):744-751.
322. Vlad D, Dutu A, Apostol A, Trombitas V, Mihalca A, Albu S. The Effect of Spray Cryotherapy on Microbial Biofilms in Chronic Rhinosinusitis. *Current Infectious Disease Reports*. 2018;20:41.
345. Asher BF, Guilford FT. Oxidative Stress and Low Glutathione Ear, Nose, and Throat Conditions: A Systematic Review. *Altern Ther Health Med*. 2016 Sep;22(5):44-50.