

TEZĂ DE DOCTORAT

Managementul rinosinuzitei cronice. Probleme de modulare a vindecării postoperatorii rinosinusale.

Doctorand **Ioana Maria Porfire (Irimia)**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
Partea generală	
1. Definiție. Clasificare. Incidență	19
1.1. Definiția rinosinuzitei cronice	19
1.2. Clasificare	19
1.2.1. Fenotipuri ale rinosinuzitei cronice	19
1.2.2. Endotipuri ale rinosinuzitei cronice	19
1.3. Rinosinuzita cronică cu polipoză nazală dificil de tratat	20
1.4. Date epidemiologice	20
2. Patogeneza	21
2.1. Rinosinuzita cronică cu polipi nazali	21
2.2. Rinosinuzita cronică fără polipi nazali	21
3. Populații celulare	22
3.1. Comunități celulare microbiene de suprafață	22
3.1.1. Microbiota nazală	22
3.1.2. Agregate fungice	22
3.2. Populații celulare eozinofilice	22
3.3. Celule osoase	22
3.4. Comunități celulare imune de suprafață	23
3.5. Interleukine. Interleukina (IL)- 4, (IL)- 5, (IL)- 13, (IL)- 32 și (IL)- 33	23
3.6. Factori de creștere	24
4. Tratament	24
4.1. Tratament medicamentos	24
4.2. Chirurgia primară	25
4.3. Chirurgia de revizie	25
4.4. Crioterapia	26
4.5. Terapia imunologică	26
5. Osteita asociată rinosinuzitei cronice	27
5.1. Definiție	27
5.2. Epidemiologie	27
5.3. Fiziopatologie	28
6. Modele experimentale animale	28
7. Osteita - simptome clinice, imagistică, diagnostic histologic	29
7.1. Caracteristici clinice	29
7.2. Caracteristici radiologice ale osteitei la pacienții cu rinosinuzită Cronică	29
7.3. Aspecte histologice ale osteitei la pacienții cu rinosinuzită cronică	30
8. Osteita. Stadializare	30
8.1. Scorul Global de osteită GOSS	32
8.2. Scorul Lund- Mackay	33
8.3. Corelația GOSS- Lund- Mackay	33
9. Semnificația clinică a osteitei	33
10. Biomarkerii și importanța lor în managementul rinosinuzitei cronice. Markerii clinici și biologici în rinosinuzita cronică dificil de tratată	34

10.1. Markeri clinici	34
10.2. Comorbidități	35
10.3. Markeri biologici	36

Partea specială

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru. Obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiu 1. Osteita asociată cu chirurgia endoscopică endonazală. Model experimental murinic.	43
4. Studiu 2. Impactul crioterapiei cu spray de joasă presiune în reducerea osteitei asociate chirurgiei endonazale. Model experimental murinic.	55
5. Studiu 3. Osteita asociată cu chirurgia endoscopică nazală. Noi sisteme de gradare a osteitei din rinosinuzita cronică.	79
6. Studiu 4. Rolul interleukinei (IL)- 33 în patogeneza osteitei asociate rinosinuzitei cronice cu polipi nazali.	89
7. Discuții generale	101
8. Concluzii generale	107
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111

Cuvinte cheie: rinosinuzită cronică, rinosinuzită cronică dificil de tratat, polipi nazali, osteită, scoruri de gradare a osteitei, chirurgie endoscopică sinusală, crioterapie, rezultate postoperatorii, biomarkeri tisulari, interleukina (IL)- 33.

INTRODUCERE

Există o recunoaștere a prevalenței mari a modificărilor osteitice care afectează cadrul osos parasinusal la pacienții cu rinosinuzită cronică cu sau fără polipi nazali. Acest lucru este evident mai ales la pacienții cu boală radiologică extinsă și la cei supuși unei intervenții chirurgicale de revizie. În plus, numărul intervențiilor chirurgicale anterioare pare să fie strâns corelat cu severitatea sinuzitei. Cu toate acestea, clasificarea, semnificația clinică și managementul osteitei rămân controversate. Literatura susține prevalența ridicată a osteitei în rinosinuzita cronică. Deși există rezultate puternice în ceea ce privește asocierea osteitei cu inflamația severă sinonazală, mecanismul de bază, stadializarea, semnificația clinică și funcțională rămân controversate, fiind necesară dezvoltarea de noi modele experimentale în această direcție. Chirurgia endoscopică a sinusurilor, deși considerată standardul de aur în tratamentul rinosinuzitei cronice, implică în același timp modificări fiziologice și de geometrie a anatomiei sinusale, care pot avea un impact negativ asupra procesului de vindecare, funcției mucociliare și biofilmelor. În plus, este asociată conform multiplelor cercetări, cu rinosinuzita cronică recalcitrantă și incidența ridicată a osteitei asociate.

Valoarea cercetării de față este conferită de studiile efectuate, ale căror rezultate reprezintă noi contribuții și direcții de cercetare, continuând subiectul unor cercetări conexe anterior desfășurate. Pornind de la rolul specific al inflamației în remodelarea osoasă în rinosinuzita cronică, pentru a înțelege mai bine patogeneza osteitei asociate tratamentului chirurgical și al efectului acesteia asupra remodelării osoase, primul pas al cercetării noastre a fost acela de a dezvolta un model experimental murinic adecvat care să mimeze leziunile tisulare secundare chirurgiei endoscopice endonazale (FESS). Deși mai multe modele animale de rinosinuzită cronică sunt disponibile în prezent, puține evaluează procesul de neo-osteogeneză asociat bolii. În plus, din cauza lipsei de modele experimentale adecvate, rolul de bază al neo-osteogenezei asociate FESS, rămâne neclar. O înțelegere aprofundată a procesului de vindecare tisulară după chirurgia endoscopică a sinusurilor este necesară pentru a evita complicațiile postoperatorii și boala recurentă. Astfel, în prima parte a cercetării, am dezvoltat un nou model experimental murinic pentru osteita asociată lezării mucoasei nazale.

Remodelarea tisulară a fost descrisă pe larg în literatură, fără un consens asupra modului în care aceasta este definită. Formele de boală dificil de tratat datorită aderențelor, tesutului cicatricial și stenozelor osteomeatale secundare, necesită intervenție chirurgicală de revizie, astfel încât s-a căutat optimizarea metodelor

terapeutice. Iar siguranța, eficacitatea și tolerabilitatea crioterapiei spray, cu accent pe rezultatele bune obținute în rinologice, au reprezentat subiecte de interes în otorinolaringologie. Astfel, după validarea modelului experimental asupra inflamației și neo-osteogenezei induse prin leziune tisulară mecanică, următorul studiu din cadrul cercetării noastre a urmărit relația dintre inflamație și neo-osteogeneză, concentrându-se pe evaluarea crioterapiei cu spray de joasă presiune ca nouă strategie care să vizeze reducerea osteitei. Acest model experimental ar putea oferi noi perspective asupra osteitei induse și o mai bună înțelegere a modificărilor inflamatorii, care pot fi cruciale pentru dezvoltarea unor noi tehnici chirurgicale și îngrijiri postoperatorii mai eficiente, în special pentru cazurile recalcitrante de rinosinuzită cronică. Deoarece osteita pare să fie asociată cu forme recalcitrante de boală, diagnosticul acesteia, respectiv stadializarea ei, rămân elemente importate în managementul rinosinuzitei cronice. Pacienții cu un risc mai mare de a dezvolta osteită pot fi identificați preoperator pe baza evaluării imagistice. Acești pacienți ar putea beneficia de o monitorizare mai atentă și tratament specific, cu scopul de a îmbunătăți rezultatele pacienților cu rinosinuzită cronică dificil de tratat. Astfel, putem deduce importanța identificării precoce și stadializării corecte a osteitei. Deși multiple sisteme de stadializare a osteitei au fost descrise în literatură, osteita rămâne un diagnostic de multe ori omis în practica clinică, cel mai probabil datorită insuficienței evaluării a acesteia. Prin evaluarea atentă a literaturii în acest sens, am identificat GOSS ca fiind cel mai validat sistem de gradare radiologică pentru osteită, fiind caracterizat prin ușurinta utilizării, variabilitatea mică între evaluatori, rapiditatea evaluării și reproductibilitatea rezultatelor.

În ciuda progreselor în terapia medicală și chirurgicală, rinosinuzita cronică cu polipi nazali (CRSwNP) rămâne dificil de tratat, cu o rată semnificativă de recidivă ce pledează pentru starea inflamatorie persistentă, astfel încât o mai bună înțelegere și dezvoltare a noilor abordări terapeutice reprezintă subiecte de cercetare în domeniu. Au fost identificați diferiți factori specifici care declanșează un răspuns inflamator în patogeniza polipilor nazali. Endotipul CRSwNP a prezentat în principal inflamație Th2 indusă și a fost asociat cu refractaritate și comorbidități și rezistență la terapia cu steroizi. Citokinele înăscute derivate din epitelii, inclusiv interleukina (IL)-33, promovează răspunsurile Th2 prin dezvoltarea celulelor limfoide înăscute și joacă un rol crucial în dezvoltarea CRSwNP prin inducerea diferitelor căi. În cadrul ultimului studiu, am evaluat relația între interleukina IL-33 și celulele osoase din remodelarea osteitică la pacienți cu rinosinuzită cronică și foarte importanta asociere cu gradul de severitate a bolii și refractaritatea acesteia. Pe baza rezultatelor obținute în cercetarea noastră, putem considera interleukina (IL)-33 ca fiind un potențial biomarker în CRSwNP. Prin corelația pozitivă a interleukinei (IL)-33 cu eozinofilia, scorurile de severitate radiologică preoperatorie, endoscopia nazală și severitatea osteitei evaluată imagistic printr-un sistem riguros de stadializare, putem considera că interleukina (IL)-33 este direct relaționată cu formele severe sau refractare de rinosinuzită cronică.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Definiție. Clasificare. Incidență

1.1. Definiția rinosinuzitei cronice

Rinosinuzita cronică (CRS) reprezintă inflamația mucoasei rinosinusale, ce persistă mai mult de 12 săptămâni, caracterizată prin prezența a două sau mai multe din următoarele simptome obligatorii: congestia, obstrucția nazală, rinoreea anterioară sau posterioară.

1.2. Clasificare

După prezența sau absența polipilor nazali, CRS poate fi clasificată în CRS cu polipi nazali (CRSwNP) și fără polipi nazali (CRSSNP). Există o heterogenitate considerabilă între pacienții cu CRS în ceea ce privește răspunsul la tratament și agresivitatea bolii lor în funcție de endotipuri. Identificarea endotipurilor permite un tratament individualizat și un control optim al bolii.

1.3. Rinosinuzita cronică cu polipoză nazală dificil de tratat

În ciuda progreselor în terapia medicală și chirurgicală, CRSwNP rămâne dificil de tratat. Există un subgrup de pacienți CRSwNP ale căror simptome persistă în ciuda managementului maximal, conservativ și chirurgical.

1.4. Date epidemiologice

Deși date recente au demonstrat că CRS este printre cele mai frecvente afecțiuni cronice, care afectează aproximativ 5 % până la 15 % din comunitatea urbană din Europa și aproximativ 12 % până la 15 % din populația din Statele Unite.

2. Patogeneza

2.1. Rinosinuzita cronică cu polipi nazali

Rinosinuzita cronică cu polipi nazali (CRSwNP) este o boală inflamatorie heterogenă asociată cu polarizarea citokinei Th2, asociată cu refractaritate și comorbidități.

2.2. Rinosinuzita cronică fără polipi nazali

Rinosinuzita cronică fără polipi nazali (CRSSNP) este o boală comună și se caracterizează prin multiple endotipuri inflamatorii.

3. Populații celulare

3.1. Comunități celulare microbiene de suprafață

Există dovezi tot mai clare că disbioza nazală și a sinusurilor, este asociată cu patogeneza CRS.

3.2. Populații celulare eozinoflice

Statusul eozinofilic al mucoasei nazale și din sângele periferic, este în corelație directă cu severitatea CRSwNP, scorurile imagistice de severitate, rata de recurență a bolii. De asemenea, numărul de eozinofile din sângele periferic este puternic corelat cu numărul de eozinofile de la nivelul mucoasei, astfel încât eozinofilia din sânge poate fi considerată o alternativă pentru evaluarea severității CRS.

3.3. Celule osoase

Osteita se caracterizează prin remodelare osoasă, fibroză, rezorbție osoasă, neo- osteogeneză și înlocuirea osului matur cu os nou și este adesea considerată un semn distinctiv al rinosinuzitei recalcitrante. Osteoblastele joacă un rol dominant în acest proces și controlează activitatea osteoclastelor.

3.4. Comunități celulare imune de suprafață

La nivelul mucoasei nazale există o rețea bine definită de celule prezentatoare de antigen, atât la nivelul epitelului, cât și în lamina propria, cuprinzând macrofage și diferite subseturi de celule dendritice imature.

3.5. Interleukine. Intereukina (IL)-3, (IL)-5, (IL)-13, (IL)- 32 și (IL)- 33

Citokinele inflamatorii interleukina (IL)-4, IL-13 și IL-5 sunt mediatori cheie care inițiază și perpetuează inflamația de tip 2. Răspunsurile inflamatorii determinate de aceste citokine includ recrutarea și activarea eozinofilelor, bazofilelor, mastocitelor, celulelor caliciforme, macrofagelor și limfocitelor B.

3.6. Factori de creștere

Inflamația cronică în CRS determină diferite modificări structurale de remodelare, cum ar fi degenerarea polipoidă, angiogeneza sau hiperplazia de celule goblet, hiperplazie epitelială și fibroză subepitelială. Aceste modificări sunt controlate de factori de creștere.

4. Tratament

4.1. Tratament medicamentos

Cercetările actuale demonstrează că tratamentul de bază pentru rinosinuzita cronică cu sau fără polipi nazali, consistă în tratament medicamentos, urmat în cazul eșecului acestuia, de intervenție chirurgicală.

4.2. Chirurgia primară

Chirurgia primară reprezintă gold standardul de tratament al CRSwNP, cu o rată de succes de 80 % până la 90 %. Este indicată în cazurile care nu răspund la terapia medicamentoasă topică sau sistemică.

4.3. Chirurgia de revizie

Chirurgia de revizie se referă la intervenții chirurgicale multiple, în scopul de a obține controlul bolii refractare.

4.4. Crioterapia

Siguranța, eficacitatea și tolerabilitatea crioterapiei spray de joasă presiune au fost cercetate în diverse domenii medicale. În otorinolaringologie siguranța metodei și validarea acesteia ca o opțiune sigură și eficientă de tratament în rinosinuzita cronică, poate fi luată în considerare.

4.5. Terapia imunologică

Pentru pacienții cu un prognostic negativ în ciuda tratamentului maximal, apariția medicamentelor biologice oferă noi abordări pentru o bună gestionare a bolii.

5. Osteita asociată rinosinuzitei cronice

Rinosinuzita cronică dificil de tratat, prezintă adesea zone de îngroșare și remodelare osoasă la nivelul cadrului osos paranasal. Astfel de zone de neregularitate la scara computer tomografică au fost descrise ca osteită. Deși cercetările au confirmat o asociere între osteită și CRS, ceea ce rămâne controversat este relația între acestea și anume dacă există o cauză- efect sau pur și simplu osteita reprezintă un element comun al bolii recalcitrante.

5.1. Definiție

Osteita în rinosinuzita cronică este definită ca procesul de remodelare osoasă ce se caracterizează prin prezența următoarelor semne distinctive: resorbție osoasă, formare de os nou, îngroșare periostală și fibroză .

5.2. Epidemiologie

Incidența osteitei, stabilită pe criterii imagistice și histopatologice, la pacienții cu rinosinuzită cronică este de 51%, ajungând până la 76% la cei cu istoric de intervenție chirurgicală anterioară.

5.3. Fiziopatologie

Fiziopatologia, inclusiv înțelegerea actuală a mecanismelor moleculare care contribuie la osteită, este puțin discutată. Osteita din CRSwNP nu pare să fie asociată cu invazia bacteriană directă, ci mai mult cu un proces inflamator cronic. Implicarea citokinelor ca mediatori inflamatori în țesut, determină persistența bolii chiar și atunci când mucoasa este tratată chirurgical sau medicamentos.

6. Modele experimentale animale

Lipsa de modele experimentale adecvate, nu permite o înțelegere aprofundată a procesului, respectiv a rolului de bază pe care neo- osteogeneza îl are în rinosinuzita cronică. Modele noi sunt necesare pentru o înțelegere a fiziopatologiei relevante și astfel pentru a dezvolta noi strategii de prevenire a complicațiilor postoperatorii și recurențelor bolii.

7. Osteita - simptome clinice, imagistică, diagnostic histologic

7.1. Caracteristici clinice

Osteita la pacienții cu CRS reprezintă procesul de neo- osteogenează. Deși osteita este un diagnostic radiologic, ocazional se identifică în specimene patologice prelevate în timpul intervenției chirurgicale, prin observarea clinică directă a osului îndepărtat în cadrul FESS, ce are un aspect de „fagure”. Osteita este asociată cu boală severă și refractară, marcată prin scoruri imagistice, de endoscopie și scoruri olfactive, de gradul de afectare a calității vieții și răspunsul slab la tratament maximal corect condus.

7.2. Caracteristici radiologice ale osteitei la pacienții cu rinosinuzită cronică

În majoritatea studiilor și cu siguranță în practica clinică actuală, tomografia computerizată este modalitatea de elecție pentru a evalua prezența și amploarea osteitei la pacienții cu CRS. Cu o specificitate și sensibilitate excelentă pentru evaluarea componentei osoase cât și îngroșării mucoasei și mucoperiostului, computer toografia descrie osteita ca imaginea de rarefiere și/sau demineralizare, pierderea sistemului trabecular, distrucție corticală, scleroză focală și/sau ștergerea marginilor osoase.

7.3. Aspecte histologice ale osteitei la pacienții cu rinosinuzită cronică

Studiile experimentale și clinice au demonstrat că remodelarea osului subiacent este un proces adaptativ continuu, proces dinamic care presupune îndepărtarea și înlocuirea osului matur cu os nou, prin interacțiunea sinergică a osteoclastelor și osteoblastelor. Asociat, este prezentă o inflamație nebacteriană a osului prin sistemul haversian, ce duce la cronicizare.

8. Osteita. Stadializare

De-a lungul timpului, au fost descrise mai multe caracteristici ale sistemelor de clasificare a osteitei.

8.1 Scorul Global de Osteită GOSS

Scala globală de stadializare a osteitei (GOSS) este un nou sistem de clasificare compozit validat - care măsoară amploarea și severitatea osteitei, care evaluează aria de grosime maximă a peretelui osos pentru fiecare sinus. Gradarea folosind această scală este ușor de realizat și oferă rezultate reproductibile.

8.2. Scorul Lund- Mackay

Scorul Lund- Mackay (LM) este cel mai utilizat scor pentru evaluarea radiologică a rinosinuzitei cronice. Include în evaluare sinusurile paranasale drepte și stângi și complexul osteomeatal.

8.3. Corelația GOSS – Lund- Mackay

Mai multe studii, incluzând cercetarea noastră, au confirmat că există o corelație clară între severitatea radiologică a CRS, măsurată cu sistemul de clasificare Lund-Mackay și osteită.

9. Semnificația clinică a osteitei

Stadializarea imagistică a osteitei se corelează bine cu scorul simptomelor iar acest fapt sugerează că ambele modalități pot fi considerate un ghid de încredere pentru evaluarea și planificarea managementului CRS.

10. Biomarkerii și importanța lor în managementul rinosinuzitei cronice. Markerii clinici și biologici în rinosinuzita cronică dificil de tratat

Biomarkerii contribuie la cunoașterea mecanismelor farmacologice și oferă o bază pentru proiectarea de studii clinice care evaluează rapid și definitiv siguranța și eficacitatea diferitelor terapii. Biomarkerii oferă informații utile în optimizarea individuală a răspunsului la tratament.

10.1. Markerii clinici

Principalele variabile clinice ce trebuie luate în considerare la pacienții diagnosticați cu CRS care pot ajuta la identificarea prognosticului tratamentului sunt simptomele evaluate prin SinoNasal Outcome Test (SNOT), scorurile Lund- Mackay, scorurile de endoscopie.

10.2. Comorbidități

Astmul bronșic și boala respiratorie exacerbată de aspirină sunt cele mai frecvente trăsături clinice care au fost asociate cu rinosinuzita cronică severă, dificil de tratat. Fie că sunt dobândite sau moștenite, imunodeficiențele se asociază frecvent cu rinosinuzita cronică. Fibroza chistică, comportamente precum fumatul, prezența polipilor nazali și niveluri scăzute de vitamina D3 plasmatică a fost raportată atât la adulți, cât și la copii cu CRSwNP.

10.3. Markerii biologici

Principalii biomarkeri, asociați cu CRS formă severă greu de tratat sau necontrolată, pot fi clasificați în biomarkeri histologici celulari și biomarkeri moleculari. Prezența biofilmelor reprezintă un factor de prognostic negativ postoperator. Eozinofilele contribuie la inflamația Th 2 prin producerea de molecule proinflamatorii, activarea celulelor T și producția de anticorpi. Niveluri de eozinofile tisulare și periferice crescute se corelează pozitiv cu rata de recurență și cu severitatea bolii. Nivelul ridicat de exprimare a interleukinei (IL)- 33 a fost prezent în țesutul pacienților cu CRSwNP, astfel autorii au ridicat posibilitatea ca IL- 33 să poată fi considerat marker pentru CRS. Cazurile care au răspuns slab la FESS, sunt de obicei caracterizate prin scoruri de severitate scor Lund- Mackay mari, inflamație cronică a osului subiacent și comorbidități. Stadiul clinic al bolii, determinat de CT, este înalt corelat cu succesul sau eșecul FESS.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Toate experimentele au fost aprobate de Comitetul de Etică Instituțională Veterinară și au fost efectuate în conformitate cu Declarația de la Helsinki, respectând reglementările legale și internaționale privind experimentele pe animale. În ceea ce privește subiecții umani, cercetările au fost desfășurate după obținerea aprobării Comisiei de Etică a Universității noastre, a Spitalului Clinic CF Cluj- Napoca și după obținerea acordului semnat al pacienților.

Studiul 1. Osteita asociată cu chirurgia endoscopică endonazală. Model experimental murinic.

Obiectivul acestui studiu pilot a fost să valideze un model murinic de inflamație și neo- osteogeneză induse prin leziune mecanică ce mimează traumatismul tisular asociat intervenției chirurgicale endoscopice a sinusurilor. Acest studiu experimental a fost realizat la Centrul pentru Medicină Experimentală a Universității de Medicină și Farmacie 'Iuliu Hațieganu', Cluj-Napoca, împreună cu Departamentul de Anatomie Patologică a Universității de Medicină Veterinară și Științe Agricole, Cluj. Studiul s-a desfășurat pe o perioadă de 12 săptămâni și a inclus 20 de șobolani adulți masculi din linia Wistar, în vârstă de 16 săptămâni. În protocolul nostru am inclus 17 șobolani în grupul experimental și 3 în grupul control. După prealabila anestezie, am indus o leziune mecanică, unică, unilaterală a mucoasei, la nivelul cornetului nazal inferior al fosei nazale drepte, fosa nazală stângă fiind menținută ca martor. Specimenele au fost evaluate microscopic colorate în Hematoxilină-Eozină (HE), x 10, la 14, 30, respectiv 80 zile de la inducție. Rezultatele studiului au demonstrat că simpla leziune de periaj a mucoasei nazale poate fi suficientă pentru a induce inflamație și osteită. Am reprodus leziunea similară chirurgiei endoscopice și efectul său asupra inflamației, atât în ceea ce privește modificările inflamatorii ale mucoasei cât și la nivelul osului subiacent. Reducerea inflamației poate reduce riscul de a dezvolta osteită și de a preveni formele recalcitrante de CRS la pacienții care au beneficiat de tratament chirurgical endoscopic. Din cauza lipsei de studii care descriu modul în care FESS modifică mediul sinusal, adevărata originalitate a prezentului studiu de cercetare survine din dezvoltarea unui model experimental care ar putea oferi noi perspective asupra osteitei induse și o mai bună înțelegere a modificărilor inflamatorii, care pot fi cruciale pentru dezvoltarea unor noi tehnici chirurgicale și îngrijiri postoperatorii mai eficiente, în special pentru cazurile recalcitrante de rinosinuzită cronică.

Studiul 2. Impactul crioterapiei cu spray de joasă presiune în reducerea osteitei asociate chirurgiei endonazale. Model experimental murinic.

Acest studiu și-a propus să demonstreze eficacitatea crioterapiei cu spray de joasă presiune în reducerea inflamației și în remodelarea osoasă asociate cu lezarea chirurgicală a mucoasei nazale, cât și corelația pozitivă în ceea ce privește severitatea acestora. A fost desfășurat în cadrul Centrului de Medicină Experimentală al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România și a implicat o puternică colaborare cu Departamentul de Anatomie Patologică a Universității de Medicină Veterinară și Științe

Agricole Cluj. Analiza histologică a fost efectuată de un singur patolog neorb, folosind diferite câmpuri de mare putere, cu un model de microscop Olympus BX51. Din punct de vedere histologic, prezența criteriilor de inflamație și osteită, de asemenea, diferențele dintre cele două fose nazale, fosa dreaptă criotratată și fosa nazală stângă, considerată martor, au fost evaluate din punct de vedere al morfologiei generale. Am folosit colorația cu Hematoxilina- Eozina Mayer și am urmărit identificarea și cuantificarea criteriilor de inflamație, respectiv de osteită. Analogia între grupuri a fost efectuată cu testul nonparametric Chi- Pătrat. S-a făcut analiza statistică, o valoare $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă. În modelul nostru experimental murinic, am demonstrat că o leziune mecanică simplă a mucoasei nazale poate induce inflamația mucoasei și modificări osteitice osoase, similare cu leziunile chirurgicale. Am identificat prezența criteriilor de inflamație la nivelul mucoasei și osului subiacent, care au afectat atât partea control, cât și partea criotratată, cu o incidență semnificativ mai mare în fosele nazale de control. Prin urmare, inflamația și osteita au fost prezente de-a lungul timpului într-o manieră semnificativă statistic, cu o corelație directă între cele două caracteristici. Datorită prevalenței caracteristicilor histopatologice în fosele nazale control în comparație cu partea criotratată și a rezultatelor statistice ale acestora, de asemenea datorită absenței evenimentelor adverse putem susține ideea că metoda crioterapiei de joasă presiune pare sigură și eficientă în reducerea severității inflamației mucoasei. Acest model animal ar putea oferi noi perspective asupra osteitei induse chirurgical, oferind o mai bună înțelegere și reprezentând o bază pentru dezvoltarea unei intervenții chirurgicale și îngrijiri postoperatorii mai eficiente, în special pentru cazurile dificil de tratat de CRS. Studiul descrie de asemenea depunerea osului lamelar și care explică fazele procesului de osteogeneză, care nu a fost menționată anterior în literatură, probabil din moment ce înainte de studiul nostru, niciun alt model experimental nu a avut o perioadă atât de lungă de urmărire.

Studiul 3. Osteita asociată cu chirurgia endoscopică nazală. Noi sisteme de gradare a osteitei din rinosinuzita cronică.

Prezenta cercetare a presupus formarea unei echipe împreună cu Secția Clinică în care s-a desfășurat cercetarea, Departamentul de Radiologie al Spitalului Clinic CF, Cluj- Napoca, Departamentul de Diagnostic și Radiologie Intervențională, Spitalul Clinic de Urgență București și alte catedre ale Universității noastre, unde au fost prelucrate probele, iar ulterior a fost efectuată analiza statistică. În acest studiu am urmărit 86 de pacienți cu CRSwNP care au beneficiat de tratament chirurgical primar. Examenul preoperator a inclus endoscopie nazală, teste de sânge și aplicarea unui chestionar pentru identificarea comorbidităților precum astmul și alergiile de mediu. Dintre aceștia am inclus în grupul de studiu 44 de pacienți care la evaluarea efectuată la 12 luni postoperator au avut un control slab al bolii. Aceștia au beneficiat de scanare computer tomografică a sinusurilor paranasale. Scorurile severității osteitei imagistice au fost înregistrate folosind un sistem complex de stadializare radiologică. A fost efectuată o analiză a corelației Spearman pentru a evalua puterea relației dintre scorul imagistic de osteită și scorul de severitate Lund- Mackay. Rezultatele analizei corelaționale au relevat o corelație pozitivă semnificativă între scorul CT de severitate a osteitei și scorul Lund- Mackay, indicând o bună putere de asociere între cele două variabile. În ceea ce privește corelația dintre scorul de osteită CT și eozinofilie, rezultatele studiului nostru demonstrează că starea eozinofilică a mucoasei este în corelație directă cu severitatea CRSwNP. Scorurile Lund- Mackay, precum și scorurile endoscopice s-au dovedit a fi corelate cu osteita. Osteita este un proces ce rămâne insuficient studiat, iar gradarea, semnificația clinică și managementul ei rămân controversate. Scorurile severității osteitei prin stadializare radiologică au fost în corelație directă cu severitatea bolii, precum și cu scorurile endoscopice și statusul eozinofilic. Deși osteita nu pare să fie asociată cu simptome mai severe sau deranjante pentru pacient, pare să fie asociată cu forme recalcitrante de boală, deci diagnosticul acesteia, respectiv stadializare ei, rămân elemente importate în managementul CRS. De-a lungul timpului au fost descrise multiple sisteme de gradare a osteitei. Un sistem complex, rapid și ușor de interpretat trebuie dezvoltat și aplicat la scară largă. GOSS rămâne cel mai validat sistem de gradare radiologică pentru osteită, fiind caracterizat prin ușurința utilizării, variabilitatea mică între evaluatori și rapiditatea evaluării. Datorită corelației semnificative între scorul de severitate al osteitei și scorul Lund- Mackay, pacienții cu un risc mai mare de a dezvolta osteită pot fi identificați preoperator pe baza evaluării imagistice. Acești pacienți ar putea beneficia de o monitorizare mai atentă și tratament specific, cu scopul de a îmbunătăți rezultatele, mai ales în cazul formelor dificil de tratat. Acest studiu adresează o necesitate reală a zilelor noastre, contribuind cu argumente pozitive pentru diagnosticul corect al osteitei asociate rinosinuzitei cronice. Scala globală de gradare a osteitei este identificată ca fiind un nou sistem de clasificare compozit validat, ușor de realizat și cu rezultate reproductibile.

Studiul 4. Rolul interleukinei (IL)- 33 în patogeneza osteitei asociate rinosinuzitei cronice cu polipi nazali.

Am condus acest studiu în cadrul Centrului de cercetare funcțională, Genomică, Biomedicină și Medicină Translațională, a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj- Napoca, pe 44 de subiecți cu CRSwNP ai secției ORL din cadrul Spitalului Clinic CF Cluj- Napoca, cu un rezultat slab la tratamentul chirurgical endoscopic al sinusurilor pentru rinosinuzită cronică cu polipoză nazală. Aceștia au fost supuși scanării computer tomografice și scorurile imagistice de severitate a osteitei au fost înregistrate. Expresia cantitativă a IL-33 în polipii nazali a fost măsurată, folosind metoda ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). S-a evaluat corelația dintre scorul de osteită și eozinofilie, corelația găsită fiind una foarte bună. De asemenea, cercetarea a identificat o corelație puternică, pozitivă, între scorul de osteită evaluat CT și nivelurile de interleukină (IL)- 33. După efectuarea analizelor univariate privind corelația dintre scorul de osteită CT și alți predictorii, am construit un model de regresie liniară multiplă. Variabila dependentă a fost scorul de osteită CT, variabila de interes a fost IL-33, ajustată pentru prezența astmului și endoscopie. Valori mai mari ale IL-33 au fost asociate cu valori mai mari ale scorului de osteită CT, relația fiind semnificativă statistic. Cu toate acestea, scorul de astm și endoscopie nu au fost semnificativ statistic asociate cu variabila dependentă, în mod similar, scorul endoscopic nu s-a găsit a fi un predictor semnificativ. Acest studiu adresează o temă de interes, reprezentată de identificarea de noi potențiali biomarkeri ai patologiei studiate. Informația furnizată este suficientă pentru a recomanda interleukina (IL)- 33 ca potențial biomarker în CRSwNP. Interleukina (IL)- 33 se corelează cu eozinofilia, evaluarea radiologică preoperatorie, scorurile de endoscopie nazală și de severitate a osteitei. Studiile ulterioare vor clarifica mai bine rolul IL-33 ca nou potențial regulator al imunității înnăscute și biomarker al severității bolii, în rinosinuzita cronică cu polipi nazali.

Concluzii generale

1. Osteita este asociată formelor de rinosinuzită cronică (CRS) refractară la tratamentul maximal.
2. Osteita este un diagnostic imagistic, de multe ori este omis, fiind diagnosticată intraoperator.
3. Deși osteita reprezintă un important factor de prognostic negativ în CRS, este puțin studiată.
4. De- a lungul timpului au fost descrise multiple sisteme de gradare a osteitei. Un sistem complex, rapid și ușor de interpretat trebuie dezvoltat și aplicat la scară largă.
5. Deși chirurgia reprezintă standardul de aur în tratamentul formelor severe și recalcitrante de boală, osteita este asociată direct într- o manieră direct proporțională cu intervențiile chirurgicale, respectiv cu numărul acestora.
6. În momentul actual, literatura de specialitate este deficitară în modele experimentale care să studieze fiziopatologia osteitei asociate CRS.
7. Noi modele experimentale de rinosinuzită indusă experimental permit analizarea de noi strategii personalizate în managementul CRS.
8. Depunerea osului lamelar observată histologic nu a fost menționată anterior în literatură, astfel că cercetarea de față oferă noi perspective asupra fazelor de osteogeneză, resorbție, producție de os nou și maturare a acestuia.
9. Având în vedere asocierea dintre stadializarea imagistică postoperatorie a osteitei și scorurile de severitate preoperatorie Lund- Mackay ca fiind foarte puternică putem considera că pacienții cu un risc mai mare de a dezvolta osteită pot fi identificați preoperator pe baza evaluării imagistice și ar putea beneficia de o monitorizare mai atentă și tratament țintit.
10. Deși crioterapia pare sigură și eficientă, nevoia de studii ulterioare cu valori validate și populații controlate este cu siguranță justificată și ar trebui încurajată.
11. Crioterapia de presiune joasă este eficientă în reducerea severității inflamației mucoasei și a osteitei.
12. Acesta este unul dintre puținele studii care analizează simultan corelația dintre expresia cantitativă a interleukinei (IL)- 33 tisulară la subiecții umani cu CRSwNP, severitatea osteitei, scorurile de severitate preoperatorie Lund- Mackay, scorurile de endoscopie nazală, respectiv eozinofilia din sângele periferic.
13. Există o corelație robustă între expresia cantitativă a IL- 33 tisulară, severitatea osteitei, scorurile de severitate preoperatorie Lund- Mackay, scorurile de endoscopie și eozinofilia din sângele periferic.
14. Interleukina (IL)- 33 poate fi considerată ca un potențial biomarker în CRSwNP, direct relaționat cu formele severe sau refractare de rinosinuzita cronică.

DOCTORAL THESIS

Chronic rhinosinusitis management. Sinonasal postoperative therapeutic modulation flaws.

PhD Student **Ioana Maria Porfire (Irimia)**

PhD Scientific Coordinator Prof. Dr. **Silviu Albu**



CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF THE ART	
Acknowledgments	
1. Definition. Classification. Incidence	19
1.1. Definition of chronic rhinosinusitis	19
1.2. Classification	19
1.2.1. Chronic rhinosinusitis phenotypes	19
1.2.2. Chronic rhinosinusitis endotypes	19
1.3. Difficult to treat chronic rhinosinusitis with nasal polyps	20
1.4. Epidemiology	20
2. Pathogenesis	21
2.1. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps	21
2.2. Chronic rhinosinusitis without nasal polyps	21
3. Population cells	22
3.1. Surface microbial cell communities	22
3.1.1. Nasal microbiota	22
3.1.2. Fungal aggregates	22
3.2. Eosinophilic cell populations	22
3.3. Bony cells	22
3.4. Surface immune cell communities	23
3.5. Interleukins. Interleukin (IL)- 4, (IL)- 5, (IL)- 13, (IL)- 32 și (IL)- 33	23
3.6. Growth factors	24
4. Treatment	24
4.1. Medical treatment	24
4.2. Primary surgery	25
4.3. Revision surgery	25
4.4. Cryotherapy	26
4.5. Immunologic therapy	26
5. Osteitis associated with chronic rhinosinusitis	27
5.1. Definition	27
5.2. Epidemiology	27
5.3. Pathophysiology	28
6. Animal experimental models	28
7. Osteitis – clinical symptoms, radiological and histological diagnosis	29
7.1. Clinical figures	29
7.2. Radiological figures of osteitis in patients with chronic rhinosinusitis	29
7.3. Histological aspects of osteitis in patients with chronic rhinosinusitis	30
8. Osteitis. Grading.	30
8.1. Global Osteitis Scoring Scale GOSS	32
8.2. Lund- Mackay Scoring System	33
8.3. GOSS- Lund- Mackay correlation	33
9. Osteitis clinical significance	33

10. Biomarkers and their importance in the management of chronic rhinosinusitis. Clinical and biological markers in difficult-to-treat chronic rhinosinusitis	34
10.1. Clinical markers	34
10.2. Comorbidities	35
10.3. Biological markers	36
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis. Objectives.	39
2. General methodology	41
3. Study 1. Osteitis associated with endoscopic sinus surgery. A murine experimental model.	43
4. Study 2. The impact of low-pressure cryotherapy in reducing the osteitis associated with chronic rhinosinusitis. A murine experimental model.	55
5. Study 3. Osteitis associated with endoscopic sinus surgery. New gradins systems for osteitis in chronic rhinosinusitis.	79
6. Study. The role of interleukin (IL)- 33 in the pathogenesis of osteitis associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps.	89
7. General discussions	101
8. General conclusions	107
9. Originality and innovative contribution	109
REFERENCES	111

Key words: chronic rhinosinusitis, difficult-to-treat chronic rhinosinusitis, nasal polyps, osteitis, osteitis grading scores, endoscopic sinus surgery, cryotherapy, postoperative outcomes, tissue biomarkers, interleukin (IL)-33.

INTRODUCTION

There is recognition of the high prevalence of osteitis changes affecting the sinonasal bony framework in patients with chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps. This is especially highlighted in patients with extensive radiological disease and those undergoing revision surgery. In addition, the number of previous surgeries appears to be strongly correlated with the severity of sinusitis. However, osteitis classification, clinical significance, and management remain controversial. Literature supports the high prevalence of osteitis in chronic rhinosinusitis. Although there are strong results regarding the association of osteitis with severe sinonasal inflammation, the underlying mechanism, staging, and clinical and functional significance remain controversial. New experimental model development represents a subject of interest in contemporary research. Endoscopic sinus surgery, although considered the gold standard in the treatment of chronic rhinosinusitis, involves at the same time physiological and geometrical changes in the sinus anatomy, with a potential negative impact on the healing process, mucociliary function, and biofilms. In addition, it is associated, according to multiple studies, with chronic recalcitrant rhinosinusitis and a high incidence of associated osteitis.

The value of this research is conferred by the results representing new contributions and research directions. Starting from the specific role of inflammation in bone remodeling in chronic rhinosinusitis, to better understand the pathogenesis of surgically associated osteitis and its effect on bone remodeling, the first step of our research was to develop an appropriate murine experimental model on lesion-induced rhinosinusitis similar to endoscopic endonasal surgery (FESS). Although several animal models of chronic rhinosinusitis are currently available, only a few evaluate the neo-osteogenesis process associated with the disease. Due to the lack of appropriate experimental models, the underlying role of FESS-associated neo-osteogenesis remains unclear. A thorough understanding of the tissue healing process after endoscopic sinus surgery is necessary to avoid postoperative complications and recurrent disease.

Tissue remodeling has been widely described in the literature, with no consensus on its definition. Difficult-to-treat cases due to adhesions, scar tissue, and secondary osteo-meatal stenoses require revision

surgery, hence the optimization of therapeutic methods was sought. The safety, efficacy, and tolerability of spray cryotherapy have been topics of interest in otorhinolaryngology. We pursued the relationship between inflammation and neo-osteogenesis, focusing on low-pressure spray cryotherapy as a new strategy to reduce osteitis.

Since osteitis seems to be associated with recalcitrant disease, its diagnosis and staging remain important elements in disease management. Patients at higher risk of developing osteitis can be diagnosed preoperatively through computer tomography and could benefit from closer monitoring and specific treatment. Thus, we can deduce the importance of early identification and correct staging of osteitis. Although multiple osteitis staging systems have been described in the literature, osteitis remains a diagnosis often missed in clinical practice, most likely due to its insufficient evaluation. The literature identifies GOSS as the most validated radiological grading system for osteitis, characterized by ease of use, low variability, speed of assessment, and reproducibility of the results. This experimental model could provide new insights into induced osteitis and a better understanding of inflammatory changes, which may be crucial for developing new surgical techniques and more effective postoperative care, especially for recalcitrant cases of chronic rhinosinusitis.

Despite advances in medical and surgical therapy, chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) remains difficult to treat, with a significant relapse rate, advocating for the persistent inflammatory state. So a better understanding and development of new therapeutic approaches are subjects of research in the field. Different specific factors that trigger an inflammatory response in the pathogenesis of nasal polyps have been identified. The CRSwNP endotype mainly showed Th2-induced inflammation and was associated with refractoriness, comorbidities, and resistance to steroid therapy. Innate epithelium-derived cytokines, including interleukin (IL)-33, promote Th2 responses through the development of innate lymphoid cells and play a crucial role in CRSwNP by inducing various pathways. In our last study, we evaluated the relationship between interleukin IL-33 and osteitic remodeling in patients with chronic rhinosinusitis and the important association between the severity of the disease and its refractoriness. Based on the results, we can consider interleukin (IL)-33 as a potential biomarker in CRSwNP. Through the positive correlation of interleukin (IL)-33 with eosinophilia, preoperative radiological severity scores, nasal endoscopy, and the severity of osteitis evaluated by imaging through a rigorous staging system, we can affirm that interleukin (IL)-33 is directly related to severe or refractory chronic rhinosinusitis.

CURRENT STATE OF THE ART

1. Definition. Classification. Incidence

1.1. Definition of chronic rhinosinusitis

Chronic rhinosinusitis (CRS) represents sinonasal mucosal inflammation that lasts more than 12 weeks and appears as two or more of the following mandatory symptoms: nasal obstruction, congestion, or nasal discharge, with accompanying face discomfort, pressure, or a decrease in/loss of smell.

1.2. Classification

According to the presence or absence of nasal polyps, CRS can be classified into CRS with nasal polyps (CRSwNP) and without nasal polyps (CRSsNP). There is considerable heterogeneity between CRS patients as far as response to treatment and aggressiveness of their disease according to the endotypes. Identifying endotypes allows individualized treatment and optimal disease control.

1.3. Difficult to treat chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Despite advances in medical and surgical therapy, CRSwNP remains difficult to treat. There is a subgroup of CRSwNP patients whose symptoms persist despite maximal conservative and surgical management.

1.4. Epidemiology

Recent data have shown that CRS is among the most common chronic conditions, affecting approximately 5% to 15% of the urban community in Europe and approximately 12% to 15% of the population in the United States.

2. Pathogenesis

2.1. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a heterogeneous inflammatory disease associated with Th2 cytokine polarization, refractoriness, and comorbidities.

2.2. Chronic rhinosinusitis without nasal polyps

Chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSsNP) is a common disease, characterized by multiple inflammatory endotypes.

3. Cell populations

3.1. Surface microbial cell communities

There is increasingly clear evidence that nasal and sinus dysbiosis is associated with the pathogenesis of CRS.

3.2. Eosinophilic cell populations

The eosinophilic status of the nasal mucosa and within the peripheral blood correlates directly with the severity of CRSwNP, osteitis severity scores, and the recurrence rate of the disease. Also, the peripheral blood eosinophil count is strongly correlated with the mucosal eosinophil count, so blood eosinophilia can be considered as a reliable alternative for assessing the severity of CRS.

3.3. Bone cells

Osteitis is characterized by bone remodeling, fibrosis, bone resorption, neo-osteogenesis, and replacement of mature bone with new bone and is often considered a hallmark of recalcitrant rhinosinusitis. Osteoblasts play a dominant role in this process and control the activity of osteoclasts.

3.4. Surface immune cell communities

In the nasal mucosa, there is a well-defined network of antigen-presenting cells, in the epithelium also within the lamina propria, comprising macrophages and various subsets of immature dendritic cells.

3.5. Interleukins. Interleukin (IL)-3, (IL)-5, (IL)-13, (IL)- 32 and (IL)- 33

The inflammatory cytokines interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-5 are key mediators that initiate and perpetuate type 2 inflammation. Inflammatory responses driven by these cytokines include the recruitment and activation of eosinophils, basophils, mast cells, goblet cells, macrophages, and lymphocytes B.

3.6. Growth factors

Chronic inflammation in CRS causes various structural remodeling changes, such as polypoid degeneration, angiogenesis or goblet cell hyperplasia, epithelial hyperplasia, and subepithelial fibrosis, dynamic processes controlled by growth factors.

4. Treatment

4.1. Medical treatment

Current research demonstrates that the basic treatment for chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps consists of drug treatment, followed in case of its failure by surgical intervention.

4.2. Primary surgery

Primary surgery is the gold standard treatment in CRSwNP, with a success rate of 80% to 90%. It is indicated in cases that do not respond to topical or systemic drug therapy.

4.3. Revision surgery

Revision surgery refers to multiple surgical interventions to achieve control of refractory disease.

4.4. Cryotherapy

The safety, efficacy, and tolerability of low-pressure spray cryotherapy have been investigated in various medical fields. In otorhinolaryngology, the validation of the method as a safe and effective treatment option for chronic rhinosinusitis can be considered.

4.5. Immunological therapy

For patients with poor outcome despite maximal treatment, biologic drugs offer new approaches for better disease management.

5. Osteitis associated with chronic rhinosinusitis

Difficult-to-treat chronic rhinosinusitis often presents areas of thickening and bone remodeling in the paranasal bone framework. Such areas of irregularity identified at CT scans have been described as osteitis. Although research has confirmed an association between osteitis and CRS, their relation remains controversial.

5.1. Definition

Osteitis in chronic rhinosinusitis is defined as the process of bone remodeling characterized by the presence of the following distinctive signs: bone resorption, new bone formation, periosteal thickening, and fibrosis.

5.2. Epidemiology

The incidence of osteitis, established by imaging and histopathological criteria, in patients with chronic rhinosinusitis is 51%, reaching 76% in those with a history of previous surgery.

5.3. Pathophysiology

Pathophysiology, including the current understanding of the molecular mechanisms contributing to osteitis, is poorly discussed in the literature. Osteitis in CRSwNP does not seem to be associated with direct bacterial invasion, but rather with a chronic inflammatory process. The involvement of cytokines as inflammatory mediators in nasal tissue determines the persistence of the disease even when the mucosa is treated.

6. Animal experimental models

The lack of appropriate experimental models does not allow a thorough understanding of the process, and the basic role of neo-osteogenesis in chronic rhinosinusitis. New models are needed for understanding the relevant pathophysiology and thus to develop new strategies to prevent postoperative complications and disease recurrences.

7. Osteitis - clinical symptoms, imaging, radiological and histological diagnosis

7.1. Clinical features

Osteitis in patients with CRS represents the process of neo-osteogenesis. Although osteitis is a radiological diagnosis, occasionally identified in pathological specimens taken during surgery by direct clinical observation of the removed bone within FESS. Osteitis is associated with severe and refractory disease, severe imaging scores, endoscopy, and olfactory scores, poor quality of life, and lack of response to maximal treatment.

7.2. Radiological characteristics of osteitis in patients with chronic rhinosinusitis

It is demonstrated that computed tomography is the modality of choice to assess the presence and extent of osteitis in patients with CRS. With excellent specificity and sensitivity for evaluating the bony component as well as mucosal and mucoperiosteal thickening, computed tomography describes osteitis as the image of rarefaction and/or demineralization, loss of the trabecular system, cortical destruction, focal sclerosis, and/or obliteration of bone margins.

7.3. Other histological aspects of osteitis in patients with chronic rhinosinusitis

Experimental and clinical studies have demonstrated that underlying bone remodeling is a continuous adaptive, dynamic process involving the removal and replacement of mature bone with new bone through the synergistic interaction of osteoclasts and osteoblasts. Also, there is a non-bacterial inflammation of the bone through the Haversian system, leading to chronicity.

8. Osteitis. Grading

Over time, several osteitis grading systems have been described

8.1. Global Osteitis Scoring Scale

The Global Osteitis Staging Scale (GOSS) is a newly validated composite grading system measuring the extent and severity of osteitis by assessing the area of maximum bone wall thickness for each sinus. Grading using this scale is easy and reproducible.

8.2. The Lund-Mackay score

The Lund-Mackay (LM) score is the most widely used scale for the radiological evaluation of chronic rhinosinusitis. Its evaluation includes the right and left paranasal sinuses and the osteo-meatal complex.

8.3. GOSS - Lund- Mackay correlation

Several studies, including our research, have confirmed the clear correlation between the radiological severity of CRS and osteitis.

9. Clinical significance of osteitis

The strong correlation between osteitis radiologic grading scale and symptom score suggests that both may be considered reliable guides in evaluation and disease management.

10. Biomarkers and their importance in the management of chronic rhinosinusitis. Clinical and biological markers in difficult-to-treat chronic rhinosinusitis

Biomarkers contribute to the knowledge of pharmacological mechanisms and provide a basis for clinical trials to assess the safety and efficacy of various therapies. Biomarkers provide useful information in optimizing individual treatment responses.

10.1. Clinical markers

The main clinical variables useful in the prognosis of the disease, are the symptoms evaluated by the Sino Nasal Outcome Test (SNOT), the Lund-Mackay scores, and the endoscopy scores.

10.2. Comorbidities

Asthma and aspirin-exacerbated respiratory disease are the most common clinical features that have been associated with severe, difficult-to-treat chronic rhinosinusitis. Whether acquired or inherited, immunodeficiencies are frequently associated with chronic rhinosinusitis. Cystic fibrosis, even behaviors such

as smoking, besides the presence of nasal polyps, or low plasma vitamin D3 levels, have been reported in both adults and children with CRSwNP.

10.3. Biological markers

The main biomarkers associated with severe, difficult-to-treat, or uncontrolled CRS can be classified into cellular histological biomarkers and molecular biomarkers. The presence of biofilms is a negative postoperative prognostic factor. Eosinophils contribute to Th 2 inflammation by producing proinflammatory molecules, T cell activation, and antibody production. Elevated tissue and peripheral eosinophil levels correlate positively with recurrence rate and disease severity. The high level of interleukin (IL)-33 expression was present in the tissue of patients with CRSwNP, thus, IL-33 could be considered a marker for CRS.

PERSONAL CONTRIBUTION

All experiments were approved by the Institutional Veterinary Ethics Committee and were performed in accordance with the Declaration of Helsinki, complying with legal and international regulations on animal experiments. Regarding the human subjects, the research was carried out after obtaining the approval of the Ethics Commission of our University, CF Cluj-Napoca Clinical Hospital, and after the signed consent of the patients.

Study 1. Osteitis associated with endonasal endoscopic surgery. Murine experimental model.

The objective of our pilot study was to validate a murine model of inflammation and neo-osteogenesis induced by mechanical injury that mimics the tissue trauma associated with endoscopic sinus surgery. This experimental study was conducted at the Center for Experimental Medicine of the University of Medicine and Pharmacy 'Iuliu Hatieganu', Cluj-Napoca in collaboration with the Department of Pathological Anatomy of the University of Veterinary Medicine and Agricultural Sciences, Cluj. The study was conducted over 12 weeks and included 20 adult male Wistar rats aged 16 weeks. Our protocol included 17 rats in the experimental group and 3 in the control group. After prior anesthesia, we induced a mechanical, single, unilateral lesion of the mucosa, at the level of the inferior nasal turbinate of the right nasal fossa. The left nasal fossa was preserved as a control. The specimens were evaluated microscopically stained in Hematoxylin-Eosin (HE), x 10, at 14, 30, and 80 days after induction. The results demonstrated that simple brushing injury to the nasal mucosa may be sufficient to induce inflammation and osteitis.

We reproduced the lesion similar to endoscopic surgery and its effect on inflammation, in terms of inflammatory changes in the mucosa and underlying bone. By reducing inflammation, the risk of developing osteitis could be minimized, and the prevention of recalcitrant forms of CRS in patients who have benefited from endoscopic surgical treatment can be done. Due to the lack of studies describing how FESS changes the sinus environment, the real originality of the present research is the development of a new animal model that could provide new insights into induced osteitis and a better understanding of inflammatory changes, which may be crucial in developing more effective surgical and postoperative care techniques, especially for recalcitrant cases of chronic rhinosinusitis.

Study 2. Impact of low-pressure spray cryotherapy in reducing osteitis associated with endonasal surgery. Murine experimental model.

This study aimed to demonstrate the effectiveness of low-pressure spray cryotherapy in reducing inflammation and bone remodeling associated with surgical damage to the nasal mucosa, as well as the positive correlation in terms of their severity. It was conducted at the Center for Experimental Medicine of the University of Medicine and Pharmacy 'Iuliu Hatieganu', Cluj-Napoca, Romania, and involved a strong collaboration with the Department of Pathological Anatomy of the University of Veterinary Medicine and Agricultural Sciences, Cluj. Histological analysis was performed by a single unblinded pathologist using different high-power fields with an Olympus BX51 microscope model. From the histological point of view, the presence of inflammation and osteitis criteria, as well as the differences between the two nasal fossae, cryo-treated and control, were evaluated as general morphology. We used Mayer's Hematoxylin-Eosin staining and followed specific criteria of inflammation and osteitis. Comparison between groups was performed with the nonparametric Chi-Square test. Statistical analysis was done, and $p < 0.05$ was considered significant. We demonstrated that a simple mechanical injury to the nasal mucosa can induce mucosal inflammation and osteitis bone changes. We identified the presence of criteria for inflammation in the underlying mucosa and

bone, which affected both the control and cryo-treated sides, with a significantly higher incidence in the control nostrils. Therefore, inflammation and osteitis were present over time in a statistically significant manner, with a direct correlation between the two characteristics. Due to the prevalence of the histopathological features in the control nasal fossae compared to the cryo-treated side and their statistical results, as well as the absence of adverse events, the low-pressure cryotherapy method's safeness and effectiveness in reducing the severity of mucosal inflammation was demonstrated.

This animal model could provide new insights into surgically induced osteitis, providing a better understanding and representing a basis for the development of more effective surgery and postoperative care, especially for difficult-to-treat cases of CRS. The study also describes lamellar bone deposition not previously reported in the literature, probably since before our research, no other experimental model had such a long follow-up period.

Study 3. Osteitis associated with endoscopic nasal surgery. New grading systems for osteitis in chronic rhinosinusitis.

The present research involved teamwork between the clinical section ENT Department of the CF Clinical Hospital, Cluj-Napoca where the study was carried out, and the Radiology Department of the CF Clinical Hospital, Cluj-Napoca, the Diagnostics and Interventional Radiology Department, the Bucharest Emergency Clinical Hospital and other departments of our University, where the samples were processed, and later the statistical analysis was performed. In this study, we investigated 86 patients with CRSwNP who underwent primary surgical treatment. The preoperative examination included nasal endoscopy, blood tests, and the application of a questionnaire to identify comorbidities such as asthma and environmental allergies. Among them, we included in the study group only 44 subjects who, at the evaluation performed 12 months postoperatively, had poor disease control. They were computer tomographic scanned and radiologic osteitis severity scores were recorded using a complex radiological staging system. A Spearman correlation analysis was performed to assess the strength of the relationship between the osteitis score and the Lund-Mackay severity score. The results of the correlation analysis revealed a significant positive correlation between the osteitis severity CT score and the Lund-Mackay score. Regarding the correlation between CT osteitis score and eosinophilia, the results of our study demonstrate that the eosinophilic status of the mucosa is directly correlated with the severity of CRSwNP. Lund-Mackay scores as well as endoscopic scores have been shown to correlate with osteitis. Osteitis is an understudied process, and its grading, clinical significance, and management remain controversial. Although osteitis does not seem to be associated with more severe or disturbing symptoms for the patient, it is correlated with recalcitrant forms of the disease, and the correct diagnosis and staging remain of utmost importance in CRS management. Multiple osteitis staging systems have been described in the literature. A complex, fast, and easy-to-interpret system must be developed and applied on a large scale. GOSS remains the most validated radiological grading system for osteitis, due to its ease of use, low inter-rater variability, and rapidity. Because of the significant correlation between the osteitis severity score and the Lund-Mackay score, patients at higher risk of developing osteitis can be identified preoperatively based on imaging assessment. These patients could benefit from closer monitoring and specific treatment, to improve the outcomes of patients with difficult-to-treat CRS. This study addresses a real need nowadays, contributing positive arguments for the correct diagnosis of osteitis associated with chronic rhinosinusitis. The Global Osteitis Grading Scale is identified as a new validated composite grading system that is easy to perform and has reproducible results.

Study 4. The role of interleukin (IL)-33 in the pathogenesis of osteitis associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps.

We conducted this study within the Center for Functional Research, Genomics, Biomedicine and Translational Medicine, of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, on 44 subjects with CRSwNP within the ENT department of the Clinical CF Cluj-Napoca hospital, with a poor outcome at 12 months follow-up after endoscopic sinus surgery. The quantitative expression of IL-33 in nasal polyps was measured using the ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) method. We identified a strong, positive correlation between CT scores of osteitis, quantitative interleukin (IL)-33 levels, preoperative severity scores, and blood eosinophilia. After performing univariate analyses of the correlation between CT osteitis score and other predictors, we developed a multiple linear regression model. The dependent variable was CT osteitis score, and the variable of interest was IL-33, adjusted for asthma and endoscopy. Higher IL-33 values were associated with higher CT osteitis score values, the relationship being statistically significant. However, asthma

score and endoscopy were not statistically significantly associated with the dependent variable, similarly, endoscopic score was not found to be a reliable predictor. This study addresses a topic of interest, represented by the identification of new potential biomarkers of the studied pathology. The information provided is sufficient to recommend interleukin (IL)-33 as a potential biomarker in CRSwNP. Interleukin (IL)-33 correlates with eosinophilia, preoperative radiological assessment, nasal endoscopy, and osteitis severity scores. Further studies will better clarify the role of IL-33 as a potential novel regulator of innate immunity and biomarker of disease severity in chronic rhinosinusitis with nasal polyps.

General conclusions

1. Osteitis is associated with chronic rhinosinusitis (CRS) refractory to maximal treatment.
2. Osteitis is an imaging diagnosis, it is often missed, being diagnosed intraoperatively.
3. Although osteitis is an important negative prognostic factor in CRS, it is insufficiently studied.
4. Over time, multiple osteitis grading systems have been described. A complex, fast, and reliable system must be developed and applied on a large scale.
5. Although surgery is the gold standard in the treatment of severe and recalcitrant CRS, osteitis is associated in a directly proportional manner with surgical interventions.
6. The literature is deficient in experimental models for studying the pathophysiology of osteitis associated with CRS.
7. New experimental models on induced rhinosinusitis may be useful to analyze new personalized strategies for CRS management.
8. The present research provides new insights into the phases of osteogenesis resorption, production, and maturation of new bone, due to the lamellar bone deposition that has not been previously reported in the literature.
9. Due to the strong association between postoperative osteitis grading and preoperative Lund-Mackay severity scores, patients with a higher risk of developing osteitis can be identified preoperatively based on imaging assessment and benefit from closer monitoring and targeted treatment.
10. Although cryotherapy appears safe and effective, further studies with validated values and controlled populations are certainly needed and should be encouraged.
11. Low-pressure cryotherapy is effective in reducing the severity of mucosal inflammation and osteitis.
12. This is one of the few studies that simultaneously analyze the correlations between quantitative tissue interleukin (IL)-33 expression in human subjects with CRSwNP, osteitis severity, preoperative Lund-Mackay severity scores, endoscopy scores, and peripheral blood eosinophilia.
13. There is a robust correlation between quantitative tissue IL-33, osteitis severity, preoperative Lund-Mackay severity scores, endoscopy scores, and peripheral blood eosinophilia.
14. Interleukin (IL)-33 can be considered as a potential biomarker in CRSwNP, directly related to severe or refractory forms of chronic rhinosinusitis.