

mgr Katarzyna Piszczatowska

**Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych
– próba identyfikacji nowych biomarkerów choroby**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Mirosław Szczepański

Katedra i Zakład Biochemii
Wydział Lekarski
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024 r.

Słowa kluczowe:

przewlekłe zapalenie zatok przynosowych; polipy nosowe; stan zapalny;
nabłonek oddechowy górnych dróg oddechowych; TGF β 1; Smad2; pSmad3; CNPaza; egzosomy;
małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Key words:

chronic rhinosinusitis; nasal polyps; chronic inflammation;
upper airways epithelium; TGF β 1; Smad2; pSmad3; CNPase; exosomes;
small extracellular vesicles

Badania do pracy doktorskiej wykonano w ramach
PROJEKTÓW MŁODEGO BADACZA
przyznanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny:

❖ „Rola egzosomów u pacjentów
z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych”

Numer projektu: **1WK/1/M/MBM/N/21**

❖ „Ocena funkcji egzosomów u pacjentów
z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych”

Numer projektu: **1WK/1/M/MB/N/23**

*Serdecznie dziękuję Osobom, które przyczyniły się
do powstania mojej pracy doktorskiej:*

Panu Dr hab. n. med. Mirosławowi Szczepańskiemu

*za Opiekę Promotorską, naukę, zaangażowanie,
wszelką pomoc i wsparcie merytoryczne oraz organizacyjne na każdym z etapów badań,
cenne wskazówki, zbieranie materiału klinicznego,
życzliwość i poświęcony czas*

Pani Prof. dr hab. Marcie Strudze

za stworzenie warunków do pracy naukowej i wszelką pomoc

Dr Katarzynie Czerwaty

za zaangażowanie w zbieranie materiału klinicznego i wsparcie merytoryczne

Pracownikom Katedry i Zakładu Biochemii Wydziału Lekarskiego WUM

za codzienną życzliwość i pomoc

Rodzicom, Rodzeństwu, Rodzinie

za wsparcie i wyrozumiałość

Wykaz publikacji stanowiących pracę dokorską



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

BIBLIOTEKA UCZELNIANA

Nr referencyjny
BIBG/Punktacja/ 459/2024/KK

Warszawa, 23.09.2024

Sz. Pani
Mgr Katarzyna Piszczatowska
Katedra i Zakład Biochemii WUM

ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA PUBLIKACJI
PANI MGR KATARZYNY PISZCZATOWSKIEJ,
WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Lp.	Opis bibliograficzny	Impact Factor	MNiSW
Artykuły			
1.	Piszczatowska K, Czerwaty K, Dżaman K, Jermakow N, Brzost J, Kantor I, Ludwig N, Szczepański M. Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP). Journal of Personalized Medicine. 2024;14(9):1-18 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	3,000	70
2.	Czerwaty K, Piszczatowska K*, Brzost J, Ludwig N, Szczepański M, Dżaman K. Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis. Diagnostics. 2022;12(10):1-20 * równorzędny pierwszy autor [Rodzaj publikacji: praca pogładowa]	3,600	70
3.	Piszczatowska K, Czerwaty K, Cyran A, Fiedler M, Ludwig N, Brzost J, Szczepański M. The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases. Diagnostics. 2021;11(2):1-15 [Rodzaj publikacji: praca pogładowa]	3,992	70
Łącznie:		10,592	210
Książki			
1.	-		
Rozdziały w książkach			
1.	-		

DYREKTOR
Biblioteki Uczelnianej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
mgr Agnieszka Czarnicka

ul. Żwirki i Wigury 63
02-091 Warszawa
www.biblioteka.wum.edu.pl

tel.: +48 22 116 60 11
biblioteka@wum.edu.pl

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
Streszczenie	10
Abstract.....	13
1. Wstęp.....	16
1.1 Przewlekłe zapalenie zatok – definicja, objawy i etiologia choroby	16
1.2 Zatok przynosowe – budowa anatomiczna, funkcje i charakterystyka nabłonka oddechowego górných dróg oddechowych.....	17
1.3 Patogeneza przewlekłego zapalenia zatok.....	18
1.3.1 Immunologiczne aspekty przewlekłego zapalenia zatok przynosowych	19
1.3.2 Zmiany aktywności mikrobiomu	21
1.3.3 Zmiany strukturalno-funkcjonalne nabłonka oddechowego.....	21
1.4 Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	24
1.5 Szlak TGF-β/ Smad2 w patogenezie PZZP.....	26
1.5.1 Białko TGFβ1	26
1.5.2 Szlak sygnałowy TGFβ1/Smad2-Smad3	27
1.5.3 Udział szlaku TGFβ1/SMAD w patogenezie PZZP.....	28
1.6 Ścieżka 2',3'- cAMP - CNPaza - adenozylna - potencjalna rola w patogenezie PZZP	28
1.7 Rola ścieżki TGFβ1/Smad2/3, CNPazy i małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych.....	30
2. Założenia i cel pracy	32
3. Kopie opublikowanych prac	33
4. Podsumowanie i wnioski.....	87
5. Opinia Komisji Bioetycznej	91
6. Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład	92
7. Literatura:.....	112

Wykaz stosowanych skrótów

AMP	<i>ang. adenosine monophosphate</i>	adenozynomonofosforan
cAMP	<i>ang. cyclic adenosine monophosphate</i>	cykliczny monoadenozynofosforan
CNPaza	<i>ang. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>	2',3'-cykliczna nukleotydo 3'-fosfodisteraza
CRS	<i>ang. chronic rhinosinusitis</i>	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych
CRSwNP	<i>ang. chronic rhinosinusitis with nasal polyps</i>	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych z polipami
CRSsNP	<i>ang. chronic rhinosinusitis without nasal polyps</i>	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych bez polipów
CTGF	<i>ang. connective tissue growth factor</i>	czynnik wzrostu tkanki łącznej
EDN	<i>ang. eosinophil-derived neurotoxin</i>	neurotoksyna pochodzenia eozynofilowego
EPOS	<i>ang. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps</i>	Europejskie wytyczne na temat zapalenia zatok przynosowych i polipów nosa
ERK	<i>ang. extracellular signal-regulated kinase</i>	kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe
HSP47	<i>ang. heat shock protein 47</i>	białko szoku cieplnego 47
IL-5	<i>ang. interleukin-5</i>	interleukina 5
IL-25	<i>ang. interleukin-25</i>	interleukina 25
IL-33	<i>ang. interleukin-33</i>	interleukina 33
ILC2	<i>ang. type 2 innate lymphoid cells</i>	wrodzone komórki limfoidalne typu 2

JAK/STAT	<i>ang. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>	białka wewnątrzkomórkowego układu przekaźnikowego Jak/Stat
JNK	<i>ang. c-Jun N-terminal kinase</i>	kinaza białka c-Jun
MCC	<i>ang. mucocilliary clereance</i>	klirens śluzowo-rzęskowy
NF-κB	<i>ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
LAP	<i>ang. latency associated peptide</i>	peptyd związany z latencją
LTBP1	<i>ang. latent TGFβ-Binding Protein</i>	latentne białko wiążące TGFβ
MMP-9	<i>ang. matrix metalloproteinase-9</i>	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9
MUC5AC	<i>ang. mucin 5AC</i>	mucyna 5AC
MUC5B	<i>ang. mucin 5B</i>	mucyna 5B
NALF	<i>ang. nasal lavage fluid</i>	popłuczyny z jam nosa
NO	<i>ang. nitrogen oxide</i>	tlenek azotu
p38 MAPK	<i>ang. p38 mitogen-activated protein kinases</i>	kinazy aktywowane mitogenem p38
PI3K/AKT	<i>ang. phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B</i>	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu/ kinaza białkowa AKT
PZZP	<i>ang. chronic rhinosinusitis</i>	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych
PZZPzP	<i>ang. chronic rhinosinusitis with nasal polyps</i>	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych z polipami nosowymi
PZZPbP	<i>ang. chronic rhinosinusitis without nasal polyps</i>	przewlekłe zapalenie zatok przynosowych bez polipów nosowych
Smad	<i>ang. Sma and Mad related proteins</i>	przełączniki drugiego rzędu aktywowane nadrodziną białek TGFβ

R – Smads	<i>ang. receptor-regulated Smads</i>	białka Smad regulowane receptorem
ROS	<i>ang. reactive oxygen species</i>	reaktywne formy tlenu
SARA	<i>ang. Smad anchor for receptor activation</i>	białko kotwiczące SMAD
sEVs	<i>ang. small extracellular vesicles</i>	małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
SCCs	<i>ang. solitary chemosensory cells</i>	samotne komórki chemosensoryczne
T2Rs	<i>ang. bitter taste-sensing type 2 receptors</i>	receptory gorzkiego smaku typu 2
TβRI	<i>ang. TGFβ type I receptor</i>	receptor TGFβ typu I
TβRII	<i>ang. TGFβ type II receptor</i>	receptor TGFβ typu II
TLR	<i>ang. Toll-like receptor</i>	receptory Toll-podobne
TGFβ1	<i>ang. transforming growth factor type beta1</i>	transformujący czynnik wzrostu β1
TSLP	<i>ang. thymic stromal lymphopoietin</i>	limfopoetyna zrębu grasicy
TSP-1	<i>ang. thrombospondin-1</i>	trombospondyna 1

Streszczenie

Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (PZZP; ang. chronic rhinosinusitis) to choroba dotykająca ok. 5-12% społeczeństwa. PZZP występuje w dwóch podstawowych typach: z polipami (PZZPzP) oraz bez polipów (PZZPbP). Objawia się poprzez występowanie jednocześnie co najmniej dwóch objawów spośród takich jak: niedrożność / przekrwienie/ zablokowanie nosa lub/ i ściekanie wydzieliny po przedniej lub/ i tylnej ścianie gardła lub/ i ból/ ucisk twarzy lub/ i upośledzenie/ utrata węchu przez czas co najmniej 12 tygodni. Choroba ta wiąże się z przewlekłym stanem zapalnym oraz przebudową nabłonka oddechowego wyściełającego jamy nosa i zatoki przynosowe. Czynniki sprzyjającymi i zaostrzającymi chorobę są infekcje: bakteryjne, wirusowe, grzybicze, zanieczyszczenia powietrza, jak również choroby współtowarzyszące takie jak: alergia, mukowiscydoza, wady anatomiczne, czy stany immunosupresyjne. Pomimo tego, iż PZZP pojawia się dość powszechnie w społeczeństwie i znacząco obniża jakość życia, to molekularne podłoże choroby pozostaje nadal słabo wyjaśnione, a głębsze poznanie etiopatogenezy może pomóc w identyfikacji nowych biomarkerów choroby oraz stworzeniu skuteczniejszych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

Kluczowymi aspektami w patogenezie PZZP są: zmieniona aktywność układu odpornościowego oraz pojawiające się zmiany strukturalno-funkcjonalne nabłonka oddechowego, które prowadzą do niedrożności ujścia zatok przynosowych i w konsekwencji symptomów choroby. W pracy poglądowej pt. „*Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis*” dokonano przeglądu literatury dotyczącej modyfikacji funkcji poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego, a także zaburzeń jakie pojawiają się w obrębie błony śluzowej wyściełającej jamy nosa i zatok przynosowych.

W związku z tym, że najnowsze doniesienia naukowe wskazują na istotną rolę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, tzw. egzosomów w patogenezie wielu chorób, celem kolejnej pracy poglądowej pt. „*The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases*” był przegląd literatury dotyczący znaczenia egzosomów w patogenezie

przewlekłych chorób zapalnych górnych dróg oddechowych, ze szczególnym uwzględnieniem PZZP. Opisana została biogeneza egzosomów, transportowany przez nie ładunek molekularny, funkcje oraz potencjał diagnostyczny i terapeutyczny.

Dane literaturowe podają, że transportowany przez egzosomy ładunek molekularny odzwierciedla aktywność wydzielającej je komórki. W przypadku PZZP wykazano, że wydzielane przez nabłonek pęcherzyki transportują cząsteczki zaangażowane w patogenezę PZZP. Przebudowa tkanki nabłonkowej i utrata przez nią fizjologicznych funkcji oraz zmiana aktywności rezydujących w warstwie podnabłonkowej fibroblastów są jednymi z kluczowych mechanizmów związanych z rozwojem PZZP. Ścieżka TGF β 1/Smad uczestnicząca w przebudowie tkanek towarzyszącej licznym schorzeniom ma znaczenie także w patogenezie PZZP, przy czym w literaturze istnieją rozbieżności, co do jej zaangażowania w poszczególnych endotypach PZZP. Jeszcze inne badania wskazują na rolę adenozyiny i ścieżek związanych z cAMP w przewlekłych stanach zapalnych górnych dróg oddechowych. Co więcej, zaobserwowano współdziałanie TGF β i adenozyiny m.in. w zmianie aktywności fibroblastów. Adenozyina może powstawać m.in. poprzez przekształcenie 2',3'- cAMP będącego produktem rozpadu mRNA i przy udziale CNPazy – enzymu przekształcającego 2',3'- cAMP do 2'- AMP i 3'-AMP, które następnie przekształcane są do adenozyiny.

Celem przeprowadzonych przez nas badań była ocena ekspresji białek TGF β 1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy w nabłonku pacjentów z PZZPzP, PZZPbP oraz grupy kontrolnej. Wykonane analizy immunohistochemiczne wykazały ekspresję wszystkich czterech antygenów w nabłonku pochodzącym od trzech grup pacjentów. Poziom ekspresji Smad2 był wyższy w przypadku pacjentów z PZZPbP niż PZZPzP i grupie kontrolnej, pSmad3 i TGF β 1 wyższy u PZZPzP niż w grupie kontrolnej, natomiast poziom CNPazy był niższy u pacjentów PZZPbP niż w grupie kontrolnej. Dodatkowo, stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy ekspresją CNPazy i TGF β 1 u pacjentów z PZZPbP, co sugeruje ich możliwe współdziałanie. Ekspresja TGF β 1, Smad2, pSmad3 korelowała także pozytywnie z wybranymi parametrami klinicznymi. Przeprowadzone badania zostały opisane w pracy pt. *„Evaluation of CNPase and TGF β 1/Smad Signalling Pathway Molecule*

Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)”.

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały różnice w ekspresji poszczególnych antygenów: TGF β 1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy w nabłonku oddechowym pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem zatok oraz w odniesieniu do grupy kontrolnej. Co istotne, jako pierwsi wykazaliśmy obecność CNPazy w nabłonku pochodzącym od pacjentów z PZZP oraz jej możliwe współdziałanie z TGF β 1. Ponadto, CNPaza może przyczyniać się do regulacji wydzielania egzosomów, których jak przedstawione zostało w naszej pracy pogładowej funkcjonowanie ma ogromne znaczenie dla aktywności komórek układu odpornościowego i komórek budujących wyściełającą zatoki przynosowe błonę śluzową. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania mogą otworzyć ścieżkę do odkrycia niepoznanych dotąd nowych mechanizmów patogenezy choroby, ustalenia specyficznych dla danego endotypu biomarkerów i w przyszłości skuteczniejszych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych.

Title of dissertation:

Chronic rhinosinusitis – an attempt to identify new disease biomarkers

Abstract

Chronic rhinosinusitis (CRS) affects almost 5 - 12% of the global population. CRS appears in the two main endotypes: chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and without (CRSsNP). The symptoms of CRS include at least two of the following: nasal blockage/ obstruction/ congestion or nasal discharge (anterior / posterior nasal drip), facial pain/ pressure, reduction/ loss of smell due to time no less than 12 weeks. CRS relates to chronic inflammation and nasal airway epithelium remodeling. Factors contributing and leading to exacerbation of disease include bacterial, viral, fungal infections, airway pollution, as well as comorbidity diseases such as: allergy, cystic fibrosis, anatomical dysfunctions or immunosuppression. Despite the fact that CRS occurs commonly and significantly reduces the quality of life, the molecular background of disease remains elusive. The better understanding of CRS etiopathogenesis might lead to identification of the novel biomarkers as well as diagnostic and therapeutic solutions.

The key aspects of CRS pathogenesis include: altered immunity activity and structural with functional changes in the upper airway epithelium. It triggers to obstruction of the paranasal sinuses opening and in consequence symptoms of disease. In our article: *“Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis”* the literature review concerning modification of respective immune cells populations and disabilities in the paranasal sinuses mucosa has been done.

Due to the fact that the newest scientific reports indicate the crucial role of small extracellular vesicles, called also exosomes, in the pathogenesis of various diseases, the aim of the our next article *„The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases”* was to review the literature concerning the role of exosomes in the pathogenesis of chronic upper inflammatory diseases with special focus on chronic rhinosinusitis. In this article the exosomes

biogenesis, transported molecular cargo their functions as well as diagnostic and therapeutic potential has been described.

Current scientific reports describe that exosomes transport molecular cargo reflecting the activity of originated cell. In case of CRS, it has been found that epithelium secrete the exosomes with the content involved in the disease pathogenesis. The key aspects of CRS pathogenesis are tissue remodeling with loss of its physiological functions and altered activity of residue in the subepithelial area nasal fibroblasts. It has been found that TGF β 1/Smad that is involved in the tissue remodeling in various diseases is active also in case of CRS. However, in case of CRS, the activity of TGF β 1/Smad signaling in proper disease endotype remain inconclusive. Another studies, concern the role of adenosine and cAMP – related pathways in the CRS pathogenesis of upper chronic inflammatory pathways. What is more, the relationship between TGF β and adenosine in the altered fibroblast's function. Adenosine might occur due to 2',3'- cAMP conversion that is previously derived from mRNA breakdown. In this process takes part CNPase – the enzyme converting the 2',3'- cAMP to 2'-AMP and 3'-AMP. The aim of our study was the evaluation of the sinus epithelium expression of TGF β 1, Smad2, pSmad3 oraz CNPase derived from CRSwNP, CRSsNP and control group patients. Our immunohistochemistry staining analysis indicated the positive expression for all of them in each group, however the level of expression was different between proper groups. The level of Smad2 expression was higher in case of CRSsNP comparing to CRSwNP and controls, pSmad3 and TGF β 1 were higher in CRSwNP than in controls and CNPase was decreased in CRSsNP in compared to controls. In addition, positive correlation between CNPase and TGF β 1 in CRSsNP has been found and it suggest their possible collaboration. The expression of TGF β 1, Smad2, pSmad3 were positively correlated also with selected clinical symptoms. Our study has been described in detail in the article: *„Evaluation of CNPase and TGF β 1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)“*.

In summary, the study conducted as the part of doctoral thesis indicated the differences in the sinus's epithelium expression of TGF β 1, Smad2, pSmad3 oraz CNPase between CRSwNP, CRSsNP

and control patients. Importantly, we as the first has been shown the CNPase expression in the upper airway epithelium of CRS patients and its possible cooperation with TGF β 1. Moreover, CNPase might regulate exosomes concentration that as we have described in our review article, play crucial role in modulation of immune and mucosal cells activity. The research performed in the doctoral thesis might open new horizons to discover novel mechanisms involved in the CRS pathogenesis, specific endotype's biomarkers and more effective diagnostic and therapeutic solutions in the future.

1. Wstęp

1.1 Przewlekłe zapalenie zatok – definicja, objawy i etiologia choroby

Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (PZZP; ang. chronic rhinosinusitis) to choroba związana z chronicznym stanem zapalnym w obrębie jamy nosowej i zatok przynosowych, któremu towarzyszy przebudowa nabłonka górnych dróg oddechowych i nacieki zapalne, co przyczynia się do licznych dysfunkcji w obrębie twarzoczaszki i powstawania objawów znacząco pogarszających jakość życia pacjentów. Zachorowalność dotyczy szacunkowo około 5-12% populacji globalnie [1]. PZZP definiuje się jako obecność dwóch lub więcej symptomów, spośród takich jak: niedrożność/przekrwienie/zablokowanie nosa lub/i ściekanie wydzieliny po przedniej lub/i tylnej ścianie gardła lub/i ból/ucisk twarzy lub/i upośledzenie/utrata węchu. Ważnym kryterium pozwalającym skutecznie diagnozować schorzenie jest także czas występowania objawów wynoszący nie mniej niż 12 tygodni [1]. Objawy PZZP utrudniają codzienne funkcjonowanie pacjentów, a niekiedy uniemożliwiają aktywność zawodową, jak dzieje się m.in. w przypadku osób narażonych na codzienne, znaczące zmiany ciśnienia atmosferycznego pracowników m.in. linii lotniczych oraz nurków. Co więcej, nieleczone PZZP może prowadzić do licznych powikłań w postaci astmy, zaburzeń oddychania podczas snu w tym zespołu oporu górnych dróg oddechowych, zespołu obturacyjnego bezdechu sennego, hipsomii, ansomii, alergicznego grzybiczego zapalenia zatok z polipami, zmian strukturalnych w obszarze oczodołów i w elementach kostnych twarzoczaszki [2].

Rozróżnia się dwie podstawowe formy kliniczne PZZP: z polipami (PZZPzP; ang. chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSwNP) oraz bez polipów (PZZPbP; ang. chronic rhinosinusitis without nasal polyps; CRSsNP), jednak ze względu na heterogenność choroby uwarunkowaną leżącymi u jej podstaw mechanizmami, które dodatkowo zależą od lokalizacji geograficznej oraz rasy, najnowsze wytyczne dotyczące leczenia PZZP (ang. EPOS; European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps [1]) proponują zastosowanie podziału na bardziej szczegółowe endotypy w celu zastosowania skuteczniejszych metod terapeutycznych. Uwzględniają one

lokalizację anatomiczną PZZP, dominujący endotyp: typu-2 lub typu nie-2 oraz kryteria takie jak: występowanie alergii, infekcji grzybiczej, czy nacieków eozynofilowych [1].

PZZP to schorzenie wieloczynnikowe o słabo poznanym tle molekularnym. Czynnikiem towarzyszącym rozwojowi PZZP są infekcje wirusowe, bakteryjne i grzybicze, ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza, a także niektóre jednostki chorobowe takie jak: alergia, astma oskrzelowa, mukowiscydoza, obturacyjna choroba płuc, stany immunosupresyjne, czy też zaburzenia wynikające z czynników genetycznych lub wad anatomicznych w obrębie twarzoczaszki np. skrzywienia przegrody nosa. Pomimo, iż PZZP to choroba dotykająca znaczącej części społeczeństwa, nadal brakuje efektywnych i szeroko dostępnych metod diagnostycznych i terapeutycznych pozwalających na zatrzymanie choroby w jej wstępnych etapach, a leczenie pacjentów wymaga specjalistycznej pomocy i opiera się w pierwszym etapie na leczeniu farmakologicznym, a gdy to pozostaje nieskuteczne, włączeniu leczenia operacyjnego mającego na celu udrożnienie ujścia zatok przynosowych i polepszenie samopoczucia pacjentów. Niestety, jak pokazują statystyki w przypadku PZZPzP, aż 40% pacjentów spotyka się z nawrotem choroby [3] i koniecznością ponownego leczenia chirurgicznego, a przyczyny tego zjawiska pozostają cały czas słabo poznane.

1.2 Zatoki przynosowe – budowa anatomiczna, funkcje i charakterystyka nabłonka oddechowego górnych dróg oddechowych

Zatoki przynosowe to pneumatyczne struktury twarzoczaszki bezpośrednio połączone z jamą nosową i wyścielone urzęsionym nabłonkiem oddechowym o sumarycznej powierzchni od 100 do 200 cm² [4]. W zależności od lokalizacji w twarzoczaszce wyróżniamy zatoki: szczękowe, czołowe, sitowe i klinowe (Rycina 2). Funkcje zatok pozostają nie do końca poznane, jednak wiadomo, że chronią one delikatne obszary mózgowiczaszki, wyrównują pojawiające się różnice ciśnienia, a także co istotne nawilżają, ogrzewają i oczyszczają dostające się z zewnątrz powietrze [5]. Stanowią więc pierwszą barierę ochronną przed dostającymi się z zewnątrz czynnikami patogennymi (bakteriami, wirusami, grzybami, alergenami) i środowiskowymi (zanieczyszczeniami powietrza, czynnikami chemicznymi). Prawidłowe funkcjonowanie zatok możliwe jest m.in. dzięki aktywności nabłonka górnych dróg oddechowych, który w swojej

strukturze posiada wysoce wyspecjalizowane i współpracujące ze sobą komórki połączone tzw. ścisłymi połączeniami komórkowymi (ang. tight junctions) oraz tzw. klirensowi śluzoworzęskowemu umożliwiającemu usuwanie wraz ze śluzem dostających się z zewnątrz zanieczyszczeń. W obrębie nabłonka oddechowego występują komórki nabłonkowe urzęsione, komórki kubkowe - produkujące śluz (ang. goblet cells) oraz komórki chemosensoryczne. Istotną rolę odgrywają także usytuowane w warstwie podnabłonkowej fibroblasty nosowe uczestniczące zarówno w fizjologicznie występujących mechanizmach regeneracyjnych, jak i w przypadku zmiany ich aktywności w patogenezie chorób zapalnych górnych dróg oddechowych m.in. PZZP [6].

1.3 Patogeneza przewlekłego zapalenia zatok

Aktualne doniesienia naukowe wskazują na to, że do rozwoju choroby mogą przyczyniać się zarówno czynniki środowiskowe [7, 8], jak i te zależne od ogólnej kondycji zdrowotnej gospodarza i chorób towarzyszących [9]. Na poziomie molekularnym patogeneza PZZP przejawia się w kilku współzależnych od siebie aspektach, wśród których kluczowymi są: rozwijający się stan zapalny z korelującą z nim zmianą aktywności układu odpornościowego oraz zaburzenia strukturalno-funkcjonalne nabłonka oddechowego wyściełającego powierzchnie zatok i jamy nosowej (Rycina 3).

Nabłonek górnych dróg oddechowych stanowi pierwsze miejsce interakcji pomiędzy czynnikami środowiskowymi dostającymi się z wdychanym przez nozdrza powietrzem a wnętrzem organizmu człowieka, poprzez co stanowi swoisty filtr i barierę ochronną. Jest to bariera strukturalna i funkcjonalna, którą zapewnia współdziałanie: (1) specyficznie ukształtowanego nabłonka wraz z obecnymi w nim mechanizmami zapewniającymi skuteczne oczyszczanie, (2) mechanizmów układu oporności wrodzonej i nabytej oraz (3) lokalnie występującej mikroflory bakteryjnej [10]. W warunkach fizjologicznych elementy te umożliwiają utrzymanie homeostazy i w konsekwencji efektywne oczyszczanie dostającego się powietrza, a w przypadku czynników patogennych odpowiednią reakcją eliminującą powstałe zagrożenie, tak by uchronić organizm przed narażeniem dolnych dróg oddechowych, a wraz z krwioobiegami także innych organów wewnętrznych. W przypadku PZZP dochodzi do zaburzeń na poziomie wszystkich wymienionych

mechanizmów obronnych – zarówno struktury jak i funkcji nabłonka [11], modyfikacji aktywności poszczególnych elementów układu odpornościowego, jak też funkcjonowania mikrobiomu [12-15]. Co ważne, zaburzenia prawidłowej aktywności jednego z elementów ochronnych wpływają na dysfunkcyjne działanie pozostałych, poprzez co trudno jest określić pierwotną przyczynę powstałych defektów. Przeprowadzone obecnie badania starają się lepiej zrozumieć mechanizmy patogenezy, co w przyszłości może prowadzić do stworzenia terapii ukierunkowanych na konkretny cel molekularny.

1.3.1 Immunologiczne aspekty przewlekłego zapalenia zatok przynosowych

PZZP wiąże się z zaburzoną relacją pomiędzy zewnętrznymi czynnikami środowiskowymi, które stykają się z nabłonkiem górnych dróg oddechowych wyściełającym powierzchnię jamy nosowej i zatok przynosowych, a aktywnością układu odpornościowego człowieka. Jednym z pierwszych mechanizmów obronnych obecnym w błonie śluzowej nosa chroniących wnętrze organizmu przed szkodliwymi czynnikami środowiska i chorobotwórczymi drobnoustrojami jest wrodzona odpowiedź immunologiczna pobudzająca następnie do aktywności elementy odpowiedzi nabytej. W przypadku PZZP dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu obu elementów układu odpornościowego, czego skutkiem jest powstanie przewlekłego stanu zapalnego. Pierwszą linię obrony zapewnia pokrywający nabłonek śluz wraz z obecnymi w nim substancjami antybakteryjnymi, a następnie klirens śluzowo-rzęskowy (ang. mucociliary clearance, MCC), który usuwa go z górnych dróg oddechowych oczyszczając w ten sposób błonę śluzową [16]. Pojawiające się w PZZP upośledzenie funkcjonowania rzęsek, hiperplazja komórek produkujących śluz, często pojawiająca się nadekspresja mucyny 5A (MUC5A) i mucyny 5B (MUC5B) [17] oraz zaburzenia w powstawaniu komórek urzęsionych [18] prowadzą do akumulacji i zalegania wydzieliny w jamie nosowej i zatokach tworząc tym samym mikrośrodowisko sprzyjające rozwojowi infekcji bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych. Dodatkowo, nabłonek oddechowy wydziela substancje obronne takie jak lizozym, laktoferyna, nadtlenek wodoru, które unieszkodliwiają dostające się z zewnątrz patogeny [19]. Spotkanie patogenu z nabłonkiem oddechowym oraz komórkami takimi jak: makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne i eozynofile skutkuje także produkcją cytokin - IL-25, IL-33 oraz TSLP [20-23]. Białka te mogą

oddziaływać na fibroblasty usytuowane w warstwie podnabłonkowej [24], komórki limfoidalne i limfocyty T indukując m.in. wydzielanie cytokin typu Th2 [23, 25, 26]. Obecne w nabłonku komórki chemosensoryczne (ang. SCCs) produkują IL-25 aktywującą komórki ILC2 pośredniczące w uruchomieniu odpowiedzi typu Th2 oraz dzięki obecnym w ich błonie tzw. receptorom smakowym (ang. T2Rs) wydzielają tlenek węgla (NO) posiadający właściwości antybakteryjne, a także wzmacniający bicie rzęsek [27, 28]. Kolejnym elementem uczestniczącym w pierwszej linii obrony są receptory TLR (ang. Toll-like receptors) obecne w błonie komórek nabłonkowych, endosomach, retikulum endoplazmatycznym oraz lizosomach. Rozpoznają one wzorce molekularne prezentowane przez patogeny, wskutek czego produkowane są cytokiny, chemokiny i cząsteczki obronne aktywujące komórki układu odpornościowego. Cytokiny produkowane przez nabłonek uruchamiają aktywność komórek limfoidalnych (ang. innate lymphoid cells), które z kolei poprzez wydzielane cytokiny aktywują odpowiednie populacje komórek odpowiedzi nabytej, w szczególności subpopulacje limfocytów T [29-31]. W przypadku PZZP obserwuje się zachwianie balansu pomiędzy populacją limfocytów typu Th1, a limfocytami Th2, a co za tym idzie produkowanymi przez nie cytokinami. Oprócz wymienionych powyżej mechanizmów obronnych zapewnionych przez nabłonek oddechowy, ważną rolę odgrywają również komórki odporności wrodzonej takie jak: neutrofile, monocyty, makrofagi, bazofile, komórki tuczne oraz eozynofile [32].

Badania ostatnich lat wykazały niezwykle ważną rolę eozynofilii w patogenezie oraz przebiegu PZZP [33], co znalazło przełożenie w diagnozowaniu i leczeniu pacjentów. Nacieki eozynofilowe obserwuje się głównie w przypadku PZZPzP, a ich wysoki poziom może przyczyniać się do zaostrzenia symptomów oraz nawrotu PZZP. Działanie eozynofilii w patogenezie PZZP jest wielokierunkowe, a ich aktywność i żywotność są silnie regulowane przez IL-5. Dane literaturowe podają, że zastosowanie Mepolizumabu będącego przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko IL-5 i uniemożliwiającym przyłączenie cytokiny do receptora na eozynofilach redukowało wielkość polipów nosowych oraz zmniejszało niedrożność nosa [34]. W przypadku pacjentów z eozynofilowym PZZPzP w osoczu, tkankach oraz wydzielinie z jamy nosa obserwuje się znacząco podwyższony poziom produkowanej przez eozynofile neurotoksyny (ang. EDN)

i skorelowane z tym większe nasilenie choroby. Zauważono także, że neurotoksyna ta bierze udział w indukcji ekspresji genu dla metaloproteiny 9 (MMP-9) zaangażowanej w przebudowę tkanki [35, 36]. Badanie poziomu EDN może w przyszłości znaleźć zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu aktywności choroby.

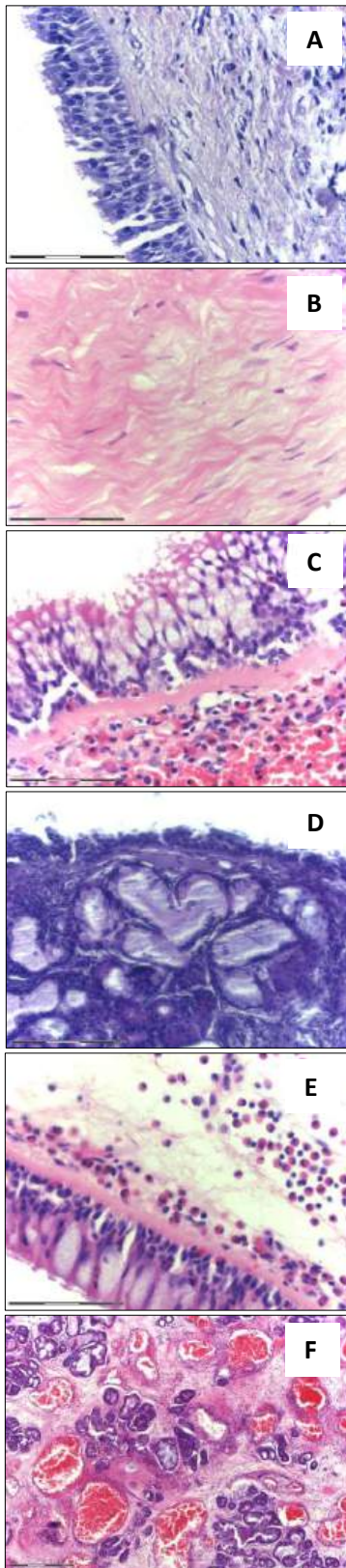
Dokładna charakterystyka immunologicznych aspektów PZZP była przedmiotem przeglądu literatury [37] stanowiącego jeden z elementów przedstawionej rozprawy doktorskiej.

1.3.2 Zmiany aktywności mikrobiomu

W warunkach fizjologicznych nabłonkowi oddechowemu wyściełającemu jamę nosową i zatoki towarzyszy specyficzna lokalnie występująca mikroflora bakteryjna wspierająca mechanizmy ochronne. W przebiegu PZZP obserwuje się znaczącą dysbiozę. Jedną z bakterii, mających tendencję do dominacji niszy mikroflory, w szczególności w przypadku zapalenia zatok z polipami (pojawia się u 67% pacjentów) jest *Staphylococcus aureus*. Co więcej, bakteria ta silnie koreluje z nawrotami choroby, a także gorszym rokowaniem po endoskopowych operacjach zatok. Poprzez formowany biofilm i wytwarzaną enterotoksynę B prowadzi do destrukcji struktury nabłonka oraz modulacji aktywności układu opornościowego przyczyniając się do wzmożonych nacieków zapalnych [38, 39].

1.3.3 Zmiany strukturalno-funkcjonalne nabłonka oddechowego

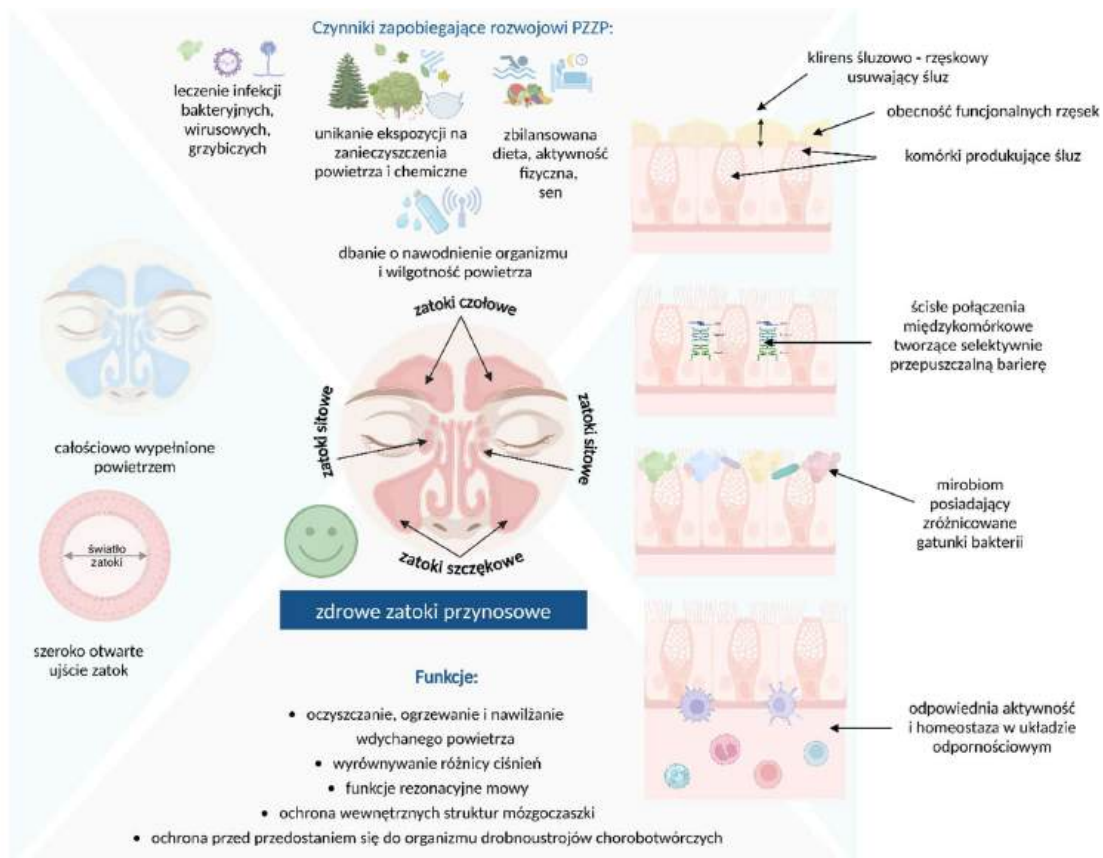
W przebiegu PZZP dochodzi do licznych zmian w strukturze nabłonka oddechowego (Rycina 1A) oraz warstwy podnabłonkowej. Na poziomie histologicznym obserwuje się różnice pomiędzy PZZPbP oraz PZZPzP, przy czym duża heterogenność choroby utrudnia jednoznaczną klasyfikację endotypową. W przypadku pacjentów z PZZPbP powszechnie pojawia się zwłóknienie (Rycina 1B), odkładanie kolagenu, hiperplazja komórek produkujących śluz (Rycina 1C) i gruczołów podśluzówkowych (Rycina 1D), naciek komórek mononuklearnych, natomiast PZZPzP silniej koreluje z występowaniem obrzęku, nagromadzeniem albumin, powstawaniem torbieli,



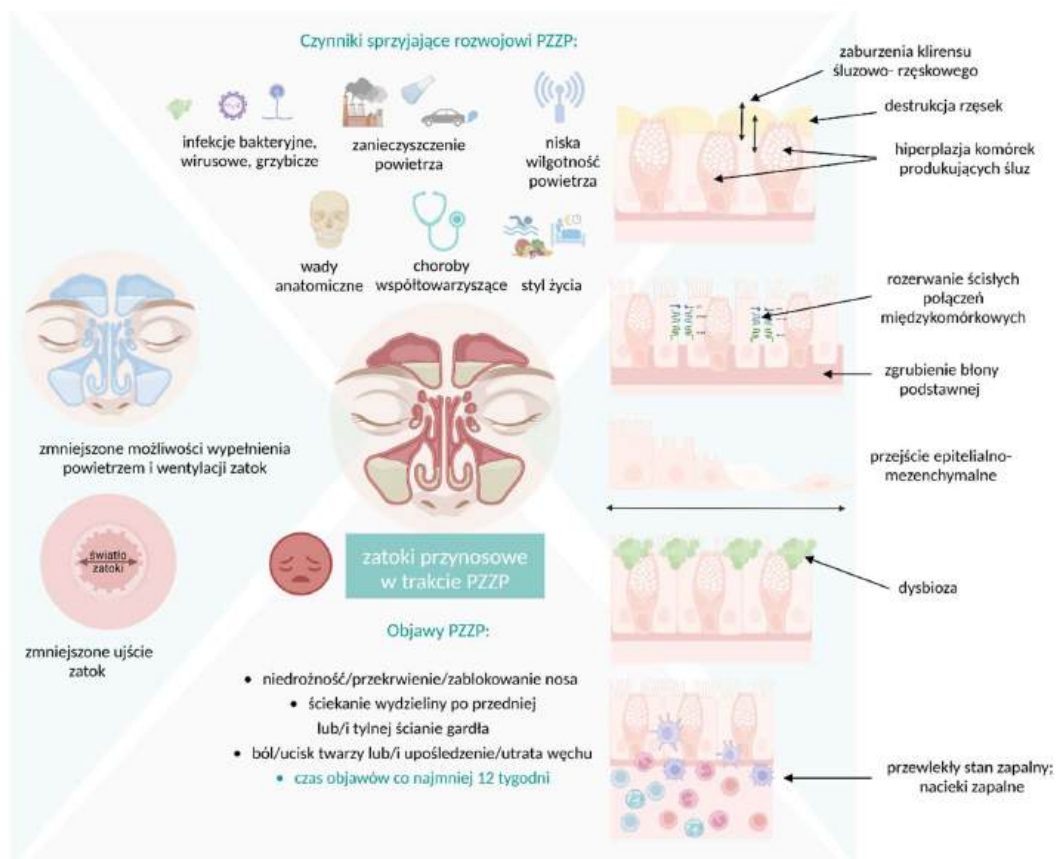
naciekiem eozynofilowym (Rycina 1E), wzmożoną angiogenezą i zmienionym unaczynieniem w tkance podnabłonkowej (Rycina 1F) [40-42]. W PZZP obniżeniu ulega ilość produkowanych substancji i funkcjonowanie mechanizmów antybakteryjnych, zmienia się też aktywność towarzyszących komórek odpornościowych [40]. Dodatkowo, u wielu pacjentów zwiększa się grubość błony podstawnej (Rycina 1C) znacząco ograniczając transport substancji odżywczych do zakotwiczonych w niej komórek nabłonkowych. Zauważono, że w przypadku pacjentów z polipami istnieje korelacja pomiędzy zwiększonym naciekiem eozynofilowym w warstwie nabłonkowej i podnabłonkowej, a uszkodzeniem nabłonka i zwiększoną grubością błony podstawnej [43]. Spadają również ilości białek: ZO-1, okludyny, kładyny tworzących ścisłe połączenia pomiędzy komórkami tworzącymi nabłonek, co przyczynia się do zniszczenia struktury zapewniającej selektywną przepuszczalność dla czynników zewnętrznych. Czynnikiem sprzyjającym rozerwaniu połączeń międzykomórkowych jest hipoksja [44] pojawiająca się m.in. na skutek znaczącego zamknięcia ujścia zatok w przebiegu PZZP, zwiększonej ilości produkowanego śluzu wraz z zaburzonymi mechanizmami jego usuwania i w konsekwencji toczącego się w obrębie błony śluzowej stanu zapalnego [44, 45]. Ważnym mechanizmem uczestniczącym w przebudowie tkanki u pacjentów z PZZP jest przemiana epitelialno-mezenchymalna (ang. epithelial to mesenchymal transition) w trakcie, której komórki nabłonkowe nabywają charakteru komórek mezenchymalnych. Komórki nabłonkowe tracą ścisłe połączenia międzykomórkowe, nabywają

Ryc. 1 Barwienie hematoksyliną i eozyną
(powiększenie: A,B,C,E- 400x; D – 200x; F -100x)

zdolności przemieszczania się, zmienia się ich cytoszkielet i struktura, zawartość macierzy wewnątrzkomórkowej oraz ekspresja genów i białek [46]. Do przebudowy tkanki przyczyniają się też znacząco fibroblasty umiejscowione w warstwie podnabłonkowej, które na skutek aktywacji poprzez różne czynniki takie jak np. reaktywne formy tlenu lub TGFβ1, produkują zwiększone ilości macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ulegają przekształceniu w miofibroblasty [47]. W warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych wszystkie komórki tworzące nabłonek, wchodzące w skład lokalnej odpowiedzi immunologicznej oraz rezydujące fibroblasty oddziałują na siebie poprzez wzajemną komunikację. Jedną z form przekazywania sygnału i modulacji aktywności będących w pobliżu oraz znacząco oddalonych od siebie komórek są pęcherzyki zewnątrzkomórkowe [48], a w szczególności ich populacja nazywana małymi pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (ang. small extracellular vesicles; sEVs) lub egzosomami (ang. exosomes).



Rycina 2. Fizjologiczna struktura i funkcje zatok przynosowych oraz charakterystyka nabłonka oddechowego wyściełającego wnętrze jam nosowych i zatok. (Grafiki stworzone przy wykorzystaniu programu Biorender.com)



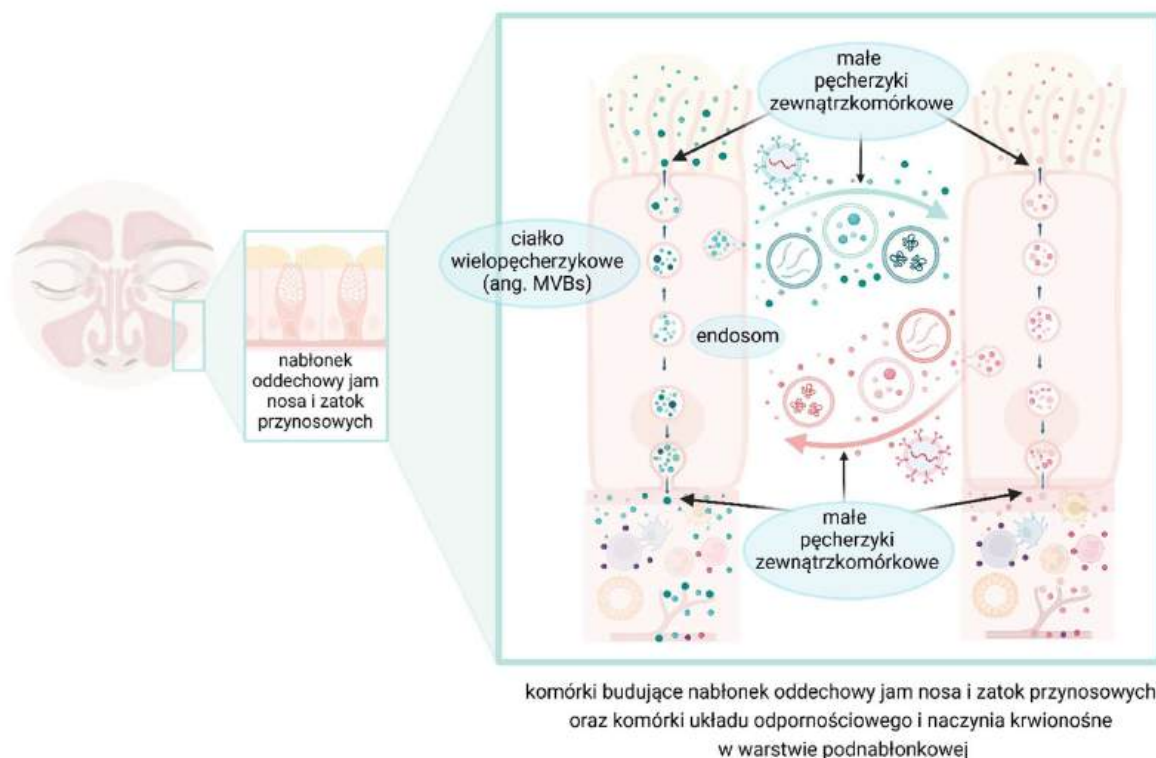
Rycina 3. Struktura i dysfunkcje zatok przynosowych oraz charakterystyka nabłonka oddechowego wyściełającego wnętrze jam nosowych i zatok w przebiegu PZZP.

1.4 Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. small extracellular vesicles; sEVs/ egzosomy ang. exosomes) to rodzaj pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia endosomalnego wydzielanych przez komórki do otoczenia i posiadających podwójną błonę lipidową. Wielkość egzosomów wynosi od około 30 do 150 nm [49]. Pęcherzyki na swojej powierzchni lub wewnątrz przenoszą określone kargo w postaci m.in. białek, lipidów, kwasów nukleinowych, receptorów, czy różnego rodzaju metabolitów. Dzięki temu, że uwalniane są zewnątrzkomórkowo do płynów ustrojowych, mogą modulować aktywność komórek znajdujących się w swoim sąsiedztwie, jak i tych znacząco od siebie oddalonych, a co ważne ich stężenie w badanym materiale klinicznym oraz niesiony ładunek molekularny stanowią atrakcyjny cel badawczy z potencjalnym

zastosowaniem w metodach diagnostycznych i terapeutycznych [50] (Rycina 4). W przypadku PZZP szczególna uwaga skoncentrowana jest na egzosomach obecnych lokalnie w błonie śluzowej jamy nosowej i zatok obecnych w popłuczynach izolowanych z jamy nosowej i zatok (ang. NALF; nasal lavage fluid) oraz krążących systemowo we krwi i uzyskiwanych z osocza lub surowicy pacjentów. Badania prowadzone na materiale klinicznym od pacjentów z PZZP, wskazują na istotną rolę egzosomów w procesach takich jak angiogeneza, proliferacja komórek, udział w przebudowie tkanki, mechanizmach obronnych, czy regulacji aktywności układu odpornościowego [51-59]. Charakterystyka oraz funkcje egzosomów w chorobach związanych z przewlekłym stanem zapalnym górnych dróg oddechowych, w tym przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych zostały opisane w pracy poglądowej stanowiącej element niniejszej rozprawy doktorskiej [60].

Literatura podaje liczne przykłady tego, że egzosomy wydzielane przez konkretną populację komórek transportują zawartość będącą odzwierciedleniem jej aktywności [61-63]. W związku z tym, poszukiwanie zależności pomiędzy ekspresją nabłonkową poszczególnych białek zaangażowanych w patogenezę PZZP może pomóc w odkryciu nowych niepoznanych dotychczas mechanizmów związanych z rozwojem choroby, ich regulacji, a także ułatwić precyzyjną, szerzej dostępną diagnostykę i spersonalizowane metody terapeutyczne.



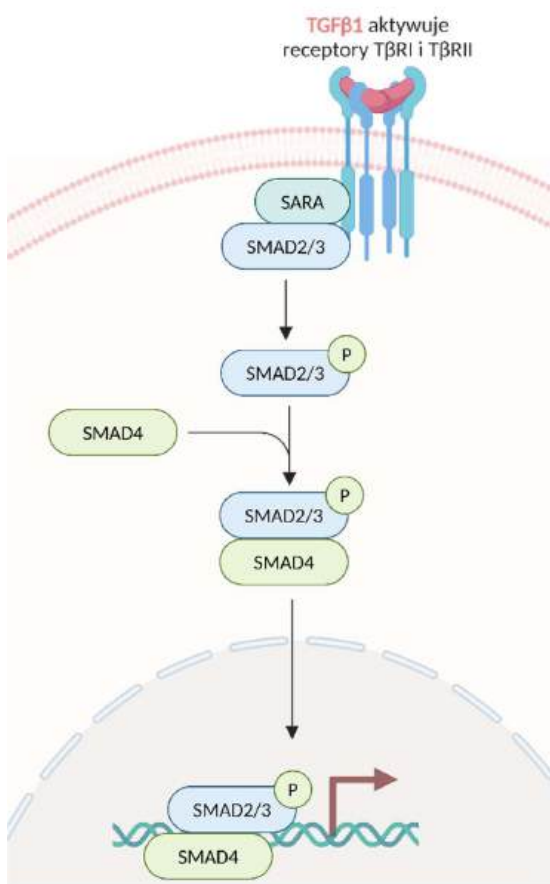
Rycina 4. Mechanizm wydzielania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz rozprzestrzeniania się pomiędzy komórkami nabłonka oddechowego i komórkami układu odpornościowego napływającymi do warstwy podnabłonkowej.

1.5 Szlak TGF- β / Smad2 w patogenezie PZZP

1.5.1 Białko TGF β 1

TGF β 1 to cytokina o działaniu plejotropowym i funkcjonalności zależnej od wielu czynników m.in. wydzielających ją komórek, mikrośrodowiska i kontekstu aktywności. Odgrywa istotną rolę zarówno w mechanizmach fizjologicznych – m.in. rozwoju embrionalnym, gojeniu ran, zapewnieniu szeroko rozumianej homeostazy tkankowej, regulacji aktywności wielu komórek układu odpornościowego w tym: subpopulacji limfocytów T i B, komórek NK, komórek dendrytycznych, makrofagów i neutrofilii, jak i patologicznych – m.in. dotyczących defektów w rozwoju, upośledzeniu gojenia się ran i chorobach związanych z włóknieniem, chorobach zapalnych, infekcyjnych, alergicznych i nowotworach. TGF β 1 kontroluje takie procesy jak: przeżywalność komórek, ich wzrost, proliferację, różnicowanie, zdolności adhezyjne i migracyjne,

zachodzące w komórkach procesy metaboliczne oraz związane ze śmiercią komórkową [64, 65]. TGFβ1 magazynowane jest w postaci dimeru połączonego z peptydem LAP (ang. latency - associated peptide) oraz białkiem LTBP1 (ang. latent TGF-β-binding protein) w przestrzeni międzykomórkowej lub w połączeniu z LAP kierowane na powierzchnię komórki. Dojrzałe TGFβ1 pełni swoje funkcje po uwolnieniu z wiążącego je kompleksu, które następuje poprzez aktywację przez integryny [66] lub niezależnie od integryn m.in. na skutek aktywności środowiska kwasowego lub zasadowego, reaktywnych form tlenu (ang. ROS; reactive oxygen species), trombospondyny-1 (ang. TSP-1) oraz proteaz [65]. Uwolnione TGFβ1 przyłącza się w pierwszej kolejności do receptora TβRII, następnie receptora TβRI [67], po czym następuje dalsza transdukcja sygnału na drodze kanonicznej zależnej od rodziny czynników transkrypcyjnych Smad lub poprzez ścieżki niekanoniczne związane z: ERK, GTPazą, p38 MAPK, JNK, NF-κB, PI3K/ AKT lub JAK/STAT [65].



1.5.2 Szlak sygnałowy TGFβ1/Smad2-Smad3

Na drodze ścieżki kanonicznej sygnał od TGFβ1 przekazuje dalej rodzina czynników transkrypcyjnych Smad, a ich aktywność kontrolowana jest przez szereg dodatkowych uwarunkowań zależnych m.in. od bodźców docierających do komórki oraz jej zapotrzebowania. Smad2 i Smad3 (ang. R-Smads; receptor-activated Smads) obecne w cytoplazmie komórkowej są prezentowane receptorowi TβRI poprzez białko SARA (ang. Smad anchor for receptor activation), po czym ulegają fosforylacji i oligomeryzacji oraz połączeniu ze Smad4 (ang. co-Smad, common-partner Smad). Następnie, w postaci kompleksu transportowane są do jądra komórkowego i przyłączają się do DNA regulując ekspresję genów

odpowiedzialnych m.in. za ekspresję białek tworzących ścisłe połączenia międzykomórkowe, macierz zewnątrzkomórkową, włóknienie, regulujących aktywność komórek układu odpornościowego, cykl komórkowy oraz apoptozę [65, 68].

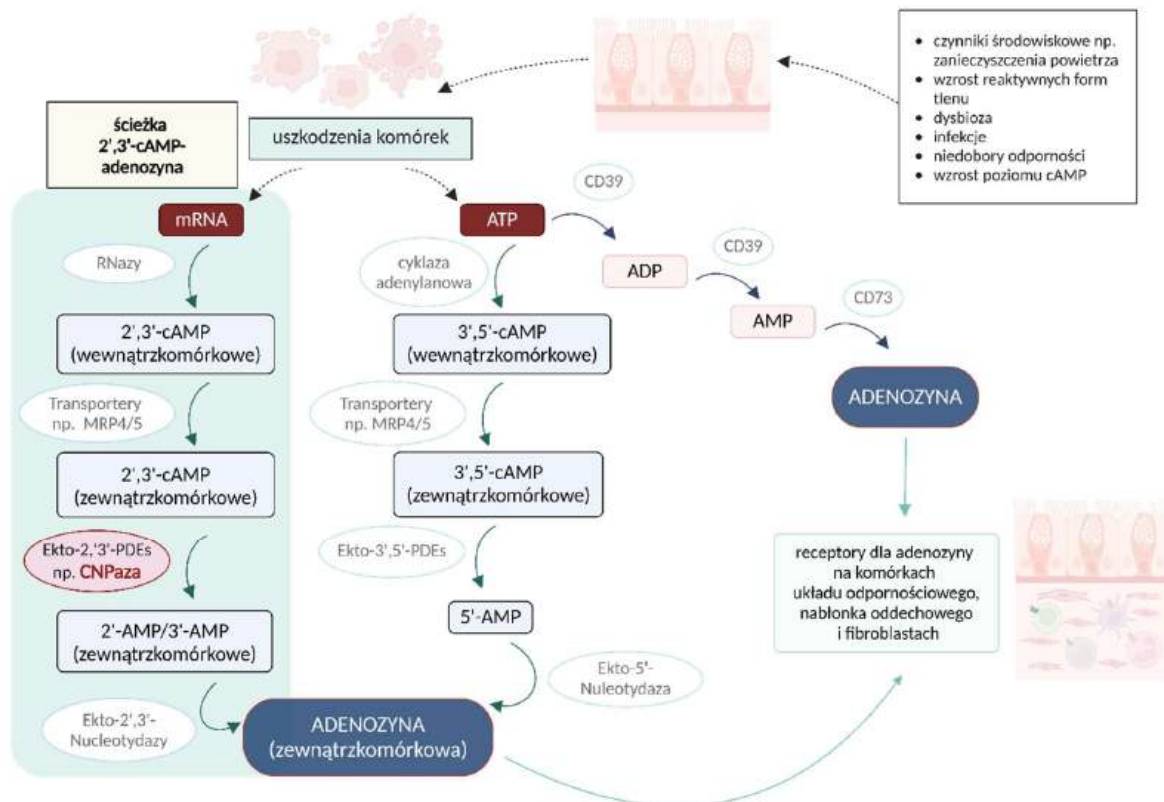
1.5.3 Udział szlaku TGFβ1/SMAD w patogenezie PZZP

Dane literaturowe wskazują na znaczącą rolę TGFβ1 w patogenezie PZZP, w szczególności poprzez regulację aktywności komórek nabłonkowych, fibroblastów i komórek układu odpornościowego. TGFβ1 i aktywowane przez nie ścieżki mają istotne znaczenie w przebudowie tkanki m.in. poprzez udział w przekształcaniu fibroblastów nosowych w miofibroblasty oraz przemianie epitelialno – mezenchymalnej. Wykazano, że TGFβ1 poprzez ścieżkę Smad2/3 indukuje w fibroblastach nosowych ekspresję białka HSP47, co uczestniczy w przekształcaniu fibroblastów w miofibroblasty i zwiększonej produkcji macierzy pozakomórkowej [69]. Zauważono także, że uzyskane od pacjentów z PZZP fibroblasty na skutek aktywacji ścieżki TGFβ1/Smad2/3 wytwarzają kolagen i czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF) prowadząc do modyfikacji tkanki [70]. Aktywacja ścieżki TGFβ1/Smad2/3 wpływa także na zwiększone zdolności do migracji i kurczliwości fibroblastów oraz nagromadzenia fibronektyny [71, 72]. W literaturze istnieją rozbieżności dotyczące ekspresji i roli ścieżki TGFβ1/Smad2/3 w poszczególnych endotypach choroby, co może być związane m.in. ze źródłem anatomicznym pobranego do analizy materiału.

1.6 Ścieżka 2',3'- cAMP - CNPaza - adenozyne - potencjalna rola w patogenezie PZZP

Najnowsze doniesienia naukowe wskazują na istotną rolę adenozyne i ścieżek molekularnych powiązanych z cAMP (cyklicznym adenozyneomonofosforanem) w patogenezie chorób zapalnych górnych dróg oddechowych [73]. Adenozyne jest endogennie wytwarzanym nukleozydem purynowym, który bierze udział w wielu procesach wewnątrz i zewnątrzkomórkowych, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych, a jej aktywność regulowana jest poprzez szereg czynników takich jak: jej stężenie, mikrośrodowisko działania oraz co istotne, rodzaj receptorów dla adenozyne obecnych na komórkach do których się przyłącza. Oprócz szeroko znanego mechanizmu powstawania adenozyne poprzez hydrolizę ATP, istnieje

alternatywna ścieżka syntezy adenozyiny, której pierwotnym źródłem jest mRNA i jego rozpad na skutek m.in. uszkodzenia tkanek i zniszczenia komórek (Rycina 5) [74, 75]. Powstałe z rozpadu mRNA – 2',3'- cAMP jest następnie przekształcane przez CNPazę (2',3'-cykliczną nukleotydo 3'-fosfodesterazę; CNP) do 2' i 3'- AMP, które następnie przy udziale ektonukleotydaz są transformowane do zewnątrzkomórkowej adenozyiny posiadającej zdolność do wiązania się ze swoimi receptorami na spotkanych komórkach (Rycina 5). CNPaza uczestniczy w mielinizacji komórek nerwowych oraz reguluje aktywność mikrotubuli. Jej ekspresja została wykryta także w niemielinizujących komórkach: nabłonka węchowego oraz nabłonka soczewki. Co więcej, badania wykazały, że CNPaza współdziała z TGFβ2 w przebudowie nabłonka soczewki prowadząc do włóknienia i rozwoju zaćmy [76]. Dodatkowo, CNPaza może także regulować funkcjonowanie mikrotubuli w sposób zależny od Smad2 i Smad3 [77]. Inne badania pokazały, że adenozyina poprzez aktywację ścieżek zależnych od TGFβ, reguluje aktywność fibroblastów i wydzielaną przez nich ilość macierzy zewnątrzkomórkowej [78,79]. Dane literaturowe podają także, że CNPaza reguluje stężenie wydzielanych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a obniżenie jej ekspresji prowadzi do większego stężenia egzosomów [80]. Biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia naukowe, zbadanie zależności pomiędzy ekspresją ścieżki TGFβ1/Smad2/3 a CNPazą w nabłonku pacjentów z PZZP daje nadzieje na odkrycie nowych, niepoznanych dotąd mechanizmów zaangażowanych w patogenezę choroby.



Ryc.5. Schemat ilustrujący ścieżki powstawania adenozyzny. Zmodyfikowane na podstawie Jackson et al. [74].

1.7 Rola ścieżki TGFβ1/Smad2/3, CNPazy i małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych

Dane literaturowe wskazują na istotną rolę zmian zachodzących w nabłonku oddechowym wyściełającym jamy nosa i zatoki przynosowe w patogenezie PZZPbP oraz PZZPzP [81-83]. Liczne badania wykazały znaczący udział ścieżki TGFβ1/Smad2/3 w przebudowie tkanek [84, 85], w tym zmianach zachodzących w PZZP [69, 70, 86, 87], jednak istnieją rozbieżności dotyczące jej aktywności i regulacji w poszczególnych endotypach choroby. Ostatnie dane wskazują, że adenozyyna może być jedną z cząsteczek wpływających na aktywność TGFβ1 [78]. Jednym ze źródeł adenozyyny jest ścieżka 2',3'- cAMP, której aktywność została opisana w patogenezie przewlekłych stanów zapalnych górnych dróg oddechowych [73]. Dodatkowo, CNPaza - enzym aktywny w ścieżce 2',3'- cAMP - adenozyyna odgrywa rolę w regulacji powstawania małych

pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [80]. Egzosomy, poprzez niesiony ładunek mogą być odzwierciedleniem procesów zachodzących w wydzielających je komórkach i regulować aktywność pobierających je komórek. Możliwe, że wydzielane przez nabłonek oddechowy lokalnie lub do krwioobiegu pęcherzyki zawierają kargo powiązane ze zmianami jakie mają miejsce w nabłonku w trakcie chronicznego stanu zapalnego, poprzez co z jednej strony stanowią atrakcyjny cel badań ze względu na ich potencjalny udział w patogenezie choroby, z drugiej zaś strony poznanie mechanizmów ich działania może przyczynić się do stworzenia nowych skuteczniejszych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej poprzez ocenę aktywności ścieżki TGFβ1/Smad2/3 oraz CNPazy, jak i ich ewentualnego współdziałania oraz roli egzosomów w patogenezie PZZP, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezy choroby oraz znalezienia odmiennych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę poszczególnych endotypów schorzenia.

2. Założenia i cel pracy

Na podstawie danych literaturowych wskazujących na istotną rolę układu immunologicznego, białek TGFβ1, Smad2, pSmad3, CPNazy, a także małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (egzosomów) w schorzeniach związanych z przewlekłym stanem zapalnym i przebudową tkankową, postawiono hipotezę, że czynniki te uczestniczą również w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych.






Dlatego celem pracy była:

1. Ocena roli układu immunologicznego i egzosomów w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami i bez polipów.
2. Ocena ekspresji nabłonkowej białek TGFβ1, Smad2, pSmad3, CNPazy oraz jej znaczenia klinicznego jako potencjalnego biomarkera u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami i bez polipów.

3. Kopie opublikowanych prac

Article

Evaluation of CNPase and TGF β 1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)

Katarzyna Piszczatowska ¹, Katarzyna Czerwaty ², Karolina Dżaman ², Natalia Jermakow ³, Jacek Brzost ⁴, Ireneusz Kantor ², Nils Ludwig ¹ and Mirosław J. Szczepański ^{1,2,*}

- ¹ Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland; kpiszczatowska@wum.edu.pl (K.P.); nils.ludwig@fau.de (N.L.)
² Department of Otolaryngology, The Medical Centre of Postgraduate Education, 01-813 Warsaw, Poland; katarzynaczzerwaty@gmail.com (K.C.); kfrydel@poczta.onet.pl (K.D.); ireneusz.kantor@gmail.com (I.K.)
³ Department of Hyperbaric Medicine, Military Institute of Medicine—National Research Institute, 04-141 Warsaw, Poland; njermakow@gmail.com
⁴ The Children's Memorial Health Institute, 04-730 Warsaw, Poland; jbrz102018@gmail.com
* Correspondence: mszczepanski@wum.edu.pl

Abstract: Chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps (CRSwNP and CRSsNP, respectively) is a chronic inflammatory disease affecting almost 5 to 12% of the population and exhibiting high recurrence rates after functional endoscopic sinus surgery (FESS). TGF β 1-related pathways contribute to tissue remodelling, which is one of the key aspects of CRS pathogenesis. Additionally, adenosine signalling participates in inflammatory processes, and CNPase was shown to elevate adenosine levels by metabolizing cyclic monophosphates. Thus, the aim of this study was to assess the expression levels of Smad2, pSmad3, TGF β 1, and CNPase protein via immunohistochemistry in sinus epithelial tissues from patients with CRSwNP ($n = 20$), CRSsNP ($n = 23$), and non-CRS patients ($n = 8$). The expression of Smad2, pSmad3, TGF β 1, and CNPase was observed in the sinus epithelium and subepithelial area of all three groups of patients, and their expression correlated with several clinical symptoms of CRS. Smad2 expression was increased in CRSsNP patients compared to CRSwNP patients and controls ($p = 0.001$ and $p < 0.001$, respectively), pSmad3 expression was elevated in CRSwNP patients compared to controls ($p = 0.007$), TGF β 1 expression was elevated in CRSwNP patients compared to controls ($p = 0.009$), and CNPase was decreased in CRSsNP patients compared to controls ($p = 0.03$). To the best of our knowledge, we are the first to demonstrate CNPase expression in the upper airway epithelium of CRSwNP, CRSsNP, and non-CRS patients and point out a putative synergy between CNPase and TGF β 1/Smad signalling in CRS pathogenesis that emerges as a novel still undiscovered aspect of CRS pathogenesis; further studies are needed to explore its function in the course of the chronic inflammation of the upper airways.

Keywords: chronic rhinosinusitis; TGF β 1; Smad2; pSmad3; CNPase; adenosine; airway epithelium



Citation: Piszczatowska, K.; Czerwaty, K.; Dżaman, K.; Jermakow, N.; Brzost, J.; Kantor, I.; Ludwig, N.; Szczepański, M.J. Evaluation of CNPase and TGF β 1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP). *J. Pers. Med.* **2024**, *14*, 894. <https://doi.org/10.3390/jpm14090894>

Academic Editor: Dong-Kyu Kim

Received: 10 July 2024

Revised: 13 August 2024

Accepted: 21 August 2024

Published: 23 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a multifactorial inflammatory disease with a prevalence of 5 to 12% in the global population and is further clinically classified into CRS with nasal polyps (CRSwNP) and without nasal polyps (CRSsNP) [1]. CRS is characterised by an ambiguous molecular background and high recurrence rates, particularly in patients with CRSwNP [2–6]. Interestingly, recent evidence suggests that familial predisposition is a relevant factor in the pathogenesis of CRSwNP [7,8]. One of the key aspects involved in CRS pathogenesis is airway tissue remodelling [9–15]. The interior of the nose and

paranasal sinuses has a surface area from 100 to 200 cm² and is covered with pseudostratified epithelium (upper airway epithelium; UAE) [16], which is crucial for maintaining the proper functionality of the sinuses. Persistent inflammation triggers AE remodelling, specifically epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [14]. A growing body of evidence suggests an involvement of the TGF β /Smad pathway in CRS pathogenesis. TGF β 1 mediates microenvironmental context-dependent processes, including immunoregulation, fibrosis, tissue remodelling, angiogenesis, metastasis, tumour progression, myofibroblast differentiation, and pro- or anti-inflammatory capacities [10,11,17–27]. TGF β 1 acts through both Smad-dependent and Smad-independent signalling pathways. In the canonical Smad-dependent pathway, TGF β 1 activates TGF β 1 type II and type I receptors, leading to the subsequent phosphorylation of Smad2 and Smad3 (receptor-activated Smads). The Smad 2/3 complex binds to Smad4 (Co-Smad) and translocates to the nucleus, where it regulates the expression of genes involved in processes such as proliferation, differentiation, immunoregulation, and tissue remodelling [19,28]. The detailed role of Smad2 and Smad3 in TGF β 1 signal transduction is currently under investigation [29]. Recently, adenosine (ADO) and cAMP-related signalling emerged in the context of the pathogenesis of chronic upper airway inflammatory diseases [30]. ADO is an endogenous purine nucleoside with a wide range of intra- and extracellular activities in both physiological and pathological conditions and can exert pro- or anti-inflammatory activity. The effects of ADO depend on its concentration, microenvironmental conditions, duration of action, and the types of receptors activated on the surface of target cells [30]. In addition to ATP hydrolysis, which is a well-known source of ADO, mRNA breakdown during tissue injury and cellular damage has been identified as an alternative source [31]. 2',3'-cAMP derived from mRNA is converted via CNPase (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; CNP) to 2'-AMP, which is subsequently transformed by ectonucleotidases into extracellular ADO [32,33]. CNPase is primarily expressed in myelinated nerve cells, where it supports nerve myelination and regulates microtubule activity. However, it is also expressed by non-myelinated cells such as olfactory ensheathing cells [34] and lens epithelium cells [35]. It has been shown that the TGF β -dependent expression of CD73 is involved in the generation of ADO by regulatory T cells (Tregs), CD8+ T cells, dendritic cells, and macrophages [36]. Additionally, increased cAMP levels have been found to alter the TGF β - and Smad-induced expression of extracellular matrix (ECM) components and fibroblast activity [37]. Furthermore, CNPase has been shown to contribute to epithelial remodelling via the TGF β 2-notch pathway, potentially playing a role in fibrosis and cataract development [35]. Additionally, ADO has been found to regulate fibroblast functions and activity, as well as the structure of the ECM through TGF β signalling [38,39]. This regulation may play a crucial role in tissue remodelling related to CRS pathogenesis, particularly involving subepithelial nasal fibroblasts. In the nasal polyp tissue, the expression of both TGF β 1 and TGF β 2 isoforms has been demonstrated [40]. Another significant point is that CNPase associates with microtubules (MTs) [41] and interestingly, Smad2 and Smad3 proteins bind to MTs in the absence of TGF β . Treatment with TGF β leads to the dissociation of Smad 2 and Smad3 from MTs, followed by their phosphorylation, translocation to the nucleus, and activation of transcription [42]. Therefore, there may be a possible relationship between the expression of TGF β , Smad2 and pSmad3, and CNPase in UAE and CRS pathogenesis, although this connection has yet to be clarified.

The molecular background of CRS remains elusive, necessitating extensive investigation to pave the way for more effective therapeutic and diagnostic solutions. The interplay between the TGF β 1, Smad, and CNPase pathways could represent a novel and yet undiscovered aspect of tissue remodelling that contributes to disease pathogenesis. Therefore, the aim of this study was to assess the expression of TGF β 1, Smad2, pSmad3, and CNPase in sinus epithelial tissues obtained from patients with CRSsNP, CRSwNP, or non-inflammatory controls, and to evaluate their mutual co-expression.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Samples of sinus tissue were obtained from 43 patients diagnosed with CRS, including 23 patients with CRSsNP and 20 patients with CRSwNP, who underwent functional endoscopic sinus surgery (FESS) for the first time in the Department of Otolaryngology, the Medical Centre of Postgraduate Education in Warsaw. The diagnosis of CRS was based on recommendations according to the European Position Paper on Chronic Rhinosinusitis (EPOS2020) [1]. The study included patients qualified for FESS for the first time due to insufficient disease control with pharmacological treatment. Exclusion criteria included previous sinus surgery, a diagnosis of cystic fibrosis, immunodeficiencies, smokers, systemic corticosteroids users, and systemic or local antibiotic therapy within four weeks prior to FESS. As controls, mucosal tissue samples were obtained from eight patients (NC; N = 8) undergoing surgery for non-CRS upper airway disorders, such as septoplasty or sleep apnoea syndrome. The mucosal samples in NC were taken from the lateral surface of the middle nasal concha, while in CRS patients, they were taken from the uncinata process. Additionally, normal retro auricular excess skin samples from ten patients operated on for middle ear cholesteatoma were used as positive staining control tissues for the tested antigens.

This study was approved by the Local Ethics Committee at the Medical Centre of Postgraduate Education (#50/PB/2019 to K.C. and #15/PB/2018 to I.K.). All subjects enrolled in the study completed the Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20) questionnaire [43] and signed informed consent forms. Patients were also interviewed for symptoms described in the EPOS 2020—main symptoms: nasal patency, mucus, sinus pain, and smell; additional symptoms: headache, fatigue, fetor ex ore, fever, toothache, cough, and earache. The questionnaire for patients based on the EPOS 2020 is included in Supplementary Table S1. The clinicopathologic characteristics of the CRS and control group patients included in this study are presented in Table 1.

Table 1. Clinicopathological characterisation of CRSwNP, CRSsNP, and NC patients included in this study ^a.

Characteristic	NC Patients (n = 8)	CRSwNP Patients (n = 20)	CRSsNP Patients (n = 23)
Sex			
Male	6	12	15
Female	2	8	8
Age			
Range	19–44	26–71	19–65
Median	32	48.5	35
Allergy	0	8	9
Asthma	1	3	2
Aspirin sensitivity/ non-exacerbated respiratory disease (N-ERD)	0	2	0
Eosinophiles [%] (average ± SD)	2.1 (±1.183)	6.118 (±4.94)	3.275 (±2.236)
Eosinophiles [10 ³ /μL] (average ± SD)	0.129 (±0.063)	0.427 (±0.404)	0.229 (±0.178)

^a Statistical analysis for age: control vs. CRSsNP: $p = 0.298$; control vs. CRSwNP: $p = 0.003$; CRSwNP vs. CRSsNP: $p = 0.003$; for sex: control vs. CRSsNP: $p = 0.944$, control vs. CRSwNP: $p = 0.755$, CRSwNP vs. CRSsNP: $p = 0.971$.

2.2. Immunohistochemistry

Tissues were fixed in 10% buffered formalin solution, paraffin-embedded, and sectioned into 4 µm thick slices, and then mounted on the Adhesive Superfrost Plus Slides (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, J1800AMNZ). The following primary antibodies diluted in Antibody Diluent (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7133) were used for immunostaining: mouse monoclonal anti-human CNPase (1:200; Abcam, Cambridge, UK, ab6319), rabbit monoclonal anti-human anti-Smad2 (1:100; Cell Signalling, Danvers, MA, USA, 5339T), rabbit polyclonal anti-human anti-Phospho-Smad3 (1:400; St John's Laboratory, London, UK, STJ114841), rabbit polyclonal anti-human anti-TGFβ1 (1:125, Abcam, Cambridge, UK, ab92486), or the appropriate isotype control IgG. After standard deparaffinisation, rehydration, and antigen retrieval in pH = 9 (Epitope Retrieval Solution, Novocastra, Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7119) for 30 min in a water bath at 98 °C, sections were stained according to the manufacturer's instructions for the Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7140-K). First, the activity of endogenous peroxidase was blocked with Novocastra™ Peroxidase Block (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7101), and then Novocastra™ Protein Block was used to eliminate the non-specific binding of the primary antibody and polymer. Next, sections were incubated with the primary antibody or only with the Antibody Diluent (negative controls) for 75 min at room temperature (RT) in the moist chamber, followed by incubation with a secondary antibody—Novocastra™ Post Primary (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7111)—to detect mouse antibodies, and subsequently incubation with Novolink™ Polymer occurred (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7112), a solution that recognizes the Post Primary and rabbit antibodies, and finally with DAB (3,3'-diaminobenzidine) Chromogen (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7105) diluted in the Novolink™ DAB Substrate Buffer (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7143). Sections were counterstained with Novocastra™ haematoxylin (Leica Biosystems Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, RE7107), dehydrated following standard procedures, and coverslipped with mounting medium (CV Mount, Leica Biosystems, REF 14046430011). Slides were evaluated using a ZEISS Observer Z1 light microscope (AxioVision 4.8 software; illumination system LUMEN 200; PRIOR, ×400 magnification) by two independent researchers (M.J.S. and K.P.). The sections were scored based on the percentage of positively stained tissue (P) for CNPase, Smad2, pSmad3, and TGFβ1 (<25% = 0; 25–75% = 1; >75% = 2). The level of staining intensity (I) was recorded as follows: 0—none, 1—weak, 2—moderate, 3—strong. Expression (E) of the staining was calculated by multiplying values of positivity (P) and intensity (I) for each section. The haematoxylin and eosin staining was performed on a few selected tissue sections from each group of patients. In the first step, tissues were deparaffinised, rehydrated, and stained with haematoxylin for 5 min. Afterwards, sections were rinsed with water, stained with eosin for 1.5 min, then dehydrated and coverslipped with mounting medium.

2.3. Immunofluorescence Tissue Staining

For immunofluorescence detection of TGFβ1 and CNPase expression, the same primary antibodies mentioned above were used. After standard deparaffinisation, rehydration, and antigen retrieval, sections were blocked in a 4% BSA-PBS solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, A7906) for 1.5 h at RT. Then, sections were incubated with the primary antibody or only with Antibody Diluent (negative controls) overnight at 4 °C in a moist chamber. After overnight incubation, tissues were incubated with a secondary antibody at RT in the dark. The following secondary antibodies were used: goat anti-mouse conjugated with Alexa 488 (1:1000, Life Technologies, Eugene, OR, USA, A-11001) and goat anti-rabbit conjugated with Alexa 594 (1:1000, Life Technologies, Eugene, OR, USA, A-11012). To counterstain the nucleus, sections were then incubated with DAPI solution (1:1000, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, 62248) and coverslipped with Fluorescent Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA, USA, S3023).

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using R programme language (v4.2.2) in the programme RStudio (v2023.03.0). The packages rstatix (v0.7.1) and Hmisc (v5.0-1) were used for analysis and ggpubr (v0.5.0) and corrplot (v0.92) for visualisation. The Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were used to evaluate the differences between groups in selected immunohistochemistry and clinical parameters, and Spearman correlation analysis was used to assess the correlation between those factors.

3. Results

3.1. Levels of Smad2, pSmad3, TGF β 1, and CNPase Antigens in the Upper Airway Epithelium and Blood Eosinophils of CRSsNP, CRSwNP, and NC Patients

Smad2-positive cells were detected in the UAE of all patient groups (Figure 1b(J–L)), with the highest levels of Smad2 expression observed in the CRSsNP patient group. Smad2 expression was significantly elevated in patients with CRSsNP compared to those with CRSwNP ($p = 0.001$). Furthermore, Smad2 expression was markedly higher in CRSsNP patients compared to NC patients ($p < 0.001$; Figure 1c). pSmad3-positive cells were present in the UAE of the CRSsNP, CRSwNP, and NC groups (Figure 1b(M–O)), with the highest expression levels of pSmad3 in the CRSwNP group. The expression of pSmad3 was significantly elevated in the CRSwNP group compared to the NC group ($p = 0.007$; Figure 1c). TGF β 1-positive cells were detected in UAE derived from the CRSsNP, CRSwNP, and NC groups (Figure 1b(G–I)), with expression significantly increased in CRSwNP patients. TGF β 1 expression was higher in CRSwNP patients compared to NC patients ($p = 0.009$; Figure 1c). Similarly, CNPase-positive cells were present in tissues from all three patient groups (Figure 1b(P–R)), with the highest levels in the NC group. CNPase expression was significantly decreased in CRSsNP compared to NC patients ($p = 0.03$; Figure 1c). Additionally, Smad2-, pSmad3-, TGF β 1-, and CNPase-positive cells were detected in the subepithelial matrix area in patients in the CRSsNP, CRSwNP, and NC groups (Figure 2).

For the evaluation of co-expression, fluorescence staining was performed, revealing that TGF β 1 and CNPase were co-localised in the epithelium of patients with CRSsNP and CRSwNP, as well as in the epithelium harvested from NC patients (Figure 3).

The levels of blood eosinophils were significantly elevated in patients with CRSwNP compared to NC, both in terms of their percentage in the blood ($p = 0.006$) and their absolute concentrations ($p = 0.004$; Figure 4a,b, respectively).

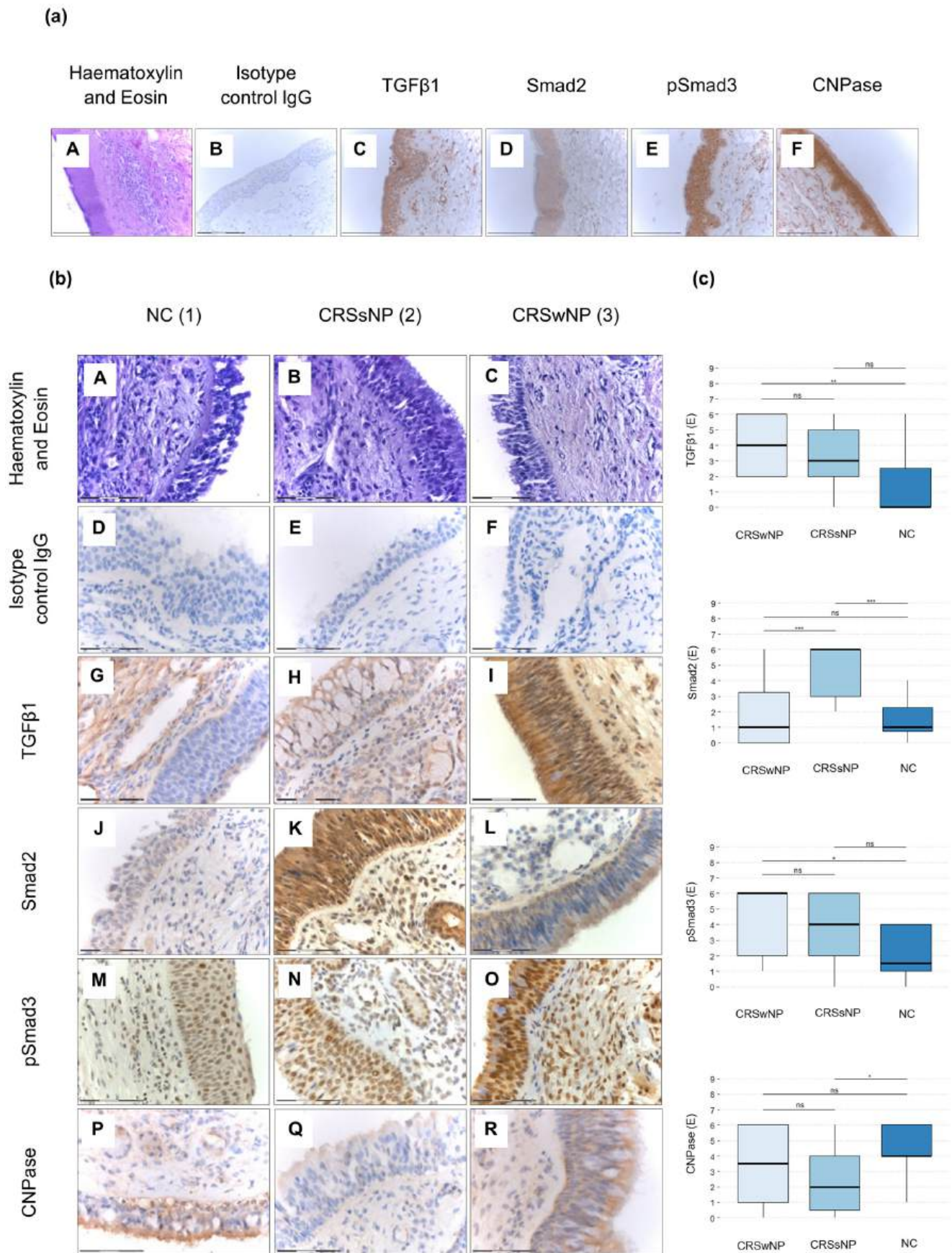


Figure 1. Tissue section staining. (a) Positive staining control tissue (normal skin): (A) H+E staining; (B) isotype control IgG; (C) TGFβ1; (D) Smad2; (E) pSmad3; (F) CNPase; (b) H+E; TGFβ1; Smad2;

pSmad3; and CNPase immunohistochemical staining of the upper airway epithelium derived from normal control (NC) (1: A,D,G,J,M,P), CRSsNP (2: B,E,H,K,N,Q), and CRSwNP (3: C,F,I,L,O,R); 400× magnification; (c) Smad2, pSmad3, TGFβ1, and CNPase expression (E) in the upper airway epithelium of NC, CRSsNP, and CRSwNP (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns—non-statistical significance). The graphs present median values of staining expression.

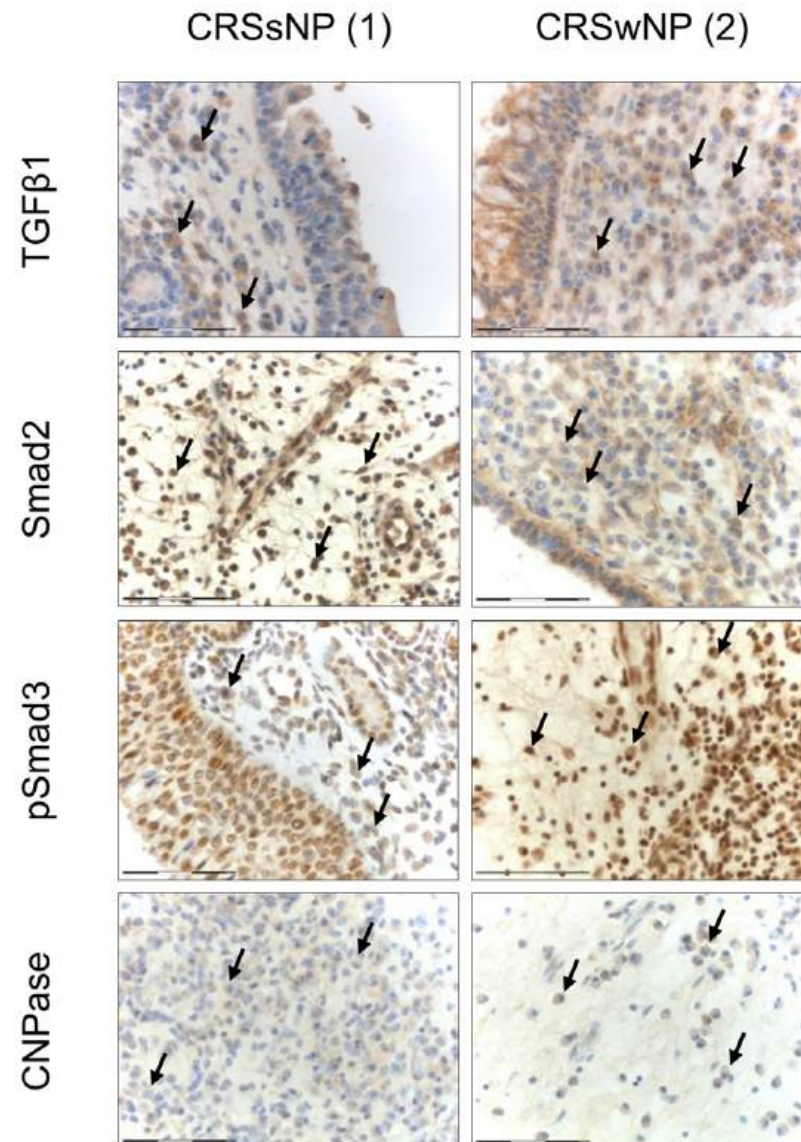


Figure 2. TGFβ1-, Smad2-, pSmad3-, and CNPase-positive cells (arrows) infiltrating the subepithelial area of the airway epithelium derived from CRSsNP (1) and CRSwNP (2) patients (400× magnification). The images present the representative TGFβ1+, Smad2+, pSmad3+, and CNPase+ cells in the subepithelial area that we have observed in the stained tissues; however, an evaluation of their quantity was not the aim of our current study.

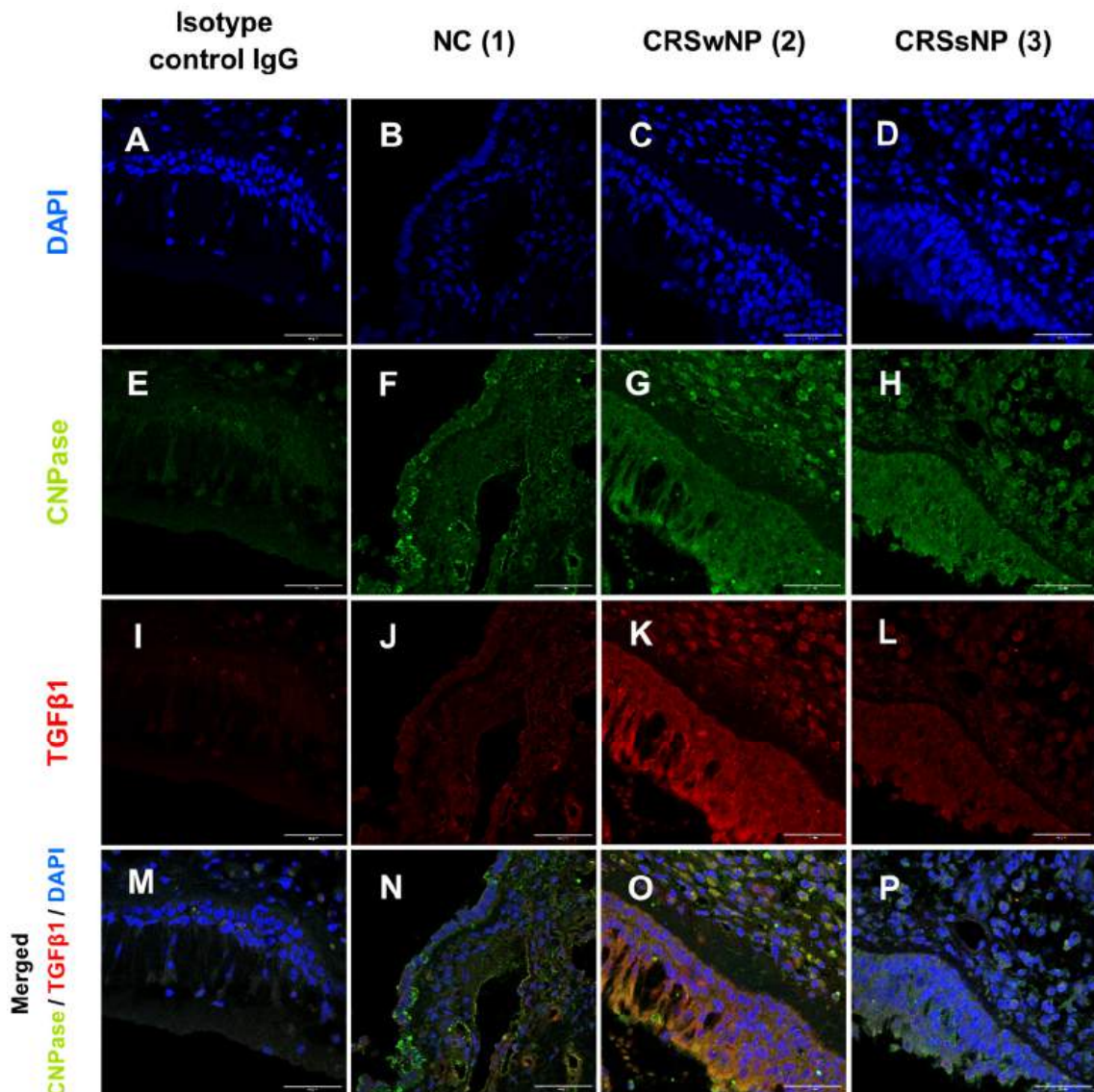


Figure 3. TGFβ1 and CNPase immunofluorescence staining of the upper airway epithelium derived from NC (1) (B,F,J,N), CRSwNP (2) (C,G,K,O), and CRSsNP (3) (D,H,L,P); Isotype control IgG (A,E,I,M); 600× magnification.

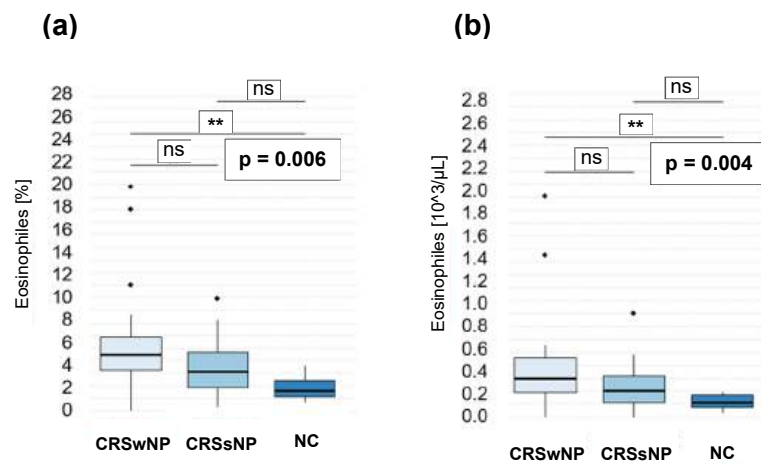


Figure 4. Eosinophils in the blood of CRSwNP, CRSsNP, and NC at the percentage (a) and concentration [10³/μL] in the blood (b) (** $p < 0.01$); ns—non-statistical significance.

3.2. Expression Levels of Smad2, pSmad3, TGFβ1, and CNPase Correlate Positively with Each Other within Specific Patient Groups, Clinically Observed Symptoms, and Selected Questions from SNOT-20 and EPOS 2020 Questionnaires

The correlations between TGFβ1, Smad2, pSmad3, and CNPase antigens were assessed within NC, CRSwNP, and CRSsNP patients, and all relationships are presented in the correlation matrices in Figure 5a–c, respectively. In our study, groups did not differ by sex (Chi² test).

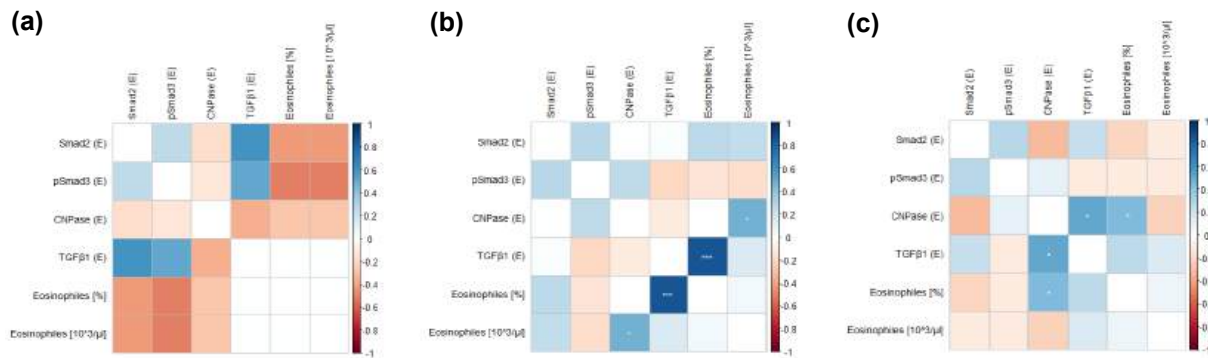


Figure 5. Correlation matrix between Smad2, pSmad3, TGFβ1, and CNPase immunostaining in the upper airway epithelium of NC (a), CRSwNP (b), and CRSsNP (c) and within groups (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). Heatmaps present correlation between median values of antigen expression and quantities of blood eosinophils.

3.2.1. Correlations within Control Patients

In NC patients, pSmad3 expression correlated positively with the following questions from the SNOT-20 questionnaire: q 10—facial pain ($p = 0.01$; $r = 0.832$), q 16—reduced productivity ($p = 0.016$; $r = 0.805$), q 17—reduced concentration ($p = 0.017$; $r = 0.8$), and with fatigue ($p = 0.012$; $r = 0.826$). Negative correlations were observed between the expression of Smad2 and nasal patency ($p = 0.041$; $r = -0.726$), as well as TGFβ1 with q 2—sneezing ($p = 0.043$; $r = -0.0722$) (Figures 6a and 7a).

3.2.2. Correlations within the Group of Patients with CRSsNP

In CRSsNP patients, positive correlations were observed between expression levels of CNPase and TGFβ1 ($p = 0.049$; $r = 0.413$). Additionally, in CRSsNP patients, CNPase expression correlated with the level of blood eosinophils ($p = 0.0497$; $r = 0.414$) (Figure 5c), as well as with patient age ($p = 0.024$; $r = 0.472$). In CRSsNP patients, pSmad3 expression correlated positively with the following questions from the SNOT-20 questionnaire (Figure 7c): q 4—cough ($p = 0.036$; $r = 0.439$), q 17—reduced concentration ($p = 0.013$; $r = 0.512$), and cough in the EPOS questionnaire ($p = 0.028$; $r = 0.457$). Negative correlations were found with q 7—ear fullness ($p = 0.019$; $r = -0.483$). Smad2 expression correlated positively with swelling observed in endoscopy ($p = 0.005$; $r = 0.562$) and toothache ($p = 0.017$; $r = 0.490$). TGFβ1 negatively correlated with fever ($p = 0.025$; $r = -0.467$) (Figures 6c and 7c).

3.2.3. Correlations within the Group of Patients with CRSwNP

In patients with CRSwNP, blood eosinophils positively correlated with the expression levels of CNPase ($p = 0.012$; $r = 0.555$) and TGFβ1 ($p = 0.0000578$; $r = 0.749$). TGFβ1 expression also showed positive correlations with fatigue ($p = 0.032$; $r = 0.481$), fever ($p = 0.042$; $r = 0.458$), q 2—sneezing ($p = 0.027$; $r = 0.493$), q 3—runny nose ($p = 0.046$; $r = 0.451$), and q 6—thick nasal discharge ($p = 0.006$; $r = 0.594$). Smad2 expression correlated positively with swelling observed in endoscopy ($p = 0.045$; $r = 0.452$), cough in the EPOS questionnaire ($p = 0.041$, $r = 0.460$), fetor ex ore ($p = 0.043$; $r = 0.457$), q 4—cough ($p = 0.049$; $r = 0.446$), and q 7—ear fullness ($p = 0.016$, $r = 0.531$) (Figures 6b and 7b).

3.3. Age of Patients Correlated with the Subtype of CRS and CNPase Expression Level

The age of patients was significantly higher in the CRSwNP group compared to the CRSsNP group ($p = 0.016$) and NC group ($p = 0.01$). A positive correlation was observed between patient age and CNPase expression ($p = 0.024$) in CRSsNP patients.

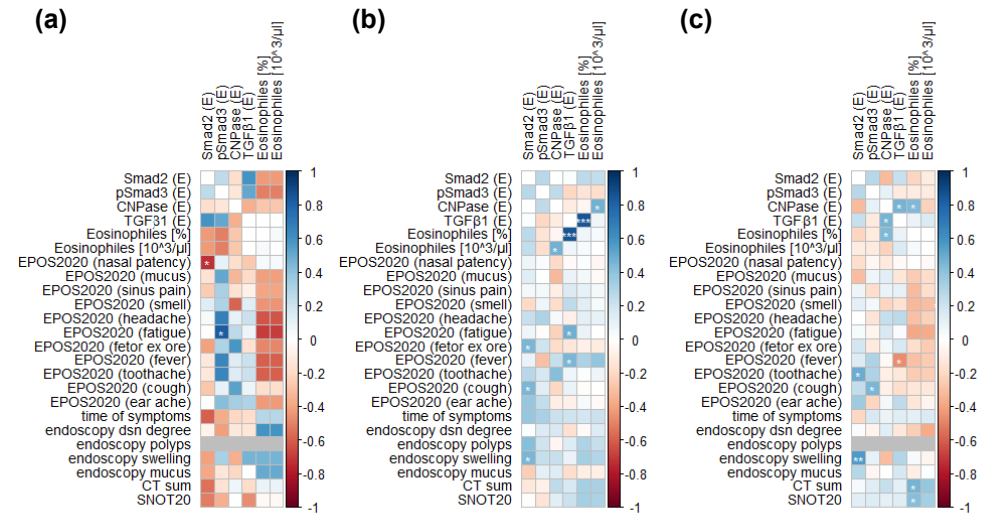


Figure 6. Correlation matrix between Smad2, pSmad3, TGFβ1, and CNPase immunostaining in the upper airway epithelium of NC (a), CRSwNP (b), and CRSsNP (c) and selected clinically observed symptoms (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Grey cells represent parameters not applicable in the indicated group of patients.

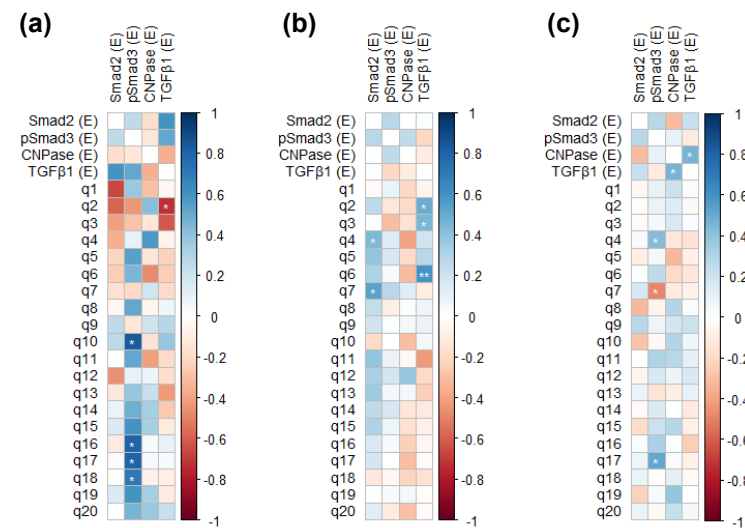


Figure 7. Correlation matrix between Smad2, pSmad3, TGFβ1, and CNPase immunostaining in the upper airway epithelium of NC (a), CRSwNP (b), and CRSsNP (c) and the SNOT-20 questions (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). q 1—need to blow nose; q 2—sneezing; q 3—runny nose; q 4—cough; q 5—postnasal discharge; q 6—thick nasal discharge; q 7—ear fullness; q 8—dizziness; q 9—ear pain; q 10—facial pain/pressure; q 11—difficulty falling asleep; q 12—wake up at night; q 13—lack of good night’s sleep; q 14—wake up tired; q 15—fatigue; q 16—reduced productivity; q 17—reduced concentration; q 18—frustrated/restless/irritable; q 19—sad; q 20—embarrassed.

4. Discussion

Current evidence indicates that tissue remodelling plays a crucial role in the pathogenesis of CRS [10,13,14,27]. It involves modifications in epithelial cells, resident fibroblasts, the ECM, and the activity and composition of infiltrating immune cells. These changes collectively contribute to oedema, fibrosis, pseudocysts [44], basement membrane thickening,

goblet cell hyperplasia [18], submucosal gland alterations [45], and changes in vascularity [46]. Based on the literature, we hypothesised that TGF β /Smad signalling and CNPase may play a role in tissue transformation in CRS.

In this study, we demonstrated the expression of TGF β 1, Smad2, pSmad3, and CNPase in the epithelium obtained from patients with CRSsNP and CRSwNP as well as NC, with several distinctions between patient groups. TGF β 1 expression was upregulated in the mucosa of CRSwNP compared to NC. Smad2 expression was significantly increased in the CRSsNP group compared to CRSwNP and NC. pSmad3 expression was overexpressed in CRSwNP compared to NC. In contrast, another study reported the increased expression of TGF β 1 and TGF β 2, a higher number of pSmad2-positive cells, and increased collagen expression in CRSsNP patients compared to controls, with the downregulation of TGF β 1, pSmad2, and collagen in CRSwNP patients [47]. Differences in these results may be due to variations in the tissues analysed [48], the type of sinuses, the disease state of patients, or differences in the technical approach to immunohistochemical staining and analysis.

The molecular mechanisms underlying TGF β 1/Smad2 activity in the UAE are not well understood. It has been shown that TGF β 1 treatment alters the morphology and activity of epithelial cells and fibroblasts. In bronchial epithelial cells, TGF β 1 triggers Smad3 phosphorylation and induces changes characteristic of EMT, including (1) the expression of cellular markers, (2) alterations in cellular morphology, (3) overexpression of proteins related to ECM and migratory capacities, and (4) upregulation of TGF β RI (TGF- β receptor I) and TGF β 1 itself [49]. Similarly, TGF β 1 induces EMT in epithelial cells derived from nasal polyps or the inferior turbinate, with this effect being particularly pronounced in tissues with high levels of TGF β 1 and Smad3 compared to healthy tissue samples [50], consistent with our findings. Fibroblasts residing in the subepithelial area of the upper airways are significant in CRS pathogenesis. TGF β 1 treatment activates Smad signalling, resulting in (1) the overexpression of EMT-related genes [51], (2) increased production of collagen and connective tissue growth factor (CTGF) [5], (3) enhanced migratory and contraction capacities [6], (4) formation of myofibroblasts, particularly in the pedicle area of nasal polyps, and (5) accumulation of fibronectin, which is significantly elevated in CRSwNP patients compared to controls [52–54]. We also observed a positive correlation between Smad2 expression and swelling observed during endoscopy in CRSsNP and CRSwNP patients, suggesting its role in tissue remodelling.

Our findings show enhanced Smad2 expression in CRSsNP patients. In renal epithelium, Smad2 inhibits Smad3 phosphorylation, nuclear translocation, and activation of target genes involved in ECM production and fibrosis [55]. Additionally, Smad7 can inhibit the translocation of the Smad2/3 complex to the nucleus, potentially regulated by Smad3 in a negative feedback loop [19,28]. Our data suggest that the interactions within the Smad family may differ between CRSsNP and CRSwNP patients.

In this study, we demonstrated for the first time, to the best of our knowledge, the expression of CNPase in the epithelium of CRSsNP, CRSwNP, and control non-CRS patients. The aim of this study was to evaluate the presence of CNPase in these tissues, compare its expression levels among the patient groups, and assess potential relationships with TGF β 1, Smad2, and pSmad3 proteins. The role of CNPase, particularly in non-myelinated cells, remains poorly understood and represents an exciting research gap with the potential to enhance our understanding of various disorders, including chronic upper inflammatory conditions. Based on the literature and our study, we propose several possible directions for CNPase activity. However, a detailed investigation of its mechanisms using advanced cell culture models and materials from a broader patient cohort is necessary.

Firstly, we found a positive correlation between CNPase and TGF β 1 expression in the sinus epithelium from CRSsNP patients, as well as their colocalisation in the epithelial area. Therefore, we hypothesize a potential synergistic effect of CNPase and TGF β 1 in promoting EMT. This hypothesis is supported by recent findings that CNPase promotes EMT in lens epithelial cells, leading to the increased expression of EMT-related markers

(vimentin, α -SMA, and fibronectin). Interestingly, this process was also mediated by a member of the TGF family [35].

Secondly, CNPase expression was significantly decreased in the epithelium of CRSsNP patients compared to NC patients. However, this effect needs to be confirmed in a larger patient cohort to determine if it is a general characteristic of CRSsNP or specific to certain phenotypes. Additionally, including more non-CRS patients in the control group would be beneficial. The absence of CNPase enzyme activity in the tissue might lead to an accumulation of 2',3'-cAMP, which is known to promote the opening of mitochondrial permeability transition pores (mPTPs), resulting in apoptosis, necrosis, and further tissue damage. In the case of kidney injury, CNPase has been shown to mediate the metabolism of 2',3'-cAMP, leading to increased levels of ADO and an anti-inflammatory, renoprotective process [31]. Furthermore, cells lacking CNPase expression exhibit increased levels of secreted small extracellular vesicles [56], which play a role in regulating immune cell activities, tissue remodelling, and angiogenesis in CRS [54,57–64]. These vesicles are present in all body fluids and can transport proteins, lipids, and nucleic acids between neighbouring or distant cells/tissues, modulating their activities. For example, small extracellular vesicles isolated from the nasal mucosa of CRSwNP patients contained miR-375-3p, which inhibits a molecule involved in preventing EMT, thereby promoting EMT-triggering mechanisms [65]. Recent research has also found that the mitochondrial isoform of CNPase is crucial for inhibiting SARS-CoV-2 virion development [66]. Interestingly, a study of a Korean cohort demonstrated an increased risk of SARS-CoV-2 infection and severe COVID-19 in CRSsNP patients [67]. Moreover, in a murine model of viral acute rhinosinusitis, the topical intranasal administration of ADO reduced proinflammatory cytokines, cell damage, goblet cell hyperplasia, and mucus production, indicating an anti-inflammatory effect mediated through adenosine 2A (A_{2A}) receptor signalling [68]. Additionally, exogenous aerosol containing ADO has been shown to enhance mucociliary clearance (MCC) [69].

In eosinophilic CRSwNP, increased serum concentrations of ADO are associated with tissue infiltration by eosinophils [70]. Additionally, serum levels of eotaxin in CRSwNP patients might predict postoperative recurrence [71]. Eosinophils infiltrating nasal polyps secrete TGF β 1, which leads to stromal fibrosis and basement membrane thickening [72]. In our study, we observed elevated levels of eosinophiles in the blood of CRSwNP patients compared to NC patients, as well as a positive correlation between blood eosinophile counts and tissue CNPase levels in both CRSwNP and CRSsNP patients, and with TGF β 1 in CRSwNP patients. Given the diminished levels of CNPase in the sinus epithelium of CRSsNP patients, the positive correlation between tissue CNPase and ADO in the bloodstream may have a potential diagnostic value.

Another possible aspect of decreased CNPase in the CRSsNP epithelium could be related to cilia dysfunction. MCC is a key defence mechanism of the nasal epithelium, helping to remove external factors such as environmental pollutants, allergens, and pathogenic microorganisms through mucous transport. In CRS patients, ciliary structure, beating, and function are often impaired [73–75], leading to mucous accumulation, an altered, infection-prone microenvironment, and hypoxic conditions. Interestingly, CNPase is associated with microtubules [41], which are crucial components of ciliary structure; thus, reduced CNPase expression might be linked to these dysfunctions.

There are some limitations to this study. The main limitation was the relatively small number of participants in the control group. We performed additional Cohen's *d* effect size analysis (using *rstatix* v0.7.1 package for R) and power analysis (using *pwr* v1.3-0 package for R), showing six large effects, five small effects, and one moderate effect for tested molecules (Supplementary Table S2). Although the differences in CNPase expression between CRSwNP and NC patients were statistically insignificant, the highest scores in a few CRSwNP patients may reflect specific clinical states that could be more apparent in a larger cohort. We observed statistically significant differences in pSmad3 and TGF β 1 staining intensity between CRSwNP and CRSsNP patients, suggesting that larger studies

may reveal statistically significant differences between these groups. Additionally, we noted the presence of TGF β 1-, Smad2-, pSmad3-, and CNPase-positive immune cells infiltrating the subepithelial area in tissues from CRSsNP, CRSwNP, and NC, indicating similar underlying mechanisms. Based on morphological characteristics, we assume that different cell populations are involved, including innate immune cells such as eosinophiles, basophiles, mast cells, and macrophages, as well as adaptive immune cells like T and B cells. Further staining for specific markers is needed to differentiate between these populations. Due to different eosinophil counts, there is a possibility that different endotypes were enclosed to the investigated groups of patients.

Another limitation is that the CRSwNP group was significantly older than the patients in the other two groups. However, this is consistent with other studies that have observed a correlation between nasal polyps and older age [76].

In this study, we identified correlations between selected antigens stained in the epithelium and common CRS symptoms, as assessed through the SNOT-20 and EPOS 2020 questionnaires and endoscopic examination. In CRSsNP, pSmad3, and CRSwNP, Smad2 correlated positively with cough. Cough reflex sensitivity might be mediated by nasal sensory nerves [77], which can be activated by viral and bacterial infections that also activate pSmad2 and pSmad3 [78]. Additionally, Smad2 and Smad3 may be involved in tissue remodelling, potentially irritating the nerves responsible for cough reflex. In CRSsNP, the positive correlation between pSmad3 and reduced concentration may result from impaired nasal airflow due to tissue remodelling, leading to sleep disturbances and cognitive issues. We also found a negative correlation between pSmad3 and ear fullness in CRSsNP patients. Larger patient cohorts have shown a 69% increased risk of developing middle ear cholesteatoma in CRS patients [79]. Cholesteatoma pathogenesis is associated with decreased Smad3 expression, which is suggested to have pro-apoptotic functions [80]. This protein may link CRS and cholesteatoma pathogenesis, though a further investigation is needed. In CRSsNP, Smad2 positively correlated with toothache, likely due to the close proximity of sinus cavities to the roots of the teeth, where both sinus inflammation and dental disorders may interact [81].

In CRSwNP, TGF β 1 positively correlated with sneezing, runny nose, and thick nasal discharge. TGF β 1 regulates mucin activity in the nasal epithelium [82], and mucins are the main components of airway mucus. The overexpression of gel-forming mucins MUC5AC and MUC5B can lead to symptoms such as runny nose or thick nasal discharge [83]. The activation of sensory nerves in the epithelium may also trigger sneezing. Smad2 positively correlated with ear fullness in CRSwNP. Otologic symptoms in CRS patients, such as Eustachian tube dysfunction (ETD), are prevalent between 15 and 42% [84] and can cause ear pain, pressure, and fullness. Mucosal oedema and sinus secretions may contribute to ETD by impairing the Eustachian tube's ability to equalize pressure [85]. Therefore, Smad2's involvement in tissue remodelling and immune cell activity might be related to these ear disorders. Smad2 also positively correlated with fetor ex ore in CRSwNP patients; however, the multifactorial nature of halitosis warrants further investigation into its relationship with Smad2.

We observed a correlation between TGF β 1 and fever, with CRSsNP showing a negative correlation and in CRSwNP a positive one. Since fever was excluded as a criterion at the time of surgery and was a general question in the questionnaire without specified duration, this represents a limitation of this study. To obtain conclusive results, a larger patient cohort is needed. Additionally, both groups showed a positive correlation between Smad2 expression and swelling observed during endoscopy, suggesting its critical role in tissue remodelling.

These findings indicate that TGF β 1, Smad2, and pSmad3 participate not only at the molecular level but also in the clinical symptoms of CRS. Their involvement in tissue remodelling and epithelial alterations may contribute to nasal blockage, obstruction, and reduced nasal airflow, which, as previously shown, can trigger sleep disturbances [86,87]. Although this study did not find a statistically significant direct correlation between TGF β 1

expression and sleep disorders, other analyses have reported associations between TGF β 1 and sleep disturbances in rabbit models [88] and CRS patients [89]. The data suggest that alterations in the TGF β /Smad signalling pathway may reflect clinical symptoms and could be useful for diagnostic and therapeutic applications, but further detailed investigation and inclusion of a broader patient cohort are needed.

5. Conclusions

This study demonstrates the expression of TGF β 1, Smad2, pSmad3, and CNPase in the UAE obtained from CRSsNP, CRSwNP, and NC patients. To the best of our knowledge, this is the first study evaluating CNPase expression in the sinus epithelium, suggesting the existence of the 2',3'-cAMP-ADO pathway in the upper airways. The identification of CNPase expression in the upper airway mucosa, along with its decreased levels in CRSsNP patients, sheds new light on the pathogenesis of respiratory inflammatory diseases and could lead to novel diagnostic and therapeutic approaches. The positive correlations between TGF β 1, Smad2, pSmad3, and CNPase in the sinus epithelium of CRS patients suggests the presence of unexplored synergistic pathways in disease pathogenesis that require further investigation.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm14090894/s1>. Table S1: Questionnaire based on the EPOS 2020 and fulfilled by patients in VAS scale (0–10; 0—not troublesome and 10—worst thinkable troublesome). Table S2: Results from Cohen's d effect size and power analysis. (CI low and CI high—upper and lower confidence intervals; power—test power).

Author Contributions: Conceptualisation, M.J.S.; methodology, M.J.S. and K.P.; software, K.P.; validation, M.J.S., N.L., N.J., K.D., K.C., J.B. and I.K.; formal analysis, M.J.S. and N.L.; investigation, K.P. and M.J.S.; resources, M.J.S., K.C., K.D., I.K. and K.P.; data curation, M.J.S., K.C., N.J. and K.P.; writing—original draft preparation, K.P., M.J.S. and N.L.; writing—review and editing, M.J.S. and N.L.; visualisation, K.P. and M.J.S.; supervision, M.J.S.; project administration, M.J.S. and K.P.; funding acquisition, M.J.S. and K.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially funded by project 1WK/1/M/MBM/N/21 from the Medical University of Warsaw to K.P. M.J.S. was supported by the National Science Centre, Poland grant # UMO-2017/25/B/NZ5/02949.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee at the Medical Centre of Postgraduate Education to K.C. (#50/PB/2019) and I.K. (#15/PB/2018) for studies involving humans.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: We would like to express our gratitude to Andrzej Kluk from the Medical University in Poznan for advice with the immunohistochemistry staining, and Maciej Gawlak from the Medical University of Warsaw for the confocal analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Fokkens, W.J.; Lund, V.J.; Hopkins, C.; Hellings, P.W.; Kern, R.; Reitsma, S.; Toppila-Salmi, S.; Bernal-Sprekelsen, M.; Mullol, J.; Alobid, I.; et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology* **2020**, *58*, 1–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hopkins, C. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Levi, L.; Havazelet, S.; Reuven, Y.; Elmograbi, A.; Badir, S.; Shraga, Y.; Nakache, G.; Soudry, E. Patterns of recurrence in patients with CRSwNP who underwent complete FESS. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2024**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cavaliere, C.; Masieri, S.; Begvarfaj, E.; Loperfido, A.; Baroncelli, S.; Cascone, F.; Ciofalo, A. Long-Term Perspectives on Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Evaluating Recurrence Rates after Functional Endoscopic Sinus Surgery in the Biologics Era-A 5-Year Follow-Up Study. *J. Pers. Med.* **2024**, *14*, 297. [[CrossRef](#)]

5. Calvanese, L.; Fabbris, C.; Brescia, G.; Di Pasquale Fiasca, V.M.; Deretti, A.; Finozzi, F.; Franz, L.; Frigo, A.C.; Marioni, G. Polyps' Extension and Recurrence in Different Endotypes of Chronic Rhinosinusitis: A Series of 449 Consecutive Patients. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 1125. [[CrossRef](#)]
6. Nakayama, T.; Lee, I.T.; Le, W.; Tsunemi, Y.; Borchard, N.A.; Zarabanda, D.; Dholakia, S.S.; Gall, P.A.; Yang, A.; Kim, D.; et al. Inflammatory molecular endotypes of nasal polyps derived from White and Japanese populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2022**, *149*, 1296–1308.e6. [[CrossRef](#)]
7. Giombi, F.; Carron-Herrero, A.; Pirola, F.; Paoletti, G.; Nappi, E.; Russo, E.; De Virgilio, A.; Mercante, G.; Canonica, G.W.; Spriano, G.; et al. Prevalence of familial link in patients affected by chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2022**, *12*, 1562–1565. [[CrossRef](#)]
8. Oakley, G.M.; Curtin, K.; Orb, Q.; Schaefer, C.; Orlandi, R.R.; Alt, J.A. Familial risk of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: Genetics or environment. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 276–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Huang, G.X.; Mandanas, M.V.; Djeddi, S.; Fernandez-Salinas, D.; Gutierrez-Arcelus, M.; Barrett, N.A. Increased glycolysis and cellular crosstalk in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1321560. [[CrossRef](#)]
10. Brar, T.; Baheti, S.; Marino, M.J.; Kita, H.; Lal, D. Genome-wide Epigenetic Study of Chronic Rhinosinusitis Tissues Reveals Dysregulated Inflammatory, Immunologic and Remodeling Pathways. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2023**, *37*, 692–704. [[CrossRef](#)]
11. Chen, J.; Chen, S.; Gong, G.; Yang, F.; Chen, J.; Wang, Y. Inhibition of IL-4/STAT6/IRF4 signaling reduces the epithelial-mesenchymal transition in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Immunopharmacol.* **2023**, *121*, 110554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bao, H.; Li, X.; Lai, X.; Chen, X.; Li, Y.; Yao, Z.; Huang, Z.; Huang, J.; Chang, L.; Zhang, G. Interleukin-19 upregulates fibronectin and collagen I expression via the NF-kappaB-Smad2/3 pathway in fibroblasts of patients with chronic rhinosinusitis. *Inflamm. Res.* **2023**, *72*, 43–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kao, S.S.; Bassiouni, A.; Ramezani, M.; Finnie, J.; Chegeni, N.; Colella, A.D.; Chataway, T.K.; Wormald, P.J.; Vreugde, S.; Psaltis, A.J. Proteomic analysis of nasal mucus samples of healthy patients and patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, 168–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bankova, L.G.; Barrett, N.A. Epithelial cell function and remodeling in nasal polyposis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2020**, *124*, 333–341. [[CrossRef](#)]
15. Kohanski, M.A.; Cohen, N.A.; Barrett, N.A. Epithelial dysregulation in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (CRSwNP) and aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD). *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *148*, 1161–1164. [[CrossRef](#)]
16. Wang, D.Y.; Li, Y.; Yan, Y.; Li, C.; Shi, L. Upper airway stem cells: Understanding the nose and role for future cell therapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2015**, *15*, 490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Shieh, J.M.; Tsai, Y.J.; Chi, J.C.; Wu, W.B. TGFbeta mediates collagen production in human CRSsNP nasal mucosa-derived fibroblasts through Smad2/3-dependent pathway and CTGF induction and secretion. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 10489–10499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kim, H.J.; Park, J.H.; Shin, J.M.; Yang, H.W.; Lee, H.M.; Park, I.H. TGF-beta1-induced HSP47 regulates extracellular matrix accumulation via Smad2/3 signaling pathways in nasal fibroblasts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15563. [[CrossRef](#)]
19. Batlle, E.; Massague, J. Transforming Growth Factor-beta Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50*, 924–940. [[CrossRef](#)]
20. Shelke, G.V.; Yin, Y.; Jang, S.C.; Lasser, C.; Wennmalm, S.; Hoffmann, H.J.; Li, L.; Gho, Y.S.; Nilsson, J.A.; Lotvall, J. Endosomal signalling via exosome surface TGFbeta-1. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *8*, 1650458. [[CrossRef](#)]
21. Ludwig, N.; Yerneni, S.S.; Azambuja, J.H.; Pietrowska, M.; Widlak, P.; Hinck, C.S.; Gluszek, A.; Szczepanski, M.J.; Karner, T.; Kallinger, I.; et al. TGFbeta(+) small extracellular vesicles from head and neck squamous cell carcinoma cells reprogram macrophages towards a pro-angiogenic phenotype. *J. Extracell. Vesicles* **2022**, *11*, e12294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Walker, E.J.; Heydet, D.; Veldre, T.; Ghildyal, R. Transcriptomic changes during TGF-beta-mediated differentiation of airway fibroblasts to myofibroblasts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Strauss, L.; Bergmann, C.; Szczepanski, M.; Gooding, W.; Johnson, J.T.; Whiteside, T.L. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4345–4354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gao, R.; Chen, Y.; Liu, H.; Ye, M.; Chu, L.; Wang, T. CD109 identified in circulating proteomics mitigates postoperative recurrence in chronic rhinosinusitis with nasal polyps by suppressing TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int. Immunopharmacol.* **2024**, *130*, 111793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wu, Y.; Sun, K.; Tu, Y.; Li, P.; Hao, D.; Yu, P.; Chen, A.; Wan, Y.; Shi, L. miR-200a-3p regulates epithelial-mesenchymal transition and inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps by targeting ZEB1 via ERK/p38 pathway. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2024**, *14*, 41–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jo, S.; Lee, S.H.; Jo, H.R.; Weon, S.; Jeon, C.; Park, M.K.; Kim, T.H.; Cho, S.H. Eosinophil-derived TGFbeta1 controls the new bone formation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology* **2023**, *61*, 338–347. [[CrossRef](#)]
27. Park, J.H.; Shin, J.M.; Yang, H.W.; Park, I.H. DNMTs Are Involved in TGF-beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transitions in Airway Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3003. [[CrossRef](#)]
28. Yang, Y.C.; Zhang, N.; Van Crombruggen, K.; Hu, G.H.; Hong, S.L.; Bachert, C. Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: A key for understanding inflammation and remodeling. *Allergy* **2012**, *67*, 1193–1202. [[CrossRef](#)]

29. Ungefroren, H.; Groth, S.; Sebens, S.; Lehnert, H.; Gieseler, F.; Fandrich, F. Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF-beta1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: Control by Rac1. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 67. [[CrossRef](#)]
30. Pacini, E.S.A.; Satori, N.A.; Jackson, E.K.; Godinho, R.O. Extracellular cAMP-Adenosine Pathway Signaling: A Potential Therapeutic Target in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 866097. [[CrossRef](#)]
31. Jackson, E.K. The 2',3'-cAMP-adenosine pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2011**, *301*, F1160–F1167. [[CrossRef](#)]
32. Jackson, E.K.; Gillespie, D.G.; Mi, Z.; Cheng, D.; Bansal, R.; Janesko-Feldman, K.; Kochanek, P.M. Role of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the renal 2',3'-cAMP-adenosine pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2014**, *307*, F14–F24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jackson, E.K.; Ren, J.; Mi, Z. Extracellular 2',3'-cAMP is a source of adenosine. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33097–33106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Radtke, C.; Sasaki, M.; Lankford, K.L.; Gallo, V.; Kocsis, J.D. CNPase expression in olfactory ensheathing cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 608496. [[CrossRef](#)]
35. Li, Y.; Zhao, Y.; Wang, Y. 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase contributes to epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through the notch signalling pathway. *Cell Prolif.* **2019**, *52*, e12707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Regateiro, F.S.; Howie, D.; Nolan, K.F.; Agorogiannis, E.I.; Greaves, D.R.; Cobbold, S.P.; Waldmann, H. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 2955–2965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schiller, M.; Dennler, S.; Andereg, U.; Kokot, A.; Simon, J.C.; Luger, T.A.; Mauviel, A.; Bohm, M. Increased cAMP levels modulate transforming growth factor-beta/Smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 409–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Vasiukov, G.; Menshikh, A.; Owens, P.; Novitskaya, T.; Hurley, P.; Blackwell, T.; Feoktistov, I.; Novitskiy, S.V. Adenosine/TGFbeta axis in regulation of mammary fibroblast functions. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0252424. [[CrossRef](#)]
39. Vasiukov, G.; Novitskaya, T.; Zijlstra, A.; Owens, P.; Ye, F.; Zhao, Z.; Moses, H.L.; Blackwell, T.; Feoktistov, I.; Novitskiy, S.V. Myeloid Cell-Derived TGFbeta Signaling Regulates ECM Deposition in Mammary Carcinoma via Adenosine-Dependent Mechanisms. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 2628–2638. [[CrossRef](#)]
40. Coste, A.; Lefaucheur, J.P.; Wang, Q.P.; Lesprit, E.; Poron, F.; Peynegre, R.; Escudier, E. Expression of the transforming growth factor beta isoforms in inflammatory cells of nasal polyps. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **1998**, *124*, 1361–1366. [[CrossRef](#)]
41. Bifulco, M.; Laezza, C.; Stingo, S.; Wolff, J. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: A membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1807–1812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dong, C.; Li, Z.; Alvarez, R., Jr.; Feng, X.H.; Goldschmidt-Clermont, P.J. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol. Cell* **2000**, *5*, 27–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Piccirillo, J.F.; Merritt, M.G., Jr.; Richards, M.L. Psychometric and clinimetric validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20). *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2002**, *126*, 41–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pawankar, R.; Nonaka, M. Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2007**, *7*, 202–208. [[CrossRef](#)]
45. Nnabue, O.E.; Pletcher, S.D.; Gurrola, J.G., 2nd; Goldberg, A.N.; Jordan, K.M.; Knox, S.M.; May, A.J. Septum submucosal glands exhibit aberrant morphology and reduced mucin production in chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2021**, *11*, 1443–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liu, W.; Liu, X.; Zhang, N.; Li, J.; Wen, Y.; Wei, Y.; Li, Z.; Lu, T.; Wen, W. Microvessel quantification by fully convolutional neural networks associated with type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2022**, *128*, 697–704.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Van Bruaene, N.; Derycke, L.; Perez-Novio, C.A.; Gevaert, P.; Holtappels, G.; De Ruyck, N.; Cuvelier, C.; Van Cauwenberge, P.; Bachert, C. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124*, 253–259.e2. [[CrossRef](#)]
48. Lucas, B.R.; Voegels, R.L.; do Amaral, J.B.; Bachi, A.L.L.; Pezato, R. BMP-7, MMP-9, and TGF-beta tissue remodeling proteins and their correlations with interleukins 6 and 10 in chronic rhinosinusitis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2021**, *278*, 4335–4343. [[CrossRef](#)]
49. Hackett, T.L.; Warner, S.M.; Stefanowicz, D.; Shaheen, F.; Pechkovsky, D.V.; Murray, L.A.; Argenti, R.; Kicic, A.; Stick, S.M.; Bai, T.R.; et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *180*, 122–133. [[CrossRef](#)]
50. Konnecke, M.; Burmeister, M.; Pries, R.; Boscke, R.; Bruchhage, K.L.; Ungefroren, H.; Klimek, L.; Wollenberg, B. Epithelial-Mesenchymal Transition in Chronic Rhinosinusitis: Differences Revealed Between Epithelial Cells from Nasal Polyps and Inferior Turbinates. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2017**, *65*, 157–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Carsuzaa, F.; Bequignon, E.; Binaud, M.; Jegou, J.F.; Dufour, X.; Lecron, J.C.; Favot, L. Oncostatin M Counteracts the Fibrotic Effects of TGF-beta1 and IL-4 on Nasal-Polyp-Derived Fibroblasts: A Control of Fibrosis in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kim, S.J.; Park, J.H.; Lee, S.A.; Lee, J.G.; Shin, J.M.; Lee, H.M. All-trans retinoic acid regulates TGF-beta1-induced extracellular matrix production via p38, JNK, and NF-kappaB-signaling pathways in nasal polyp-derived fibroblasts. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2020**, *10*, 636–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





53. Wang, Q.P.; Escudier, E.; Roudot-Thoraval, F.; Abd-Al Samad, I.; Peynegre, R.; Coste, A. Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor-beta is involved in the pathogenesis of nasal polyps. *Laryngoscope* **1997**, *107*, 926–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Dillon, S.T.; Wu, D.; Libermann, T.A.; Bleier, B.S. Highly multiplexed proteomic analysis reveals significant tissue and exosomal coagulation pathway derangement in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2018**, *8*, 1438–1444. [[CrossRef](#)]
55. Meng, X.M.; Huang, X.R.; Chung, A.C.; Qin, W.; Shao, X.; Igarashi, P.; Ju, W.; Bottinger, E.P.; Lan, H.Y. Smad2 protects against TGF-beta/Smad3-mediated renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 1477–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ludwig, N.; Yerneni, S.S.; Menshikova, E.V.; Gillespie, D.G.; Jackson, E.K.; Whiteside, T.L. Simultaneous Inhibition of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Triggers a Multi-Fold Increase in Secretion of Exosomes: Possible Role of 2'3'-cAMP. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6948. [[CrossRef](#)]
57. Nocera, A.L.; Mueller, S.K.; Workman, A.D.; Wu, D.; McDonnell, K.; Sadow, P.M.; Amiji, M.M.; Bleier, B.S. Cystatin SN is a potent upstream initiator of epithelial-derived type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2022**, *150*, 872–881. [[CrossRef](#)]
58. Shimizu, S.; Tojima, I.; Nakamura, K.; Arai, H.; Kouzaki, H.; Shimizu, T. Nasal polyp fibroblasts (NPFs)-derived exosomes are important for the release of vascular endothelial growth factor from cocultured eosinophils and NPFs. *Auris Nasus Larynx* **2022**, *49*, 407–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zhou, M.; Tan, K.S.; Guan, W.J.; Jiang, L.J.; Deng, J.; Gao, W.X.; Lee, Y.M.; Xu, Z.F.; Luo, X.; Liu, C.; et al. Proteomics profiling of epithelium-derived exosomes from nasal polyps revealed signaling functions affecting cellular proliferation. *Respir. Med.* **2020**, *162*, 105871. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, W.; Zhang, T.; Yan, Y.; Zhang, J.; Zhou, Y.; Pei, Y.; Yao, L.; You, B.; Chen, J. Exosomal miR-22-3p Derived from Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps Regulates Vascular Permeability by Targeting VE-Cadherin. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 1237678. [[CrossRef](#)]
61. Nocera, A.L.; Mueller, S.K.; Stephan, J.R.; Hing, L.; Seifert, P.; Han, X.; Lin, D.T.; Amiji, M.M.; Libermann, T.; Bleier, B.S. Exosome swarms eliminate airway pathogens and provide passive epithelial immunoprotection through nitric oxide. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *143*, 1525–1535.e1. [[CrossRef](#)]
62. Nocera, A.L.; Miyake, M.M.; Seifert, P.; Han, X.; Bleier, B.S. Exosomes mediate interepithelial transfer of functional P-glycoprotein in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope* **2017**, *127*, E295–E300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Workman, A.; Libermann, T.; Dillon, S.T.; Stegmann, A.; Wurm, J.; Iro, H.; Wendler, O.; Bleier, B.S. Significant polyomic and functional upregulation of the PAPP-A/IGFBP-4/5/IGF-1 axis in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2020**, *10*, 546–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wang, L.F.; Lee, C.H.; Liang, S.S.; Hung, C.C.; Wu, Y.R.; Chien, C.Y.; Lee, C.H.; Chen, J.Y. Mucin 5AC is significantly upregulated in exosomes from the nasal lavage fluid and may promote the expression of COX-2, VEGF and MMP-9: An implication in nasal polyp pathogenesis. *Rhinology* **2021**, *59*, 328–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wang, X.; Zheng, R.; Liang, W.; Qiu, H.; Yuan, T.; Wang, W.; Deng, H.; Kong, W.; Chen, J.; Bai, Y.; et al. Small extracellular vesicles facilitate epithelial-mesenchymal transition in chronic rhinosinusitis with nasal polyps via the miR-375-3p/QKI axis. *Rhinology* **2024**, *62*, 466–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Logue, J.; Melville, V.M.; Ardanuy, J.; Frieman, M.B. 2',3' cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) inhibits SARS-CoV-2 virion assembly by blocking infection-induced mitochondria depolarization. *bioRxiv* **2023**. [[CrossRef](#)]
67. Lee, S.W.; Kim, S.Y.; Moon, S.Y.; Yang, J.M.; Ha, E.K.; Jee, H.M.; Shin, J.I.; Cho, S.H.; Yon, D.K.; Suh, D.I. Estimating COVID-19 Infection and Severity Risks in Patients with Chronic Rhinosinusitis: A Korean Nationwide Cohort Study. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2021**, *9*, 2262–2271.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Waldstein, K.A.; Ganama, M.; Varga, S.M.; Tilley, S.; Hua, X. Topical Adenosine Inhibits Inflammation and Mucus Production in Viral Acute Rhinosinusitis. *Laryngoscope* **2022**, *133*, 2095–2103. [[CrossRef](#)]
69. Hua, X.; Naselsky, W.C.; Bennett, W.D.; Ledent, C.; Senior, B.A.; Tilley, S.L. Adenosine increases nasal mucociliary clearance rate in mice through A2A and A2B adenosine receptors. *Laryngoscope* **2013**, *123*, 306–310. [[CrossRef](#)]
70. Xie, S.; Zhang, H.; Liu, Y.; Gao, K.; Zhang, J.; Fan, R.; Xie, S.; Xie, Z.; Wang, F.; Jiang, W. The Role of Serum Metabolomics in Distinguishing Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyp Phenotypes. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 593976. [[CrossRef](#)]
71. DeConde, A.S.; Mace, J.C.; Levy, J.M.; Rudmik, L.; Alt, J.A.; Smith, T.L. Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Laryngoscope* **2017**, *127*, 550–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ohno, I.; Lea, R.G.; Flanders, K.C.; Clark, D.A.; Banwatt, D.; Dolovich, J.; Denburg, J.; Harley, C.B.; Gauldie, J.; Jordana, M. Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1). *J. Clin. Investig.* **1992**, *89*, 1662–1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Gudis, D.; Zhao, K.Q.; Cohen, N.A. Acquired cilia dysfunction in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2012**, *26*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Chen, B.; Shaari, J.; Claire, S.E.; Palmer, J.N.; Chiu, A.G.; Kennedy, D.W.; Cohen, N.A. Altered sinonasal ciliary dynamics in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* **2006**, *20*, 325–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Li, Y.Y.; Li, C.W.; Chao, S.S.; Yu, F.G.; Yu, X.M.; Liu, J.; Yan, Y.; Shen, L.; Gordon, W.; Shi, L.; et al. Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic nasal epithelium from nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 1282–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Tan, B.K.; Chandra, R.K.; Pollak, J.; Kato, A.; Conley, D.B.; Peters, A.T.; Grammer, L.C.; Avila, P.C.; Kern, R.C.; Stewart, W.F.; et al. Incidence and associated premorbid diagnoses of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 1350–1360. [[CrossRef](#)]
77. Tatar, M.; Plevkova, J.; Brozmanova, M.; Pecova, R.; Kollarik, M. Mechanisms of the cough associated with rhinosinusitis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2009**, *22*, 121–126. [[CrossRef](#)]
78. Lai, L.Y.S.; Gracie, N.P.; Gowripalan, A.; Howell, L.M.; Newsome, T.P. SMAD proteins: Mediators of diverse outcomes during infection. *Eur. J. Cell Biol.* **2022**, *101*, 151204. [[CrossRef](#)]
79. Kuo, C.L.; Yen, Y.C.; Chang, W.P.; Shiao, A.S. Association Between Middle Ear Cholesteatoma and Chronic Rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2017**, *143*, 757–763. [[CrossRef](#)]
80. Leichte, A.; Klenke, C.; Ebmeyer, J.; Daerr, M.; Bruchhage, K.L.; Hoffmann, A.S.; Ryan, A.F.; Wollenberg, B.; Sudhoff, H. NOD-Like Receptor Signaling in Cholesteatoma. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 408169. [[CrossRef](#)]
81. Ferguson, M. Rhinosinusitis in oral medicine and dentistry. *Aust. Dent. J.* **2014**, *59*, 289–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Tong, J.; Gu, Q. Expression and Clinical Significance of Mucin Gene in Chronic Rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2020**, *20*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Kim, D.H.; Chu, H.S.; Lee, J.Y.; Hwang, S.J.; Lee, S.H.; Lee, H.M. Up-regulation of MUC5AC and MUC5B mucin genes in chronic rhinosinusitis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2004**, *130*, 747–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Stoikes, N.F.; Dutton, J.M. The effect of endoscopic sinus surgery on symptoms of eustachian tube dysfunction. *Am. J. Rhinol.* **2005**, *19*, 199–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Tangbumrungham, N.; Patel, V.S.; Thamboo, A.; Patel, Z.M.; Nayak, J.V.; Ma, Y.; Choby, G.; Hwang, P.H. The prevalence of Eustachian tube dysfunction symptoms in patients with chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2018**, *8*, 620–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Young, T.; Finn, L.; Kim, H. Nasal obstruction as a risk factor for sleep-disordered breathing. The University of Wisconsin Sleep and Respiratory Research Group. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1997**, *99*, S757–S762. [[CrossRef](#)]
87. Jiang, R.S.; Liang, K.L.; Hsin, C.H.; Su, M.C. The impact of chronic rhinosinusitis on sleep-disordered breathing. *Rhinology* **2016**, *54*, 75–79. [[CrossRef](#)]
88. Kubota, T.; Fang, J.; Kushikata, T.; Krueger, J.M. Interleukin-13 and transforming growth factor-beta1 inhibit spontaneous sleep in rabbits. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2000**, *279*, R786–R792. [[CrossRef](#)]
89. Alt, J.A.; Sautter, N.B.; Mace, J.C.; Detwiller, K.Y.; Smith, T.L. Antisomnogenic cytokines, quality of life, and chronic rhinosinusitis: A pilot study. *Laryngoscope* **2014**, *124*, E107–E114. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Review

Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis

Katarzyna Czerwaty ^{1,†} , Katarzyna Piszczatowska ^{2,†}, Jacek Brzost ³, Nils Ludwig ⁴ ,
Mirosław J. Szczepański ^{1,2,*}  and Karolina Dżaman ¹ 

¹ Department of Otolaryngology, The Medical Centre of Postgraduate Education, 01-813 Warsaw, Poland

² Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

³ The Children's Memorial Health Institute, 04-730 Warsaw, Poland

⁴ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Regensburg, 93053 Regensburg, Germany

* Correspondence: mszczepanski@wum.edu.pl

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Chronic rhinosinusitis (CRS) is related to persistent inflammation with a dysfunctional relationship between environmental agents and the host immune system. Disturbances in the functioning of the sinus mucosa lead to common clinical symptoms. The major processes involved in the pathogenesis of CRS include airway epithelial dysfunctions that are influenced by external and host-derived factors which activate multiple immunological mechanisms. The molecular bases for CRS remain unclear, although some factors commonly correspond to the disease: bacterial, fungal and viral infections, comorbidity diseases, genetic dysfunctions, and immunodeficiency. Additionally, air pollution leads increased severity of symptoms. CRS is a heterogeneous group of sinus diseases with different clinical courses and response to treatment. Immunological pathways vary depending on the endotype or genotype of the patient. The recent knowledge expansion into mechanisms underlying the pathogenesis of CRS is leading to a steadily increasing significance of precision medicine in the treatment of CRS. The purpose of this review is to summarize the current state of knowledge regarding the immunological aspects of CRS, which are essential for ensuring more effective treatment strategies.

Keywords: chronic rhinosinusitis; immunology; inflammation; sinusitis; nasal polyps; inflammatory endotype



Citation: Czerwaty, K.; Piszczatowska, K.; Brzost, J.; Ludwig, N.; Szczepański, M.J.; Dżaman, K. Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis. *Diagnostics* **2022**, *12*, 2361. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102361>

Academic Editor: Ranjan Ramasamy

Received: 21 August 2022

Accepted: 28 September 2022

Published: 29 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a heterogeneous group of sinus diseases with unclear molecular bases, although some factors are associated with the disease: bacterial, fungal and viral infections, comorbidity diseases, genetic dysfunctions, and immunodeficiency (Figure 1).

The different types of CRS reflect the variety of immunological response pathways and advancements in the understanding of the immunology and endotyping of CRS that are essential for improving the treatment regimen. The major processes involved in the pathogenesis of CRS include airway epithelium (AE) dysfunctions that are influenced by external and host-derived factors. The pathogenesis is mainly influenced by the activation of multiple immunological mechanisms, leading to persistent chronic inflammation (PCI). The purpose of this review is to summarize selected mechanisms of CRS pathogenesis with particular attention to immunological aspects of the disease (Figure 2).

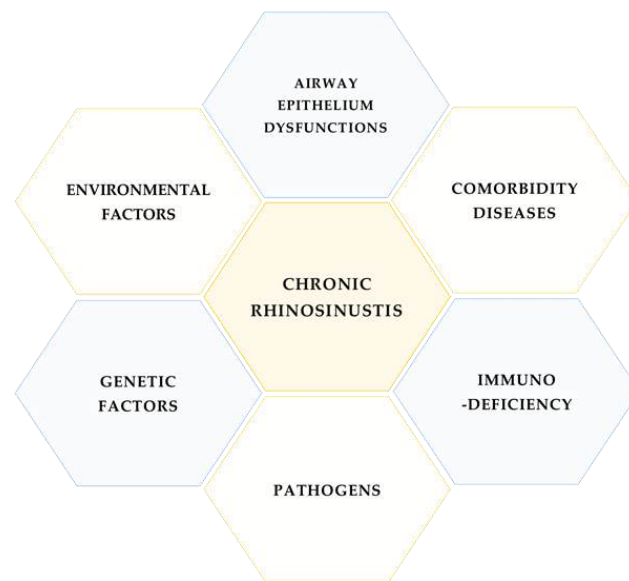


Figure 1. Main factors related to CRS.

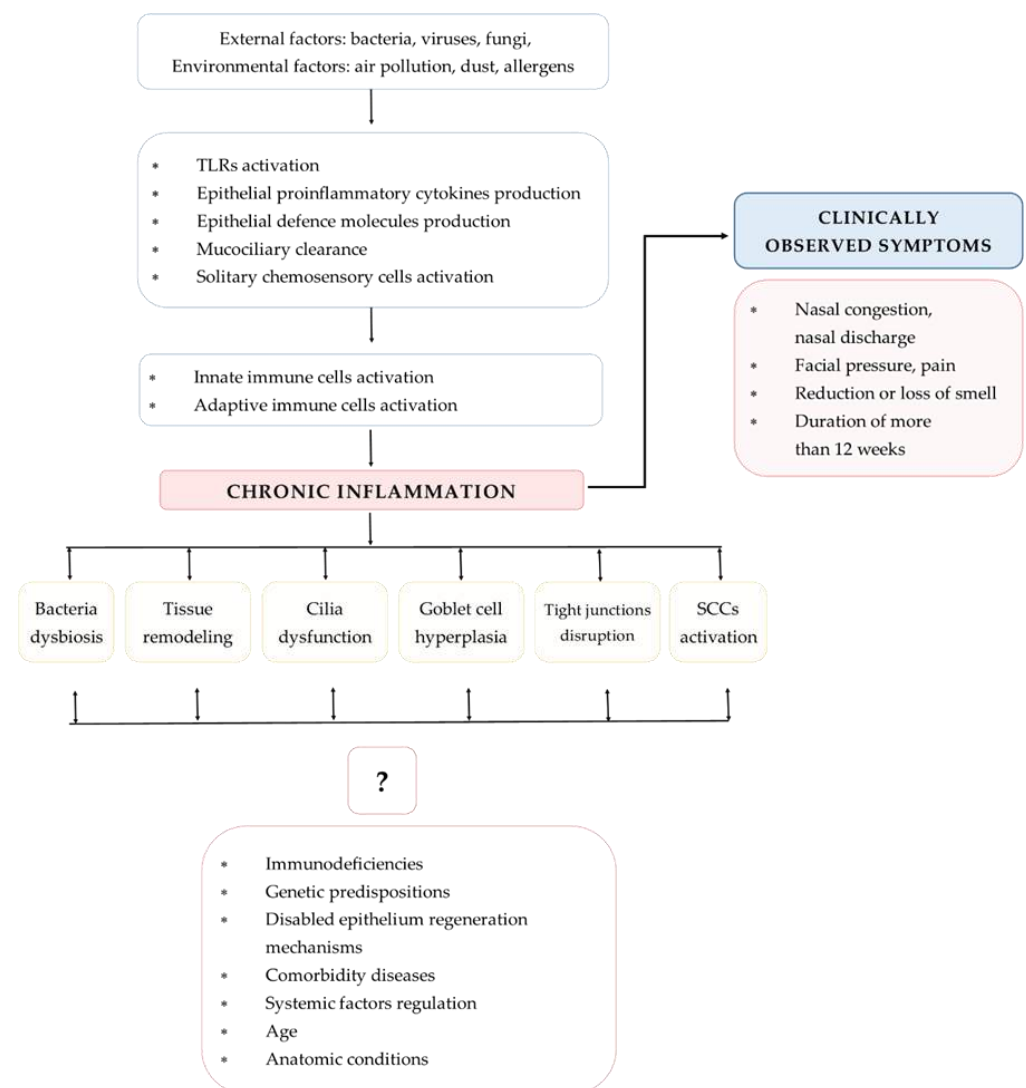


Figure 2. Mechanisms involved in CRS pathogenesis (TLRs—Toll-like receptors; SCCs—solitary chemosensory cells).

2. Immunological Response Pathways in CRS

CRS and PCI are both characterized by a dysfunctional relationship between environmental factors (EFs) and the host immune system. Immune response pathways depend on various factors including the endotype and genotype of the patient; however, the detailed mechanisms that mediate CRS immunopathogenesis are complex and still not sufficiently explained.

CRS can be divided into CRS with nasal polyps (CRSwNP) and chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSsNP) depending on the endoscopically observed presence of nasal polyps in the middle nasal meatus. Classification that better reflects underlying pathomechanisms is based on endotypes [1]. Three main inflammatory endotypes, type 1, type 2 and type 3, are controlled by distinct gene signatures and can be found in both CRSwNP and CRSsNP phenotypes [2,3]. In Western countries, CRSwNP is mainly associated with type 2 inflammation [1].

The sinus mucosa (SM) is an anatomical site that is exposed to EFs and where precisely regulated cooperation between innate and adaptive immunity is crucial for homeostatic balance. In CRS, mucosa activity is compromised by PCI, leading to tissue remodeling, which might result from AE cells dysfunction and enhanced barrier permeability [1]. The first line of defense in SM constitutes the mechanical barrier of AE and mucociliary clearance. The next line of local defense provides the innate and complement immune system (IIS and CIS, respectively). Their activities lead to the identification and elimination of external pathogenic agents and also antigen presentation to activate cells of the adaptive immune response (AIR) [1]. The AIR appears later, but is highly specialized in action and employs multiple subpopulations of T and B cells (Figure 3).

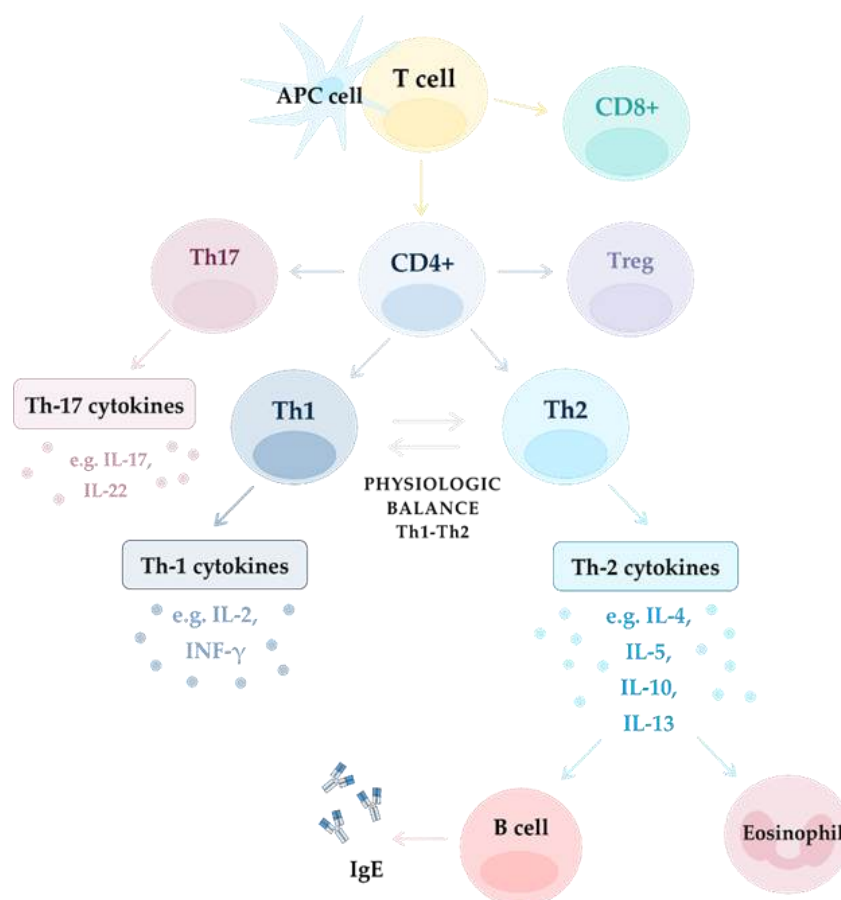


Figure 3. Mechanism of inflammation in different endotypes: Th-2 dependent and non-Th-2 dependent (Th1 and Th17 dependent).

2.1. Airway Epithelium as the First Line of Defense in Sinuses

2.1.1. Structure and Functions of Sinusal Airway Epithelium

Mucociliary clearance is the primary innate defense mechanism, supporting mucous relocation and removal. Mucus is mainly produced by goblet cells (GCs) and contains mucins with antibacterial properties. Impairment of AE cilia functions in CRS impedes mucous transport and elimination. A decrease in the differentiation of ciliated cells and beating frequency is mediated by interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-13 (IL-13) and is also noticeable in GC hyperplasia [4]. Primary ciliary dyskinesia may also be the reason for mucociliary clearance disabilities [1]. Additionally, the eosinophilic endotype of CRSwNP is characterized by increased levels of two main airway mucins that are involved in mucous formulation (MUC5AC and MUC5B) and of the anion exchanger pendrin [5–7]. Increased MUC5AC expression and GC metaplasia were also observed in human CRS sinonasal tissue in response to cigarette smoke exposure [8]. In addition, several multifunctional proteins are upregulated in the mucus of CRSwNP such as cystatin 2, pappalysin-A, periostin, and serpins. Periostin expression is associated with the presence of basement membrane thickening (BMT), fibrosis, and tissue eosinophilia [9] and may be involved in the remodeling of NPs [10]. Cystatin 2 triggers epithelial barrier functions and immunomodulation. Cystatin SN, a type 2 cysteine protease inhibitor, was increased in patients with eosinophilic CRSwNP but decreased in patients with non-eosinophilic CRSwNP in comparison to control subjects [11]. High levels of cystatin SN in nasal secretions are correlated with a faster onset and higher rate of uncontrolled status in CRSwNP [12]. Pappalysin-A stimulates proliferation mediated by the insulin-like growth factor 1. Periostin leads to proliferation, angiogenesis, invasion, eosinophil recruitment, Th2 immune response, and airway remodeling. Serpins, especially serpinF2 and serpinE1, trigger the inhibition of fibrinolysis. Interestingly, after surgery, levels of cystatin 2, pappalysin A, periostin, and serpinF2 decrease, whereas serpinE1 increases, and in the course of the follow-up period—levels of cystatin 2, pappalysin A, and periostin increase [13]. Proteomic analysis of SM samples from CRS patients demonstrated downregulation of pathways associated with mucosal immunity and upregulation of cellular metabolism related to tissue remodeling [14]. Mucus inflammatory proteins might be also involved in olfaction dysfunction and their profile is distinct when comparing CRSwNP and CRSsNP patients [15]. Tight junctions (TJs) by closely located AE cells form selectively permeable barriers. In the course of CRS, levels of molecules building TJs decrease: JAM-A, E-cadherin [16], zonula occludens 1 (ZO-1), occludin 1 [17], and also IFN- γ and IL-4, which most likely play an important role in this process [18]. Barrier integrity and cilia dysfunction are also mediated by a decrease in p63 [19], as well as decreased Wnt pathway activity that may lead to NP formation by reprogramming the epithelium morphology, especially cilium and adherens junctions [20].

2.1.2. Secretory Functions of Airway Epithelium

Another function of the AE is the secretion of defense molecules acting against pathogens. The AE secretome includes lysozyme, lactoferrin, hydrogen peroxide, and nitric oxide (NO) and in the course of CRS secretion of dual oxidases 1 and 2 (DUOX1 and DUOX2, respectively) is accelerated and responsible for hydrogen peroxide production [21]. In response to stimulation with external pathogens and EFs the epithelium releases cytokines and in CRS, IL-25, IL-33, TSLP (thymic stromal lymphopoietin) play a crucial role. Additionally, those cytokines are released by immune cells—IL-33 is mainly produced by macrophages and dendritic cells (DCs) [22] and IL-25 is produced by eosinophils or mast cells (MCs) [23,24]. IL-25 interacts with nasal fibroblasts [25] that are possibly involved in NP formation [24,26]. Similarly, IL-25 triggers lung fibrosis by reprogramming alveolar epithelial cells and fibroblasts [27]. Experimental studies showed that cells stimulated with poly (I:C) release IL-25 and TSLP [28] and that overexpression of TSLP correlates with induction of Th2 inflammatory factors [29]. IL-33 modulates Th2 cytokine production [30] and upregulated levels of IL-33 in the NPs might also contribute to mucosal repair functions by activating the Notch-1 signaling pathway [31]. In the CRSwNP, TSLP and IL-33 activate

ILC2 to produce IL-5 that activates eosinophils together with IL-13 [32]. MCs, especially in the eosinophilic CRSwNP, produce periostin [33] and periostin stimulates the secretion of TSLP by the epithelium which activates MCs to produce IL-5, ultimately stimulating DCs. Those may lead to Th2 response and eosinophilia in CRSwNP [34] (Figure 4).

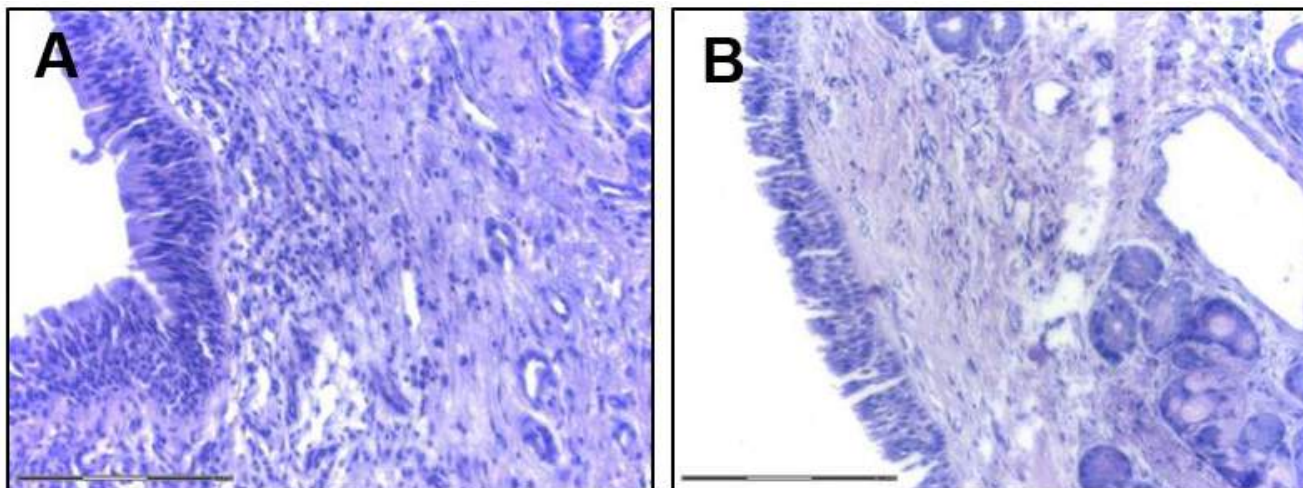


Figure 4. Sinusal airway epithelium (H and E staining, bar indicates 150 μ m; courtesy of K. Piszczatowska). (A) CRSwNP; (B) CRSsNP.

2.1.3. Chemosensory Cells in the Pathogenesis of CRS

Solitary chemosensory cells (SCCs) are present in the AE [35] and appear widely in NPs. They are efficient producers of IL-25 which activates ILC2 responsible for mediation of the Th2 immune response pathway [36,37]. The surface of SSCs is decorated by many forms of taste receptors (T2Rs) with immunoregulatory functions. Bitter stimulation of T2Rs leads to antimicrobial peptide and NO production, as well as elevated ciliary beating frequency. Hereby, the functions of T2Rs in the upper respiratory epithelium may be genetically dependent [38]. In the case of CRSsNP the non-tasting genotype of a bitter taste receptor, taste receptor 2 member 38 (T2R38), relates to increased Gram-negative bacteria colonization and a worse course of disease [39]. Interestingly, the human T2R38 can be detected on the surface of some immune cell populations, for instance on CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and is stronger pronounced in lymphocytes of younger than elderly patients [40]. In addition, T2Rs present in SM contribute to NO production which improves its defense properties [41]. T2Rs also occur on lung macrophages and stimulation with receptor agonists resulted in a decrease in cytokine production [42].

2.1.4. TLRs in the Pathogenesis of CRS

TLRs (Toll-like receptors) are present on the cell surface and also in endosomes, endoplasmic reticulum, and lysosomes and recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Depending on their cellular localization they identify pathogen membrane surfaces or nucleic acids [43,44]. Activation of AE-associated TLRs by pathogens triggers the production and release of cytokines, chemokines, and defense molecules and the activation of immune cells, thus, TLRs contribute to initiating and maintaining an inflammatory response. TLRs can also activate interferon I after exposure to viruses [45]. In the case of CRSsNP, TLR2, TLR4, transforming growth factor β (TGF β), and collagen are upregulated in comparison to CRSwNP and expression of TLR2 and TLR4 correlate with neutrophil infiltration [46]. In the case of CRSwNP upregulation of TLR2 leads to Th17/T regulatory cell (Treg) imbalance and treatment of peripheral blood mononuclear cells with *Aspergillus flavus* accelerates T17-mediated inflammation [47]. Additionally, overexpression of TLR2 and nuclear factor κ B (NF- κ B) in the CRS mucosa is associated with biofilm formation [48].

2.1.5. Hypoxic Conditions in the Airway Epithelium

Hypoxic conditions contribute to immune regulation in CRSwNP by triggering an increase in levels of IL-17A, hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), and HIF-2 α [49]. HIF-1 α expression in SM of patients with CRSwNP is significantly increased compared to SM of healthy controls and the HIF-1 α level in polyp tissues is positively associated with IL-17A production and neutrophilic inflammation [50]. Experimental in vitro models of nasal epithelial cells cultured under hypoxic conditions showed intensified chemokine secretion and chemotaxis of eosinophils and neutrophils compared to normoxic conditions [51] and increased levels of Eotaxin-1 (CCL11), Eotaxin-2 (CCL24), and Eotaxin-3 (CCL26) in NPs [52]. Another study demonstrated that hypoxic conditions that may appear in mucosa during sinusitis lead to increased HIF-1 α and additionally MUC5AC expression [53].

2.2. Innate Immune Cell Response in CRS

General information regarding the role of immune cell populations in chronic inflammation in CRS are shown in Figure 5.

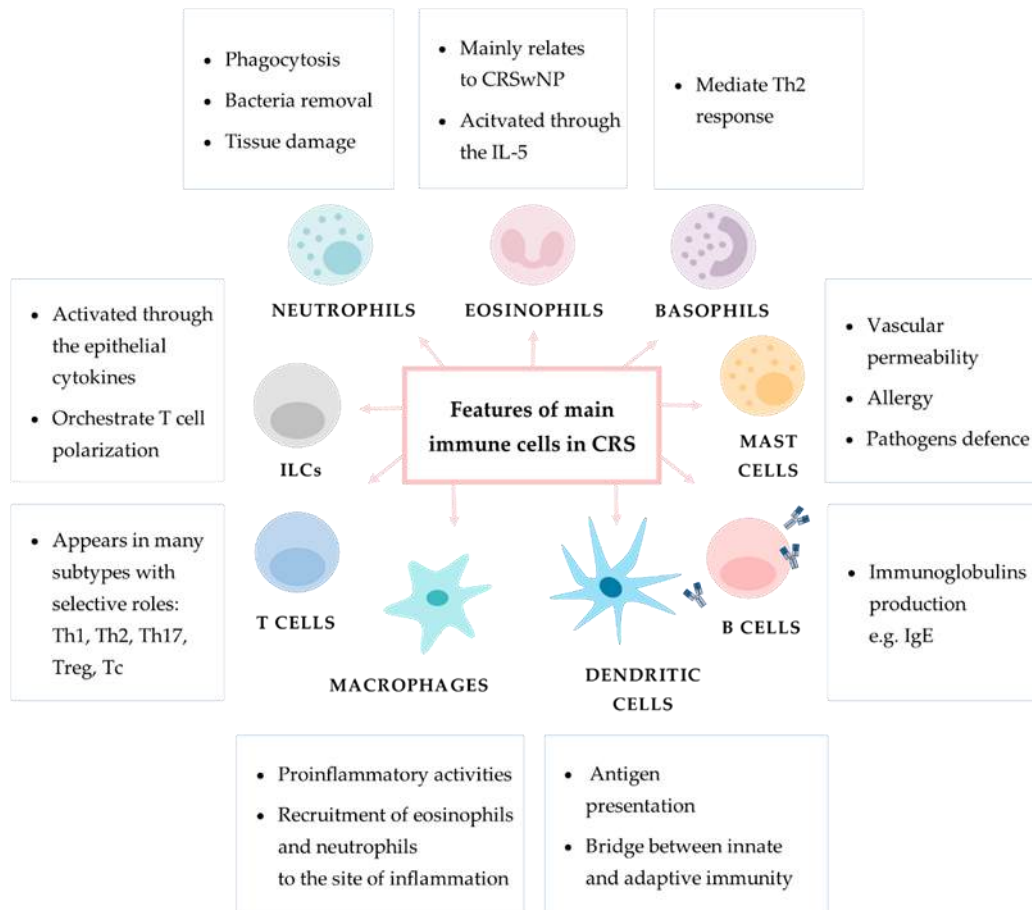


Figure 5. General information regarding the role of main immune cells in chronic inflammation in CRS. In the boxes provided are descriptions of particular immune cells’ main functions.

2.2.1. Innate Lymphoid Cells

The main activators of innate lymphoid cells (ILCs) are the epithelial cytokines IL-25, IL-33, and TSLP. Activated ILCs produce the proinflammatory cytokines IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-22, and IL-17A [54] and modulate functional responses of other immune cell populations. ILC1, ILC2, and ILC3 cooperate, respectively, with the CD4+ T lymphocyte subsets Th1, Th2, and Th17 [55]. Each ILC type produces proper cytokines albeit are able to overtake the function of others depending on stimulation with epithelial cytokines or antigen-presenting cells [56]. In general, ILC1 regulates response to viruses and intracellular bacteria and

promotes Th1 response with secretion of cytokines, mainly IFN- γ . ILC2s are responsible for responding to parasites, allergy, and trigger of tissue repair and favor a type 2 response orchestrated by the cytokines IL-4, IL-5, and IL-13. ILC3s correspond to extracellular organisms, relates to Th17 immune response, and secretes IL-17 and IL-22 [57,58]. To the best of current knowledge, the main role in CRS play ILC2s. However, ILC1s and ILC3s also appear in CRS, but their functional contribution remains unclear.

2.2.2. Neutrophils

Neutrophils are mainly activated by microbes, tissue damage, epithelial IL-8 or fungi and contribute to phagocytosis as well as incapacitation of extracellular microbes. The role of neutrophils in CRS remains unclear; however, they are associated with CRSwNP in Asia, significantly more when comparing to the Caucasian population [59]. Neutrophils contribute to tissue damage and barrier disruption by degranulation [60,61], but on the other hand can secrete oncostatin M that triggers repair of epithelial functions and integrity [62] and counteracts the profibrotic effect of IL-4 and TGF β 1 [63]. The polyp tissue microenvironment leads to the differentiation of IL-17-positive T cells and their quantity correlates with infiltration of neutrophils. Additionally, it has been reported that *Staphylococcus aureus* (SA) might be involved in upregulation of IL-17- and IL-17-positive T cells in NPs [64]. The amount of neutrophil extracellular traps (NETs) in nasal secretion, which participate in innate immunity by trapping microorganisms, is increased in exacerbated CRS in comparison to stable CRS [65]. NETs are significantly increased in NPs which indicates a potential role in pathogenesis of neutrophil inflammation in CRSwNP [66].

2.2.3. Monocytes and Macrophages

Monocytes play a role in the elimination of microbes from the blood and tissues. In the site of inflammation monocytes are able to transfer into macrophages which differentiate into two distinct phenotypes: M1 macrophages which are active in early inflammatory processes-promoted by Th1 cytokines and M2 macrophages stimulated by Th2 cytokines. Studies have shown that M2 macrophages in NPs may also be involved in fibrin deposition modulated by the factor XIII-A. Macrophages attract neutrophils and eosinophils to the inflammatory site [67–69]. In NP tissue, M1 macrophages are the major cellular source of IL-17A and a possible influence on NP formation was demonstrated in a murine NP model [70].

2.2.4. Basophils

Basophils mostly circulate in the blood; however, their release of IL-4 triggers a Th2-mediated inflammatory response [71]. Their increased levels were detected in NPs of patients with aspirin exacerbated respiratory disease (AERD) compared to CRSwNP patients, which may contribute to severity unique to AERD [72]. The role of basophils in CRS immunopathology remains unclear and needs further investigation.

2.2.5. Mast Cells

MCs occur in connective tissues, under the epithelium and in the neighborhood of glandular tissue inside polyps and are activated by stimulation of TLRs with microbes, CIS or antibodies. Degranulation of MC components leads to increased vascular permeability, pathogen defense, allergy and finally, tissue oedema, extracellular matrix (ECM) degradation, and disabled epithelial barrier integrity [73–77]. In the case of CRS MCs contribute to eosinophilic inflammation [78] and trigger CRSwNP and AERD through the release of leukotrienes (cysLTs) or prostaglandins (PGD2) [79,80]. MCs also release periostin that is a meaningful factor with regard to the eosinophilic CRSwNP [33].

2.2.6. Eosinophils

Eosinophilic inflammation is more prevalent with regard to CRSwNP [81]; however, it negatively impacts the course of the disease, independent of the presence of NPs [82,83].

Especially recurrent CRSwNP patients have more eosinophil as well as mucin eosinophilic aggregates [84]. Feng et al. also indicated increased levels of eosinophils in the peripheral blood of eosinophilic CRS patients, suggesting its potential diagnostic value in evaluation of disease severity [85]. In CRS, the activation of eosinophils is maintained by epithelial cytokines, Th2 cytokines, proteases, components of the complement system, stem cell factors, and eicosanoids [86–88]; however, the biggest contributors are ILCs and Th2 cells [32]. Moreover, some microRNAs (miRNAs) might regulate eosinophil activity such as miR-125b that is enriched in eosinophilic CRSwNP [89]. Additionally, the elevated levels of IgE correlate with eosinophil infiltration and possibly lead to NP development [90] as well as Semaphorin 7A—a factor relevant to fibrinolysis that occurs on the airway eosinophils [91]. It was shown for CRSwNP patients with a total IgE serum concentration over 100 IU/mL that systemic steroid therapy is more effective than intranasal steroids [92].

2.2.7. Natural Killer Cells

Natural killer cells (NKs) are cytotoxic lymphocytes with abilities to recognize and kill infected cells and release IFN- γ to stimulate macrophage activation [55]. In CRSwNP, NK cells have decreased degranulation properties and also IFN- γ or tumor necrosis factor α (TNF- α) production [93].

2.3. Adaptive Immune Response Cells in CRS

2.3.1. Dendritic Cells

DCs present antigens to naïve T cells and in this way connect innate and AIR. Epithelial cytokines and ILCs activate DCs, leading to pertinent T cell polarization [55,94]. DCs might infiltrate NP tissue and activate T cells by the CD40/CD40L costimulatory molecules [94]. Other studies described increased levels of programmed cell death 1 (PD-1) in CRSwNP [95] and also programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in the case of eosinophilic endotype in Asia population [96]. In the eosinophilic CRSwNP, DCs expressing OX40 ligand (OX40L)/PD-L1 lead to activation of the Th1/Th2/Th17 pathway, whereas in non-eosinophilic CRSwNP, DCs with lower expression of OX40L/PD-L1 mediate Th1/Th17 response [97]. DCs isolated from CRS patients overexpress miR-150-5p that together with its target—early growth response 2 (EGR2)—trigger T cell activation and proliferation [98].

2.3.2. T Cells

T cells have a variety of biological functions including effector cell recruiting, neutralization of infected cells, cooperation with B cells resulting in production of immunoglobulins, and their role as memory cells in IIC. The main subtypes of T cells are CD4+ T helper cells and CD8+ cytotoxic T cells. CD4+ T cells differentiate into five main subsets: Th1, Th2, Th17, follicular helper T cells, and Tregs [55]. Th1 cells are activated by phagocytosed microbes also with the support of ILC1s. Th1 cells release IFN- γ , TNF- α , and TNF- β that help in microbiome phagocytosis by activating macrophages and antigen presentation, as well as stimulating IgG production by B cells, neutrophils and local tissue inflammation [99,100]. Th2 are mainly activated by parasites which mobilize eosinophils, MCs, ILC2s and enhance the production of IgE [101]. Th2 cells release IL-4, IL-5, and IL-13 which contribute to activation of eosinophils, mucus production, and stimulation of macrophages which may produce growth factors, leading to tissue repair mechanisms [102]. The Th17 subpopulation activates neutrophils, monocytes and secretes IL-17A, IL-17F, and IL-22 [1].

The levels of proper T cell subtypes in CRS differ depending on the endotype and genotype. Increased levels of the Th2 subset with eosinophils appear in CRSwNP patients from Western regions and increased levels of Th1/Th17 and neutrophils are found in Asian population and additionally in patients with NPs [103–105]. Studies have shown a similar inflammatory profile of NPs and neighboring non-polypoidal mucosa from the same patients. NP tissues treated with SA enterotoxin B (SEB) are characterized by an activated Th2/Th17 response pathway in comparison to controls. In the NP tissue and non-polypoid tissue in comparison to control, gene expression levels of IL-5, IL-8, and TLR4 are increased

and TBX21 (encodes for T-bet), FOXP3, IL-1B and IL-6 decreased. It was demonstrated that treatment of NPs with SEB results in an increase in gene expression levels of IL-5 and IL-17A in the tissue and increased TLR4 and decreased IL-1B gene and protein levels in supernatants. Proinflammatory phenotype of contiguous tissue and decreased levels of antibacterial cytokines might be involved in disabled response to pathogens, chronic inflammation and also NP formation [106]. CD8⁺ T cells may transform into cytotoxic T cells with abilities to kill infected or damaged cells when stimulated by antigens or other factors [55]. It was demonstrated that higher levels of CD8⁺ than CD4⁺ T cells can be found in CRSwNP and that the local microenvironment of NPs promotes T cell variation [107] and the release of proinflammatory cytokines with antiapoptotic properties for T cells [108]. CD8⁺ T cells are upregulated in both: eosinophilic and non-eosinophilic CRSwNP [109].

Overall, in CRSsNP the Th1 and Th17 immune response pathways are activated and relate to the expression of TGF β , INFs and IL-6, IL-8, and IL-17 [110]. In contrast, another analysis did not demonstrate significant differences in the level of IFN- γ between CRSwNP, CRSsNP and in comparison to the control group [111]. CD4⁺ Tregs characterized by Foxp3 expression have immunosuppressive functions. They are involved in self-antigen recognition, self-tolerance, and general homeostasis [1]. In CRS, decreased levels of Tregs may lead to a chronic inflammatory state [112] and overall, their levels are decreased in peripheral blood of CRS patients. The quantities of Tregs are similar in CRSwNP and CRSsNP patients, but the tissue infiltration levels of Tregs are higher in CRSwNP compared to CRSsNP. In CRS, Tregs express more proinflammatory than regulatory capacities [113] and additionally in CRSwNP the migration potential of Tregs is limited [114].

2.3.3. B Cells

Activated B cells produce highly specialized immunoglobulins that bind antigens and play a crucial role in neutralization of many pathogenic factors. B cell levels are increased in the group of CRSwNP patients when compared to CRSsNP patients [115] and have an accelerated memory phenotype and are less mature or regulatory for Th lymphocytes [116]. Several factors are upregulated in CRS which have the potential to modulate B cell response pathways. The chemokines CXCL13 and CXCL12 are upregulated in CRS and lead to B cell recruitment [117]. IL-21, which is overexpressed in CRSwNP, activates B cell differentiation and leads to IgG and IgA secretion [118]. In CRSwNP, ILC2 triggers local B cell activation [119]. In the NP tissue, the close cooperation of B cells with MCs enhances local IgE production [77]. Additionally, in CRSwNP, activation of TLR9 leads to the release of type I interferon, ultimately increasing levels of B cell-activating factor [120]. The increased levels of B cell-activating factor in the serum positively correlate with blood eosinophil counts and percentages, tissue eosinophil counts, and total IgE in serum. Hereby, the levels of B cell-activating factor are significantly higher in patients with recurrent polyps, which might suggest its role in distinguishing CRSwNP endotypes and predicting postoperative recurrence [121].

3. Other Selected Aspects of CRS Pathogenesis

3.1. High Mobility Group Box (HMGB1) Protein and a Receptor for Advanced Glycation and Products (RAGE) Pathway in CRS

HMGB1 is an alarmin protein involved in many chronic inflammatory diseases and also plays a role in CRS pathogenesis. Tissue expression of HMGB1 and its receptor RAGE correlates with the disease course of CRSwNP. We have previously described that RAGE is more pronounced during disease development [122]. Similarly, we have also demonstrated that in the CRSsNP, HMGB1 expression in the tissue indicates no differences in comparison to healthy volunteers, meanwhile, RAGE is overexpressed, relates with disease activity and allergy [123]. Elevated levels of HMGB1 appear especially in eosinophilic CRSwNP [124]. Additionally, TLR4 is upregulated in CRSwNP tissue and is another HMGB1 receptor [125]. In CRSwNP, HMGB1 is overexpressed in the nucleus of epithelial cells, but decreased in cytoplasm [126], albeit hypoxic conditions regulate the functions of HMGB1 in the

upper airway, triggering its translocation. HMGB1 leads also to the production of reactive oxygen species (ROS) in AE cells and ROS derived from DUOX2 leads to increased IL-8 secretion [127]. Interestingly, elevated levels of ROS in the freshly wounded nasal epithelial cells and fibroblasts obtained from CRS individuals might be reduced by some antibiotics and trigger a decline in nasal fibroblast migratory capacity without affecting nasal epithelial cells [128]. Recently, studies demonstrated the role of HMGB1-RAGE signaling pathway in the process of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in the case of CRSwNP patients. Vetuschi et al. observed in CRSwNP tissues an upregulation of the AGE/RAGE/p-ERK pathway and also of the mesenchymal markers vimentin and IL-6, suggesting that their cooperation might be associated with tissue remodeling. However, the authors were not able to find any differences in the TGF β /Smad3 pathway between CRSwNP and normal controls [129]. Similarly, another study demonstrated that HMGB1 promotes upregulation of mesenchymal markers (vimentin, α -SMA) and diminished epithelial markers (occludin, ZO-1, E-cadherin) and hypoxia-induced HMGB1 release might lead to EMT through the RAGE pathway [130]. In accordance with the findings of Vetuschi et al., HMGB1-treated cells did not secrete TGF β on the apical and basal side, suggesting that EMT in CRSwNP might be TGF β independent. Increased levels of HMGB1 appeared in cytoplasm or extranuclear compartments and NPs fluid in comparison to control mucosa. Additionally, HMGB1 instilled to the mouse model, proved their EMT inducing capacity and also analysis of human NP tissue indicated increased levels of HMGB1 as well as mesenchymal markers, whereas epithelial markers were decreased [130]. HMGB1 induced myofibroblast differentiation and ECM production in nasal fibroblast [131]. In the case of eosinophilic CRSwNP, when cells were treated with rhHMGB1 (recombinant human HMGB1), the expression of vimentin and N-cadherin was increased and the expression of E-cadherin and ZO-1 were decreased, both in a concentration-dependent manner. Use of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) agonist resulted in a decrease in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated HMGB1 secretion and an EMT retraction [132].

3.2. Tissue Remodeling in CRS

An important mechanism involved in tissue remodeling is EMT, also presented in Figure 6.

During EMT, epithelial cells lose their functions and acquire the character of mesenchymal cells. Cells lose TJs, gain motility function, remodel cytoskeleton and ECM, and have altered gene and protein expression [133]. The TGF β pathway is among the best known factors involved in the process of EMT. In eosinophilic and non-eosinophilic CRSwNP, miR-182 regulated EMT in response to TGF β 1 and might promote nasal polypogenesis [134]. The role of TGF β 1 is significantly more pronounced in CRSsNP than in the case of CRSwNP. In CRSsNP, TGF β 1 activates heat shock protein 47 (HSP47) that is overexpressed in the nasal fibroblasts and it leads to myofibroblast differentiation as well as ECM production. TGF β 1 induces HSP47 expression via the Smad 2/3 pathway. Interestingly, glucocorticosteroids were able to decline effects of HSP47 induction by TGF β 1 [135]. Additionally, the TGF β /Smad 2/3 pathway leads to collagen and connective tissue growth factor (CTGF) production in fibroblasts obtained from CRSsNP mucosa [136]. The expression of relaxin-2, Smad2, Smad3 and TGF β 1 mRNA in the CRSsNP group was significantly higher than in the CRSwNP and control groups [137]. Moreover, miR-21 might be involved in EMT through the activation of the TGF β 1-mediated PTEN/Akt pathway [138].

Recently, it has been demonstrated that the cold-inducible RNA binding protein (CIRP) is upregulated in nasal epithelial cells from eosinophilic and non-eosinophilic CRS and macrophages. CIRP might contribute to edema formation through the capacity to stimulate metalloproteinase (MMP) and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) from nasal epithelial cells and macrophages [139]. Another study suggested the role of the PI3K/Akt/HIF-1 α pathway in the inflammation and tissue remodeling in CRS. Nasal epithelial cells stimulated with LPS release IL-25, IL-17RB, HIF-1 α and p-Akt. Levels of

IL-25, IL-17RB, HIF-1 α decrease after implementing the PI3K inhibitor [140]. Similarly, nasal fibroblasts obtained from CRS patients cultured in vitro, stimulated with LPS secrete TSLP in a TLR4-dependent manner and activate mitogen-activated protein kinase (MAPK), Akt, NF- κ B pathways. Additionally, use of ex vivo organ culture of nasal inferior turbinate model validated these results. Macrolides and corticosteroids were able to reduce expression of TSLP in the fibroblasts and downstream pathways [141]. The exposure of nasal fibroblasts on cigarette smoke exposure results in increased MMP-2 expression, inhibited tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression and induced ROS production [142].

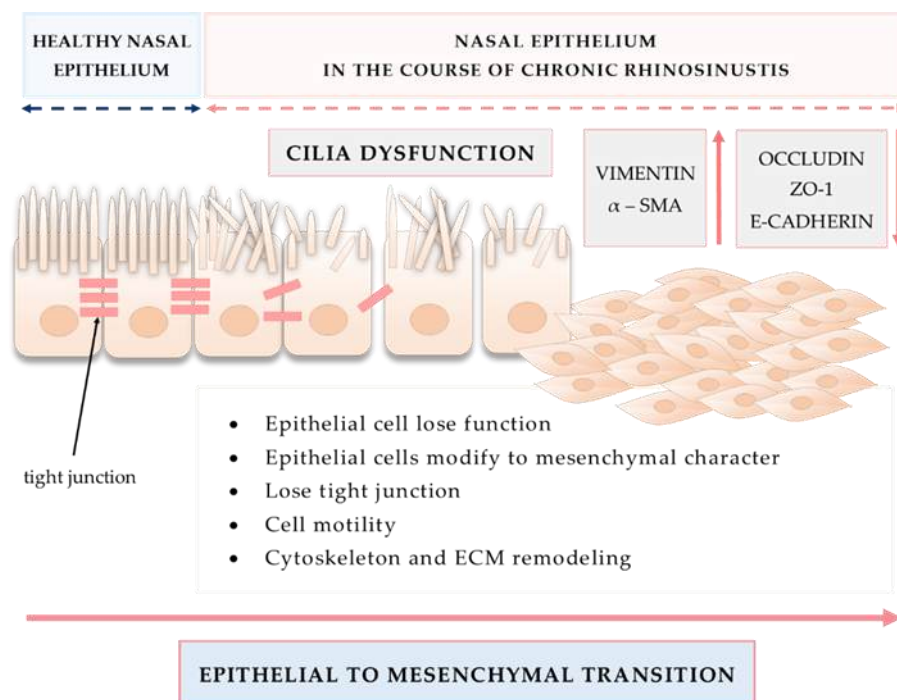


Figure 6. Epithelial to mesenchymal transition as an important mechanism involved in tissue remodeling in CRS.

Nasal fibroblasts play a crucial role in tissue remodeling. Nasal fibroblasts influenced by many factors secrete various signaling molecules and are able to differentiate into myofibroblasts. Hypoxic conditions trigger the differentiation of NP-derived fibroblasts into myofibroblasts in the manner dependent on ROS generated through the NOX4 (NADPH oxidase 4) and TGF β 1 [143]. Moreover, NOX1 and NOX4 are overexpressed in the mucosa of NPs in the case of allergic rhinitis at the mRNA and protein levels [144]. Other studies described elevated NADPH oxidase subunits on the NP tissue, suggesting their role and also oxidative stress involvement in CRSwNP pathogenesis [145]. NP tissue has additionally decreased stem cell potential in comparison to healthy tissue from the same CRS patients, which is evaluated through the differentiation of isolated mesenchymal cells into adipocytes and it may lead to abate epithelium regeneration [146].

3.3. Neuro-Inflammation as an Emerging New Aspect of Airway Inflammatory Diseases

Airway epithelium anatomically and functionally collaborates with the nervous system. Various inflammatory mediators and irritants that appear in the area of the airway might stimulate nerves, leading to neurogenic inflammation. On the other hand, inflammation may also be enhanced through the neurotransmitters secreted by neurons and neuropeptides released from immune cells and non-neural cells during the disease state. Additionally, activation of SCCs present in the nasal epithelium might be involved in the neurogenic inflammatory pathway. The role of neuro-immune regulation in inflammation

has been already the subject of research in airway inflammatory diseases, such as COPD and asthma [147–149].

It was also demonstrated that autonomic dysfunction symptoms significantly positively correlate with CRS severity, especially in a group of CRSwNP patients [150]. Histological examination showed abundant sympathetic fibers in the pedicle of NPs, but a lack of this innervation in the body and apex of the polyps, which can be important in the pathogenesis of NPs [151]. There is a hypothesis that the cholinergic system can be implicated in the inflammation of CRS, especially in CRSwNP [152]. It was observed that higher preoperative autonomic symptom scores corresponded to uncontrolled inflammation following functional endoscopic sinus surgery and symptoms of autonomic nervous system dysfunction improved following sinus surgery [153]. Chronic inflammation may also trigger neuron death mediated by c-Jun N-terminal kinases (JNK), leading to loss of olfaction, which is a common symptom in CRS [154].

3.4. Small Extracellular Vesicles (sEVs) as a New Promising Aim of Research in the Immunopathology of CRS

Small extracellular vesicles (sEVs) are extracellular vesicles of endosomal origin. sEVs circulate in presumably all body fluids including blood, plasma, nasal lavage fluid, and bronchoalveolar fluid and are important mediators of cell to cell communication. They transport complex cargo components, i.e., proteins, lipids, and nucleic acids and sEVs play a role in various physiological processes, but importantly have immunomodulatory functions and are able to shift the Th1-Th2 balance [155]. Proteomic analysis of sEVs isolated from nasal lavage fluid of CRSwNP reported significantly different content in comparison to controls and revealed potential disease biomarkers such as cystatin, peroxiredoxin-5, and glycoprotein VI [156] or in another study the protease inhibitor cystatin-2 [157]. Additionally, sEVs are enriched in pappalysin and serpins potentially involved in NP formation [158,159]. Thus, sEVs modulate a wide spectrum of functions and their presence in all body fluids is of great value to potential diagnostic and therapeutic solutions in CRS.

4. Summary

Sinusal AE forms a structural and functional barrier that modulates proper interaction of the host microenvironment, the microbiome, EFs, and the immune response. In the course of CRS, the epithelial barrier remains impaired. Bacteria, fungi, viruses, allergens, and air pollution stimulate the AE that secretes cytokines, leading to activation of IIS including ILCs, neutrophils, monocytes, basophils, eosinophils, NK cells, and DCs. The antigen presentation of DCs leads to the polarization of T lymphocytes which invoke AIR. An imbalance between the physiological microbiome in sinonasal cavity and those in the course of CRS might orchestrate inflammation [90]. Tissue remodeling is among the most relevant aspects of CRS pathogenesis. Changes in the sinusal AE mainly include dysfunctions in the cilia and TJs, fibrosis, GC hyperplasia and BMT, NP formation, angiogenesis, and osteitis [160,161]. Although various widely known agents contribute to CRS, the molecular bases of disease still remain elusive and need further investigation.

Author Contributions: Conceptualization, M.J.S., K.D. and N.L.; formal analysis, M.J.S., K.D. and N.L.; writing—original draft preparation, K.C., K.P., J.B., N.L. and K.D.; writing—review and editing, M.J.S. and N.L.; visualization, K.C. and K.P.; supervision, M.J.S.; project administration, K.D.; funding acquisition, K.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was partially financed by CMKP 501-1-019-56-22 to K.D.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AE	airway epithelium
AERD	aspirin exacerbated respiratory disease
AIR	adaptive immune response
BMT	basement membrane thickening
CIRP	cold-inducible RNA binding protein
CIS	complement immune system
CRS	chronic rhinosinusitis
CRSsNP	chronic rhinosinusitis without nasal polyps
CRSwNP	chronic rhinosinusitis with nasal polyps
CTGF	connective tissue growth factor
DCs	dendritic cells
DUOX	dual oxidase
ECM	extracellular matrix
EFs	environmental factors
EGR2	early growth response 2
EMT	epithelial to mesenchymal transition
GCs	goblet cells
HSP47	heat shock protein 47
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
HMGB1	high mobility group box 1 protein
IFN- γ	interferon- γ
IIS	innate immune system
IL	interleukin
ILCs	innate lymphoid cells
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCs	mast cells
miRNAs	microRNAs
MMP	metalloproteinase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- $\kappa\beta$	nuclear factor $\kappa\beta$
NKs	natural killer cells
NO	nitric oxide
NOX4	NADPH oxidase 4
NPs	nasal polyps
OX40L	OX40 ligand
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PCI	persistent chronic inflammation
PD-1	programmed cell death 1
PPAR- γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
RAGE	receptor for advanced glycation end products
rhHMGB1	recombinant human high mobility group box 1 protein
ROS	reactive oxygen species
SCCs	solitary chemosensory cells
sEVs	small extracellular vesicles
SM	sinus mucosa
T2R38	taste receptor 2 member 38
T2Rs	taste receptors
TGF β	transforming growth factor β
TIMP-2	tissue inhibitor of metalloproteinase-2
TJs	tight junctions
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	tumor necrosis factor α
Treg	T regulatory cell

TSLP	thymic stromal lymphopoietin
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
ZO-1	zonula occludens

References

- Fokkens, W.J.; Lund, V.J.; Hopkins, C.; Hellings, P.W.; Kern, R.; Reitsma, S.; Toppila-Salmi, S.; Bernal-Sprekelsen, M.; Mullol, J.; Alobid, I.; et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology* **2020**, *58*, 1–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Klingler, A.I.; Stevens, W.W.; Tan, B.K.; Peters, A.T.; Poposki, J.A.; Grammer, L.C.; Welch, K.C.; Smith, S.S.; Conley, D.B.; Kern, R.C.; et al. Mechanisms and biomarkers of inflammatory endotypes in chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, 1306–1317. [[CrossRef](#)]
- Kato, A.; Peters, A.T.; Stevens, W.W.; Schleimer, R.P.; Tan, B.K.; Kern, R.C. Endotypes of chronic rhinosinusitis: Relationships to disease phenotypes, pathogenesis, clinical findings, and treatment approaches. *Allergy* **2022**, *77*, 812–826. [[CrossRef](#)]
- Jiao, J.; Duan, S.; Meng, N.; Li, Y.; Fan, E.; Zhang, L. Role of IFN-gamma, IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* **2016**, *46*, 449–460. [[CrossRef](#)]
- Bae, C.H.; Na, H.G.; Choi, Y.S.; Song, S.Y.; Kim, Y.D. Clusterin Induces MUC5AC Expression via Activation of NF-kappaB in Human Airway Epithelial Cells. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2018**, *11*, 124–132. [[CrossRef](#)]
- Ito, T.; Ikeda, S.; Asamori, T.; Honda, K.; Kawashima, Y.; Kitamura, K.; Suzuki, K.; Tsutsumi, T. Increased expression of pendrin in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2019**, *85*, 760–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, Y.; Derycke, L.; Holtappels, G.; Wang, X.D.; Zhang, L.; Bachert, C.; Zhang, N. Th2 cytokines orchestrate the secretion of MUC5AC and MUC5B in IL-5-positive chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* **2019**, *74*, 131–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kato, K.; Chang, E.H.; Chen, Y.; Lu, W.; Kim, M.M.; Niihori, M.; Hecker, L.; Kim, K.C. MUC1 contributes to goblet cell metaplasia and MUC5AC expression in response to cigarette smoke in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *319*, L82–L90. [[CrossRef](#)]
- Ebenezer, J.A.; Christensen, J.M.; Oliver, B.G.; Oliver, R.A.; Tjin, G.; Ho, J.; Habib, A.R.; Rimmer, J.; Sacks, R.; Harvey, R.J. Periostin as a marker of mucosal remodelling in chronic rhinosinusitis. *Rhinology* **2017**, *55*, 234–241. [[CrossRef](#)]
- Du, K.; Wang, M.; Zhang, N.; Yu, P.; Wang, P.; Li, Y.; Wang, X.; Zhang, L.; Bachert, C. Involvement of the extracellular matrix proteins periostin and tenascin C in nasal polyp remodeling by regulating the expression of MMPs. *Clin. Transl. Allergy* **2021**, *11*, e12059. [[CrossRef](#)]
- Yan, B.; Lou, H.; Wang, Y.; Li, Y.; Meng, Y.; Qi, S.; Wang, M.; Xiao, L.; Wang, C.; Zhang, L. Epithelium-derived cystatin SN enhances eosinophil activation and infiltration through IL-5 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *144*, 455–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, D.; Yan, B.; Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, L. Prognostic and pharmacologic value of cystatin SN for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *148*, 450–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mueller, S.K.; Wendler, O.; Nocera, A.; Grundtner, P.; Schlegel, P.; Agaimy, A.; Iro, H.; Bleier, B.S. Escalation in mucus cystatin 2, pappalysin-A, and periostin levels over time predict need for recurrent surgery in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2019**, *9*, 1212–1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kao, S.S.; Bassiouni, A.; Ramezani, M.; Finnie, J.; Chegeni, N.; Colella, A.D.; Chataway, T.K.; Wormald, P.J.; Vreugde, S.; Psaltis, A.J. Proteomic analysis of nasal mucus samples of healthy patients and patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, 168–178. [[CrossRef](#)]
- Soler, Z.M.; Yoo, F.; Schlosser, R.J.; Mulligan, J.; Ramakrishnan, V.R.; Beswick, D.M.; Alt, J.A.; Mattos, J.L.; Payne, S.C.; Storck, K.A.; et al. Correlation of mucus inflammatory proteins and olfaction in chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2020**, *10*, 343–355. [[CrossRef](#)]
- Wise, S.K.; Laury, A.M.; Katz, E.H.; Den Beste, K.A.; Parkos, C.A.; Nusrat, A. Interleukin-4 and interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction protein expression. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2014**, *4*, 361–370. [[CrossRef](#)]
- Meng, J.; Zhou, P.; Liu, Y.; Liu, F.; Yi, X.; Liu, S.; Holtappels, G.; Bachert, C.; Zhang, N. The development of nasal polyp disease involves early nasal mucosal inflammation and remodelling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82373. [[CrossRef](#)]
- Soyka, M.B.; Wawrzyniak, P.; Eiwegger, T.; Holzmann, D.; Treis, A.; Wanke, K.; Kast, J.I.; Akdis, C.A. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: The regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *130*, 1087–1096. [[CrossRef](#)]
- Kaneko, Y.; Kohno, T.; Kakuki, T.; Takano, K.I.; Ogasawara, N.; Miyata, R.; Kikuchi, S.; Konno, T.; Ohkuni, T.; Yajima, R.; et al. The role of transcriptional factor p63 in regulation of epithelial barrier and ciliogenesis of human nasal epithelial cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10935. [[CrossRef](#)]
- Boscke, R.; Vladar, E.K.; Konnecke, M.; Husing, B.; Linke, R.; Pries, R.; Reiling, N.; Axelrod, J.D.; Nayak, J.V.; Wollenberg, B. Wnt Signaling in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2017**, *56*, 575–584. [[CrossRef](#)]
- Cho, D.Y.; Nayak, J.V.; Bravo, D.T.; Le, W.; Nguyen, A.; Edward, J.A.; Hwang, P.H.; Illek, B.; Fischer, H. Expression of dual oxidases and secreted cytokines in chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2013**, *3*, 376–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Kim, D.K.; Jin, H.R.; Eun, K.M.; Mo, J.H.; Cho, S.H.; Oh, S.; Cho, D.; Kim, D.W. The role of interleukin-33 in chronic rhinosinusitis. *Thorax* **2017**, *72*, 635–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Johnston, L.K.; Bryce, P.J. Understanding Interleukin 33 and Its Roles in Eosinophil Development. *Front. Med.* **2017**, *4*, 51. [[CrossRef](#)]
24. Shin, H.W.; Kim, D.K.; Park, M.H.; Eun, K.M.; Lee, M.; So, D.; Kong, I.G.; Mo, J.H.; Yang, M.S.; Jin, H.R.; et al. IL-25 as a novel therapeutic target in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *135*, 1476–1485.e1477. [[CrossRef](#)]
25. Park, S.K.; Jin, Y.D.; Park, Y.K.; Yeon, S.H.; Xu, J.; Han, R.N.; Rha, K.S.; Kim, Y.M. IL-25-induced activation of nasal fibroblast and its association with the remodeling of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Liao, B.; Cao, P.P.; Zeng, M.; Zhen, Z.; Wang, H.; Zhang, Y.N.; Hu, C.Y.; Ma, J.; Li, Z.Y.; Song, J.; et al. Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* **2015**, *70*, 1169–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Xu, X.; Luo, S.; Li, B.; Dai, H.; Zhang, J. IL-25 contributes to lung fibrosis by directly acting on alveolar epithelial cells and fibroblasts. *Exp. Biol. Med.* **2019**, *244*, 770–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Boita, M.; Bucca, C.; Riva, G.; Heffler, E.; Rolla, G. Release of Type 2 Cytokines by Epithelial Cells of Nasal Polyps. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 2643297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nagarkar, D.R.; Poposki, J.A.; Tan, B.K.; Comeau, M.R.; Peters, A.T.; Hulse, K.E.; Suh, L.A.; Norton, J.; Harris, K.E.; Grammer, L.C.; et al. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *132*, 593–600.e512. [[CrossRef](#)]
30. Soyka, M.B.; Holzmann, D.; Basinski, T.M.; Wawrzyniak, M.; Bannert, C.; Burgler, S.; Akkoc, T.; Treis, A.; Ruckert, B.; Akdis, M.; et al. The Induction of IL-33 in the Sinus Epithelium and Its Influence on T-Helper Cell Responses. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123163. [[CrossRef](#)]
31. Chiappara, G.; Sciarrino, S.; Di Sano, C.; Gallina, S.; Speciale, R.; Lorusso, F.; Di Vincenzo, S.; D’Anna, C.; Bruno, A.; Gjomarkaj, M.; et al. Notch-1 signaling activation sustains overexpression of interleukin 33 in the epithelium of nasal polyps. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 4582–4596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Poposki, J.A.; Klingler, A.I.; Tan, B.K.; Soroosh, P.; Banie, H.; Lewis, G.; Hulse, K.E.; Stevens, W.W.; Peters, A.T.; Grammer, L.C.; et al. Group 2 innate lymphoid cells are elevated and activated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Immun. Inflamm. Dis.* **2017**, *5*, 233–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wei, Y.; Ma, R.; Zhang, J.; Wu, X.; Yu, G.; Hu, X.; Li, J.; Liu, Z.; Ji, W.; Li, H.; et al. Excessive periostin expression and Th2 response in patients with nasal polyps: Association with asthma. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 6585–6597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kim, D.W.; Kulka, M.; Jo, A.; Eun, K.M.; Arizmendi, N.; Tancowny, B.P.; Hong, S.N.; Lee, J.P.; Jin, H.R.; Lockey, R.F.; et al. Cross-talk between human mast cells and epithelial cells by IgE-mediated periostin production in eosinophilic nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 1692–1695.e1696. [[CrossRef](#)]
35. Barham, H.P.; Cooper, S.E.; Anderson, C.B.; Tizzano, M.; Kingdom, T.T.; Finger, T.E.; Kinnamon, S.C.; Ramakrishnan, V.R. Solitary chemosensory cells and bitter taste receptor signaling in human sinonasal mucosa. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2013**, *3*, 450–457. [[CrossRef](#)]
36. Patel, N.N.; Kohanski, M.A.; Maina, I.W.; Triantafillou, V.; Workman, A.D.; Tong, C.C.L.; Kuan, E.C.; Bosso, J.V.; Adappa, N.D.; Palmer, J.N.; et al. Solitary chemosensory cells producing interleukin-25 and group-2 innate lymphoid cells are enriched in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2018**, *8*, 900–906. [[CrossRef](#)]
37. Kohanski, M.A.; Workman, A.D.; Patel, N.N.; Hung, L.Y.; Shtraks, J.P.; Chen, B.; Blasetti, M.; Doghramji, L.; Kennedy, D.W.; Adappa, N.D.; et al. Solitary chemosensory cells are a primary epithelial source of IL-25 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *142*, 460–469.e467. [[CrossRef](#)]
38. Lee, R.J.; Xiong, G.; Kofonow, J.M.; Chen, B.; Lysenko, A.; Jiang, P.; Abraham, V.; Doghramji, L.; Adappa, N.D.; Palmer, J.N.; et al. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 4145–4159. [[CrossRef](#)]
39. Triantafillou, V.; Workman, A.D.; Kohanski, M.A.; Cohen, N.A. Taste Receptor Polymorphisms and Immune Response: A Review of Receptor Genotypic-Phenotypic Variations and Their Relevance to Chronic Rhinosinusitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 64. [[CrossRef](#)]
40. Tran, H.T.T.; Herz, C.; Ruf, P.; Stetter, R.; Lamy, E. Human T2R38 Bitter Taste Receptor Expression in Resting and Activated Lymphocytes. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2949. [[CrossRef](#)]
41. Yan, C.H.; Hahn, S.; McMahon, D.; Bonislowski, D.; Kennedy, D.W.; Adappa, N.D.; Palmer, J.N.; Jiang, P.; Lee, R.J.; Cohen, N.A. Nitric oxide production is stimulated by bitter taste receptors ubiquitously expressed in the sinonasal cavity. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2017**, *31*, 85–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Grassin-Delyle, S.; Salvator, H.; Mantov, N.; Abrial, C.; Brollo, M.; Faisy, C.; Naline, E.; Couderc, L.J.; Devillier, P. Bitter Taste Receptors (TAS2Rs) in Human Lung Macrophages: Receptor Expression and Inhibitory Effects of TAS2R Agonists. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Parker, D.; Prince, A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *45*, 189–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 373–384. [[CrossRef](#)]
45. Vareille, M.; Kieninger, E.; Edwards, M.R.; Regamey, N. The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 210–229. [[CrossRef](#)]
46. Wang, X.; Zhao, C.; Ji, W.; Xu, Y.; Guo, H. Relationship of TLR2, TLR4 and tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 1199–1212.
47. Rai, G.; Das, S.; Ansari, M.A.; Singh, P.K.; Dar, S.A.; Haque, S.; Gupta, N.; Sharma, S.; Ramachandran, V.G.; Sharma, S.; et al. TLR-2 expression and dysregulated human Treg/Th17 phenotype in *Aspergillus flavus* infected patients of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Microb. Cell Factories* **2020**, *19*, 215. [[CrossRef](#)]
48. Sun, Y.; Zhou, B.; Wang, C.; Huang, Q.; Zhang, Q.; Han, Y.; Dai, W.; Fan, E.; Li, Y. Biofilm formation and Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, and NF-kappaB expression in sinus tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2012**, *26*, 104–109. [[CrossRef](#)]
49. Xiu, Q.; Kong, C.; Gao, Y.; Gao, Y.; Sha, J.; Cui, N.; Zhu, D. Hypoxia regulates IL-17A secretion from nasal polyp epithelial cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 102097–102109. [[CrossRef](#)]
50. Yu, Z.; Wang, Y.; Hu, X.; Xu, H.; Han, M.; Zhang, J.; Wen, W.; Shu, H.; Li, H. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Auris Nasus Larynx* **2020**, *47*, 401–409. [[CrossRef](#)]
51. Pahl, A.; Szelenyi, S.; Brune, K. Hypoxia induced chemokine expression in nasal epithelial cells: Development of an in vitro model for chronic rhinosinusitis. *ALTEX* **2006**, *23*, 59–63. [[PubMed](#)]
52. Yao, T.; Kojima, Y.; Koyanagi, A.; Yokoi, H.; Saito, T.; Kawano, K.; Furukawa, M.; Kusunoki, T.; Ikeda, K. Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope* **2009**, *119*, 1053–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kim, Y.J.; Cho, H.J.; Shin, W.C.; Song, H.A.; Yoon, J.H.; Kim, C.H. Hypoxia-mediated mechanism of MUC5AC production in human nasal epithelia and its implication in rhinosinusitis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lim, A.I.; Verrier, T.; Vosshenrich, C.A.; Di Santo, J.P. Developmental options and functional plasticity of innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2017**, *44*, 61–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*; 6e: Sae-E-Book; Elsevier: New Delhi, India, 2019.
56. Krabbendam, L.; Bal, S.M.; Spits, H.; Golebski, K. New insights into the function, development, and plasticity of type 2 innate lymphoid cells. *Immunol. Rev.* **2018**, *286*, 74–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Krohn, I.K.; Shikhagaie, M.M.; Golebski, K.; Bernink, J.H.; Breynaert, C.; Creyns, B.; Diamant, Z.; Fokkens, W.J.; Gevaert, P.; Hellings, P.; et al. Emerging roles of innate lymphoid cells in inflammatory diseases: Clinical implications. *Allergy* **2018**, *73*, 837–850. [[CrossRef](#)]
58. Shikhagaie, M.M.; Germar, K.; Bal, S.M.; Ros, X.R.; Spits, H. Innate lymphoid cells in autoimmunity: Emerging regulators in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 164–173. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, N.; Van Zele, T.; Perez-Novio, C.; Van Bruaene, N.; Holtappels, G.; DeRuyck, N.; Van Cauwenberge, P.; Bachert, C. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *122*, 961–968. [[CrossRef](#)]
60. Derycke, L.; Zhang, N.; Holtappels, G.; Dutre, T.; Bachert, C. IL-17A as a regulator of neutrophil survival in nasal polyp disease of patients with and without cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2012**, *11*, 193–200. [[CrossRef](#)]
61. Wang, H.; Li, Z.Y.; Jiang, W.X.; Liao, B.; Zhai, G.T.; Wang, N.; Zhen, Z.; Ruan, J.W.; Long, X.B.; Wang, H.; et al. The activation and function of IL-36gamma in neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 1646–1658. [[CrossRef](#)]
62. Pothoven, K.L.; Norton, J.E.; Suh, L.A.; Carter, R.G.; Harris, K.E.; Biyasheva, A.; Welch, K.; Shintani-Smith, S.; Conley, D.B.; Liu, M.C.; et al. Neutrophils are a major source of the epithelial barrier disrupting cytokine oncostatin M in patients with mucosal airways disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 1966–1978.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Carsuzaa, F.; Bequignon, E.; Binaud, M.; Jegou, J.F.; Dufour, X.; Lecron, J.C.; Favot, L. Oncostatin M Counteracts the Fibrotic Effects of TGF-beta1 and IL-4 on Nasal-Polyp-Derived Fibroblasts: A Control of Fibrosis in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Yu, S.; Cao, C.; Li, Q.; Wen, X.; Guo, X.; Bao, Q.; Zhou, Y.; Li, L.; Ye, X.; Li, T.; et al. Local IL-17 positive T cells are functionally associated with neutrophil infiltration and their development is regulated by mucosal microenvironment in nasal polyps. *Inflamm. Res.* **2021**, *70*, 139–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hwang, J.W.; Kim, J.H.; Kim, H.J.; Choi, I.H.; Han, H.M.; Lee, K.J.; Kim, T.H.; Lee, S.H. Neutrophil extracellular traps in nasal secretions of patients with stable and exacerbated chronic rhinosinusitis and their contribution to induce chemokine secretion and strengthen the epithelial barrier. *Clin. Exp. Allergy* **2019**, *49*, 1306–1320. [[CrossRef](#)]
66. Cao, Y.; Chen, F.; Sun, Y.; Hong, H.; Wen, Y.; Lai, Y.; Xu, Z.; Luo, X.; Chen, Y.; Shi, J.; et al. LL-37 promotes neutrophil extracellular trap formation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* **2019**, *49*, 990–999. [[CrossRef](#)]

67. Takabayashi, T.; Kato, A.; Peters, A.T.; Hulse, K.E.; Suh, L.A.; Carter, R.; Norton, J.; Grammer, L.C.; Cho, S.H.; Tan, B.K.; et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *187*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Peric, A.; Baletic, N.; Sotirovic, J.; Spadijer-Mirkovic, C. Macrophage inflammatory protein-1 production and eosinophil infiltration in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2015**, *124*, 266–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Kaczmarek, M.; Banaszewski, J.; Leszczynska, M.; Lagiedo-Zelazowska, M.; Nowicka, A.; Romanska, A.; Wierzbicka, M.; Dworacki, G. High frequency of macrophages expressing elevated level of CD80, PD-Ls and TLR1 in nasal polyps of CRS patients. *Immunobiology* **2019**, *224*, 154–162. [[CrossRef](#)]
70. Ryu, G.; Bae, J.S.; Kim, J.H.; Kim, E.H.; Lyu, L.; Chung, Y.J.; Mo, J.H. Role of IL-17A in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyp. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2020**, *12*, 507–522. [[CrossRef](#)]
71. Voehringer, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 362–375. [[CrossRef](#)]
72. Stevens, W.W.; Staudacher, A.G.; Hulse, K.E.; Poposki, J.A.; Kato, A.; Carter, R.G.; Suh, L.A.; Norton, J.E.; Huang, J.H.; Peters, A.T.; et al. Studies of the role of basophils in aspirin-exacerbated respiratory disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *148*, 439–449.e435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Pawankar, R.; Lee, K.H.; Nonaka, M.; Takizawa, R. Role of mast cells and basophils in chronic rhinosinusitis. *Clin. Allergy Immunol.* **2007**, *20*, 93–101. [[PubMed](#)]
74. Takabayashi, T.; Kato, A.; Peters, A.T.; Suh, L.A.; Carter, R.; Norton, J.; Grammer, L.C.; Tan, B.K.; Chandra, R.K.; Conley, D.B.; et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *130*, 410–420.e415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Piliponsky, A.M.; Romani, L. The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity. *Immunol. Rev.* **2018**, *282*, 188–197. [[CrossRef](#)]
76. Zhai, G.T.; Li, J.X.; Zhang, X.H.; Liao, B.; Lu, X.; Liu, Z. Increased accumulation of CD30 ligand-positive mast cells associates with eosinophilic inflammation in nasal polyps. *Laryngoscope* **2019**, *129*, E110–E117. [[CrossRef](#)]
77. Zhai, G.T.; Wang, H.; Li, J.X.; Cao, P.P.; Jiang, W.X.; Song, J.; Yao, Y.; Wang, Z.C.; Wang, Z.Z.; Wang, M.C.; et al. IgD-activated mast cells induce IgE synthesis in B cells in nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *142*, 1489–1499.e1423. [[CrossRef](#)]
78. Cao, P.P.; Zhang, Y.N.; Liao, B.; Ma, J.; Wang, B.F.; Wang, H.; Zeng, M.; Liu, W.H.; Schleimer, R.P.; Liu, Z. Increased local IgE production induced by common aeroallergens and phenotypic alteration of mast cells in Chinese eosinophilic, but not non-eosinophilic, chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* **2014**, *44*, 690–700. [[CrossRef](#)]
79. Cahill, K.N.; Laidlaw, T.M. Pathogenesis of Aspirin-Induced Reactions in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2016**, *36*, 681–691. [[CrossRef](#)]
80. Borish, L. Aspirin-exacerbated Respiratory Disease: A Syndrome of Mast Cell-mediated Pgd2 Overproduction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *200*, 651–652. [[CrossRef](#)]
81. Lou, H.; Zhang, N.; Bachert, C.; Zhang, L. Highlights of eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps in definition, prognosis, and advancement. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2018**, *8*, 1218–1225. [[CrossRef](#)]
82. Soler, Z.M.; Sauer, D.; Mace, J.; Smith, T.L. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2010**, *142*, 64–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Vlaminck, S.; Vauterin, T.; Hellings, P.W.; Jorissen, M.; Acke, F.; Van Cauwenberge, P.; Bachert, C.; Gevaert, P. The importance of local eosinophilia in the surgical outcome of chronic rhinosinusitis: A 3-year prospective observational study. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2014**, *28*, 260–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Donnell, N.J.; Marino, M.J.; Zarka, M.A.; Lal, D. Histopathological characteristics of surgical tissue from primary vs recurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyposis patients. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* **2020**, *5*, 5–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Feng, T.; Li, T.; Cao, W.; Xu, J.; Guo, Y.; Ren, N.; Liu, D.; Zhou, P.; Liu, B.; Bao, X.; et al. Peripheral blood eosinophil levels in chronic rhinosinusitis and its predictive value in eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Acta Otolaryngol.* **2021**, *141*, 386–391. [[CrossRef](#)]
86. Kowalski, M.L.; Lewandowska-Polak, A.; Wozniak, J.; Ptasińska, A.; Jankowski, A.; Wagrowska-Danilewicz, M.; Danilewicz, M.; Pawliczak, R. Association of stem cell factor expression in nasal polyp epithelial cells with aspirin sensitivity and asthma. *Allergy* **2005**, *60*, 631–637. [[CrossRef](#)]
87. Van Zele, T.; Coppieters, F.; Gevaert, P.; Holtappels, G.; Van Cauwenberge, P.; Bachert, C. Local complement activation in nasal polyposis. *Laryngoscope* **2009**, *119*, 1753–1758. [[CrossRef](#)]
88. Smith, S.E.; Schlosser, R.J.; Yawn, J.R.; Mattos, J.L.; Soler, Z.M.; Mulligan, J.K. Sinonasal T-cell expression of cytotoxic mediators granzyme B and perforin is reduced in patients with chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2017**, *31*, 352–356. [[CrossRef](#)]
89. Zhang, X.H.; Zhang, Y.N.; Li, H.B.; Hu, C.Y.; Wang, N.; Cao, P.P.; Liao, B.; Lu, X.; Cui, Y.H.; Liu, Z. Overexpression of miR-125b, a novel regulator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *185*, 140–151. [[CrossRef](#)]
90. Bachert, C.; Gevaert, P.; Holtappels, G.; Johansson, S.G.; van Cauwenberge, P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *107*, 607–614. [[CrossRef](#)]
91. Esnault, S.; Kelly, E.A.; Johansson, M.W.; Liu, L.Y.; Han, S.T.; Akhtar, M.; Sandbo, N.; Mosher, D.F.; Denlinger, L.C.; Mathur, S.K.; et al. Semaphorin 7A is expressed on airway eosinophils and upregulated by IL-5 family cytokines. *Clin. Immunol.* **2014**, *150*, 90–100. [[CrossRef](#)]




92. Miechowski, W.; Czerwaty, K.; Godlewska, I.; Dzaman, K. Atopy as a specific predictor of response to systemic and local steroid therapy in patients with chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *Otolaryngol. Polska* **2022**, *76*, 26–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kim, J.H.; Kim, G.E.; Cho, G.S.; Kwon, H.J.; Joo, C.H.; Kim, H.S.; Jang, Y.J. Natural killer cells from patients with chronic rhinosinusitis have impaired effector functions. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Lin, X.; Zhuang, X.; Li, C.; Wang, X. Interactions between dendritic cells and T lymphocytes in pathogenesis of nasal polyps. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 5167–5172. [[CrossRef](#)]
95. Kortekaas Krohn, I.; Bobic, S.; Dooley, J.; Lan, F.; Zhang, N.; Bachert, C.; Steelant, B.; Bullens, D.M.; Liston, A.; Ceuppens, J.L.; et al. Programmed cell death-1 expression correlates with disease severity and IL-5 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* **2017**, *72*, 985–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Liu, C.C.; Zhang, H.L.; Zhi, L.L.; Jin, P.; Zhao, L.; Li, T.; Zhou, X.M.; Sun, D.S.; Cheng, G.H.; Xin, Q.; et al. CDK5 Regulates PD-L1 Expression and Cell Maturation in Dendritic Cells of CRSwNP. *Inflammation* **2019**, *42*, 135–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Shi, L.L.; Song, J.; Xiong, P.; Cao, P.P.; Liao, B.; Ma, J.; Zhang, Y.N.; Zeng, M.; Liu, Y.; Wang, H.; et al. Disease-specific T-helper cell polarizing function of lesional dendritic cells in different types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *190*, 628–638. [[CrossRef](#)]
98. Ma, Z.; Shen, Y.; Zeng, Q.; Liu, J.; Yang, L.; Fu, R.; Hu, G. MiR-150-5p regulates EGR2 to promote the development of chronic rhinosinusitis via the DC-Th axis. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *54*, 188–197. [[CrossRef](#)]
99. Commins, S.P.; Borish, L.; Steinke, J.W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S53–S72. [[CrossRef](#)]
100. Sallusto, F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34*, 317–334. [[CrossRef](#)]
101. O’Shea, J.J.; Paul, W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* **2010**, *327*, 1098–1102. [[CrossRef](#)]
102. Henry, E.K.; Inclan-Rico, J.M.; Siracusa, M.C. Type 2 cytokine responses: Regulating immunity to helminth parasites and allergic inflammation. *Curr. Pharmacol. Rep.* **2017**, *3*, 346–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Derycke, L.; Eyerich, S.; Van Crombruggen, K.; Perez-Novo, C.; Holtappels, G.; Deruyck, N.; Gevaert, P.; Bachert, C. Mixed T helper cell signatures in chronic rhinosinusitis with and without polyps. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wang, X.; Zhang, N.; Bo, M.; Holtappels, G.; Zheng, M.; Lou, H.; Wang, H.; Zhang, L.; Bachert, C. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 1344–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Tan, B.K.; Klingler, A.I.; Poposki, J.A.; Stevens, W.W.; Peters, A.T.; Suh, L.A.; Norton, J.; Carter, R.G.; Hulse, K.E.; Harris, K.E.; et al. Heterogeneous inflammatory patterns in chronic rhinosinusitis without nasal polyps in Chicago, Illinois. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 699–703.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Biggs, T.C.; Hayes, S.M.; Harries, P.G.; Allan, R.N.; Walls, A.F.; Pender, S.L.F.; Salib, R.J. Immunological profiling of key inflammatory drivers of nasal polyp formation and growth in chronic rhinosinusitis. *Rhinology* **2019**, *57*, 336–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Ickrath, P.; Kleinsasser, N.; Ding, X.; Ginzkey, C.; Beyersdorf, N.; Hagen, R.; Kerkau, T.; Hackenberg, S. Characterization of T-cell subpopulations in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy Rhinol.* **2017**, *8*, 139–147. [[CrossRef](#)]
108. Ickrath, P.; Scherzad, A.; Kleinsasser, N.; Ginzkey, C.; Hagen, R.; Hackenberg, S. Influence of nasal polyp tissue on the differentiation and activation of T lymphocytes in a co-culture system. *Biomed. Rep.* **2019**, *10*, 119–126. [[CrossRef](#)]
109. Ma, J.; Shi, L.L.; Deng, Y.K.; Wang, H.; Cao, P.P.; Long, X.B.; Zhang, X.H.; Liu, Y.; Zeng, M.; Liu, Z. CD8(+) T cells with distinct cytokine-producing features and low cytotoxic activity in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* **2016**, *46*, 1162–1175. [[CrossRef](#)]
110. Workman, A.D.; Kohanski, M.A.; Cohen, N.A. Biomarkers in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2018**, *38*, 679–692. [[CrossRef](#)]
111. Kim, D.W.; Eun, K.M.; Roh, E.Y.; Shin, S.; Kim, D.K. Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps in Asian Patients Shows Mixed Inflammatory Patterns and Neutrophil-Related Disease Severity. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 7138643. [[CrossRef](#)]
112. Palmer, C.; Mulligan, J.K.; Smith, S.E.; Atkinson, C. The role of regulatory T cells in the regulation of upper airway inflammation. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2017**, *31*, 345–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Sharma, S.; Watanabe, S.; Sivam, A.; Wang, J.; Neuwirth, S.J.; Perez, R.I.; De Tineo, M.; Baroody, F.M.; Naclerio, R.M.; Pinto, J.M. Peripheral blood and tissue T regulatory cells in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2012**, *26*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Kim, Y.M.; Munoz, A.; Hwang, P.H.; Nadeau, K.C. Migration of regulatory T cells toward airway epithelial cells is impaired in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Clin. Immunol.* **2010**, *137*, 111–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Miljkovic, D.; Psaltis, A.; Wormald, P.J.; Vreugde, S. Naive and effector B-cell subtypes are increased in chronic rhinosinusitis with polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2018**, *32*, 3–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Ickrath, P.; Kleinsasser, N.; Ding, X.; Ginzkey, C.; Beyersdorf, N.; Kerkau, T.; Hagen, R.; Hackenberg, S. Impact and Modulations of Peripheral and Edaphic B Cell Subpopulations in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyposis. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2018**, *11*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Patadia, M.; Dixon, J.; Conley, D.; Chandra, R.; Peters, A.; Suh, L.A.; Kato, A.; Carter, R.; Harris, K.; Grammer, L.; et al. Evaluation of the presence of B-cell attractant chemokines in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2010**, *24*, 11–16. [[CrossRef](#)]

118. Xiao, L.; Wei, Y.; Zhang, Y.N.; Luo, X.; Yang, B.Y.; Yu, S.F.; Wu, X.M.; Wu, C.Y.; Li, H.B. Increased IL-21 expression in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* **2015**, *45*, 404–413. [[CrossRef](#)]
119. Feldman, S.; Kasjanski, R.; Poposki, J.; Hernandez, D.; Chen, J.N.; Norton, J.E.; Suh, L.; Carter, R.G.; Stevens, W.W.; Peters, A.T.; et al. Chronic airway inflammation provides a unique environment for B cell activation and antibody production. *Clin. Exp. Allergy* **2017**, *47*, 457–466. [[CrossRef](#)]
120. Xu, J.; Lee, J.W.; Park, S.K.; Lee, S.B.; Yoon, Y.H.; Yeon, S.H.; Rha, K.S.; Choi, J.A.; Song, C.H.; Kim, Y.M. Toll-like receptor 9 ligands increase type I interferon induced B-cell activating factor expression in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Clin. Immunol.* **2018**, *197*, 19–26. [[CrossRef](#)]
121. Wang, G.; Li, M.; Zheng, J.; Zhan, J.; Zheng, H.; Li, R.; Wei, X. Circulating BAFF as novel biomarker in distinguishing chronic rhinosinusitis with nasal polyps endotypes and predicting postoperative recurrence. *Int. Immunopharmacol.* **2022**, *104*, 108515. [[CrossRef](#)]
122. Dzaman, K.; Szczepanski, M.J.; Molinska-Glura, M.; Krzeski, A.; Zagor, M. Expression of the receptor for advanced glycation end products, a target for high mobility group box 1 protein, and its role in chronic recalcitrant rhinosinusitis with nasal polyps. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2015**, *63*, 223–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Dzaman, K.; Zagor, M.; Molinska-Glura, M.; Krzeski, A. High motility group box 1 (HMGB1) protein and its receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression in chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2015**, *53*, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Chen, D.; Mao, M.; Bellussi, L.M.; Passali, D.; Chen, L. Increase of high mobility group box chromosomal protein 1 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2014**, *4*, 453–462. [[CrossRef](#)]
125. Taziki, M.H.; Azarhoush, R.; Taziki, M.M.; Naghavi-Alhosseini, M.; Javid, N.; Davoodi, H. Correlation Between HMGB1 and TLR4 Expression in Sinonasal Mucosa in Patients With Chronic Rhinosinusitis. *Ear Nose Throat J.* **2019**, *98*, 599–605. [[CrossRef](#)]
126. Bellussi, L.M.; Chen, L.; Chen, D.; Passali, F.M.; Passali, D. The role of High Mobility Group Box 1 chromosomal protein in the pathogenesis of chronic sinusitis and nasal polyposis. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* **2012**, *32*, 386–392. [[PubMed](#)]
127. Min, H.J.; Kim, J.H.; Yoo, J.E.; Oh, J.H.; Kim, K.S.; Yoon, J.H.; Kim, C.H. ROS-dependent HMGB1 secretion upregulates IL-8 in upper airway epithelial cells under hypoxic condition. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Gouzos, M.; Ramezanzpour, M.; Bassiouni, A.; Psaltis, A.J.; Wormald, P.J.; Vreugde, S. Antibiotics Affect ROS Production and Fibroblast Migration in an In-vitro Model of Sinonasal Wound Healing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 110. [[CrossRef](#)]
129. Vetusch, A.; Pompili, S.; Di Marco, G.P.; Calvaruso, F.; Iacomino, E.; Angelosante, L.; Festuccia, C.; Colapietro, A.; Sferri, R. Can the AGE/RAGE/ERK signalling pathway and the epithelial-to-mesenchymal transition interact in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps? *Eur. J. Histochem.* **2020**, *64*, 3079. [[CrossRef](#)]
130. Min, H.J.; Choe, J.W.; Kim, K.S.; Yoon, J.H.; Kim, C.H. High-mobility group box 1 protein induces epithelial-mesenchymal transition in upper airway epithelial cells. *Rhinology* **2020**, *58*, 495–505. [[CrossRef](#)]
131. Lee, S.H.; Cho, J.H.; Park, J.H.; Cho, J.S.; Lee, H.M. High Mobility Group Box Chromosomal Protein-1 Induces Myofibroblast Differentiation and Extracellular Matrix Production via RAGE, p38, JNK and AP-1 Signaling Pathways in Nasal Fibroblasts. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2021**, *35*, 774–780. [[CrossRef](#)]
132. Yang, P.; Chen, S.; Zhong, G.; Kong, W.; Wang, Y. Agonist of PPAR-gamma Reduced Epithelial-Mesenchymal Transition in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps via Inhibition of High Mobility Group Box1. *Int. J. Med. Sci.* **2019**, *16*, 1631–1641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Jiang, W.; Zhou, C.; Ma, C.; Cao, Y.; Hu, G.; Li, H. TGF-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in chronic rhinosinusitis with nasal polyps through microRNA-182. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2021**, *39*, 16–47. [[CrossRef](#)]
135. Kim, H.J.; Park, J.H.; Shin, J.M.; Yang, H.W.; Lee, H.M.; Park, I.H. TGF-beta1-induced HSP47 regulates extracellular matrix accumulation via Smad2/3 signaling pathways in nasal fibroblasts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Shieh, J.M.; Tsai, Y.J.; Chi, J.C.; Wu, W.B. TGFbeta mediates collagen production in human CRSsNP nasal mucosa-derived fibroblasts through Smad2/3-dependent pathway and CTGF induction and secretion. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 10489–10499. [[CrossRef](#)]
137. Li, Y.; Tan, G.; Liu, J.; Ke, X.; Shen, Y.; Huang, J.; Hu, G.; Xiang, T.; Yang, Y. The Role of Relaxin-2 in Tissue Remodeling of Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2019**, *33*, 490–499. [[CrossRef](#)]
138. Li, X.; Li, C.; Zhu, G.; Yuan, W.; Xiao, Z.A. TGF-beta1 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition of Chronic Sinusitis with Nasal Polyps through MicroRNA-21. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2019**, *179*, 304–319. [[CrossRef](#)]
139. Shi, L.L.; Ma, J.; Deng, Y.K.; Chen, C.L.; Wang, H.; Cao, P.P.; Long, X.B.; Zeng, M.; Liu, Z. Cold-inducible RNA-binding protein contributes to tissue remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy* **2021**, *76*, 497–509. [[CrossRef](#)]
140. He, F.; Liu, H.; Luo, W. The PI3K-Akt-HIF-1alpha Pathway Reducing Nasal Airway Inflammation and Remodeling in Nasal Polyposis. *Ear Nose Throat J.* **2021**, *100*, NP43–NP49. [[CrossRef](#)]
141. Kang, J.H.; Yang, H.W.; Park, J.H.; Shin, J.M.; Kim, T.H.; Lee, S.H.; Lee, H.M.; Park, I.H. Lipopolysaccharide regulates thymic stromal lymphopoietin expression via TLR4/MAPK/Akt/NF-kappaB-signaling pathways in nasal fibroblasts: Differential inhibitory effects of macrolide and corticosteroid. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2021**, *11*, 144–152. [[CrossRef](#)]

142. Park, J.H.; Shin, J.M.; Yang, H.W.; Kim, T.H.; Lee, S.H.; Lee, H.M.; Cho, J.G.; Park, I.H. Cigarette Smoke Extract Stimulates MMP-2 Production in Nasal Fibroblasts via ROS/PI3K, Akt, and NF-kappaB Signaling Pathways. *Antioxidants* **2020**, *9*, 739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Moon, Y.M.; Kang, H.J.; Cho, J.S.; Park, I.H.; Lee, H.M. Nox4 mediates hypoxia-stimulated myofibroblast differentiation in nasal polyp-derived fibroblasts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2012**, *159*, 399–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Moon, J.H.; Kim, T.H.; Lee, H.M.; Lee, S.H.; Choe, W.; Kim, H.K.; Lee, J.H.; Oh, K.H.; Lee, S.H. Overexpression of the superoxide anion and NADPH oxidase isoforms 1 and 4 (NOX1 and NOX4) in allergic nasal mucosa. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2009**, *23*, 370–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Zheng, K.; Hao, J.; Xiao, L.; Wang, M.; Zhao, Y.; Fan, D.; Li, Y.; Wang, X.; Zhang, L. Expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2020**, *10*, 646–655. [[CrossRef](#)]
146. Chiarella, E.; Lombardo, N.; Lobello, N.; Piazzetta, G.L.; Morrone, H.L.; Mesuraca, M.; Bond, H.M. Deficit in Adipose Differentiation in Mesenchymal Stem Cells Derived from Chronic Rhinosinusitis Nasal Polyps Compared to Nasal Mucosal Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9214. [[CrossRef](#)]
147. Zhang, N.; Xu, J.; Jiang, C.; Lu, S. Neuro-Immune Regulation in Inflammation and Airway Remodeling of Allergic Asthma. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 894047. [[CrossRef](#)]
148. Barnes, P.J. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir. Physiol.* **2001**, *125*, 145–154. [[CrossRef](#)]
149. Saunders, C.J.; Christensen, M.; Finger, T.E.; Tizzano, M. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6075–6080. [[CrossRef](#)]
150. Chen, W.C.; Chang, Y.T.; Chen, S.F.; Lin, W.C.; Su, Y.Y.; Luo, S.D. The symptom burden of autonomic dysfunction is positively associated with chronic rhinosinusitis status. *Rhinology* **2018**, *56*, 227–233. [[CrossRef](#)]
151. Lin, J.K.; Wang, H.W.; Su, W.Y. Noradrenergic innervation of nasal polyps and polypoid mucosae. *Auris Nasus Larynx* **1996**, *23*, 121–126. [[CrossRef](#)]
152. Cerejeira, R.; Fernandes, S.; Pinto Moura, C. Increased expression of alpha7nAChR in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* **2016**, *43*, 176–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Chen, W.C.; Lin, W.C.; Yang, C.H.; Wu, C.N.; Luo, S.D. Autonomic dysfunction as an independent risk factor for uncontrolled inflammation in chronic rhinosinusitis following functional endoscopic sinus surgery. *Rhinology* **2019**, *58*, 200–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Victores, A.J.; Chen, M.; Smith, A.; Lane, A.P. Olfactory loss in chronic rhinosinusitis is associated with neuronal activation of c-Jun N-terminal kinase. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2018**, *8*, 415–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Zhu, X.; Wang, X.; Wang, Y.; Zhao, Y. Exosomal long non-coding RNA GAS5 suppresses Th1 differentiation and promotes Th2 differentiation via downregulating EZH2 and T-bet in allergic rhinitis. *Mol. Immunol.* **2020**, *118*, 30–39. [[CrossRef](#)]
156. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Dillon, S.T.; Gu, X.; Wendler, O.; Otu, H.H.; Libermann, T.A.; Bleier, B.S. Noninvasive exosomal proteomic biosignatures, including cystatin SN, peroxiredoxin-5, and glycoprotein VI, accurately predict chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2019**, *9*, 177–186. [[CrossRef](#)]
157. Miyake, M.M.; Workman, A.D.; Nocera, A.L.; Wu, D.; Mueller, S.K.; Finn, K.; Amiji, M.M.; Bleier, B.S. Discriminant analysis followed by unsupervised cluster analysis including exosomal cystatins predict presence of chronic rhinosinusitis, phenotype, and disease severity. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2019**, *9*, 1069–1076. [[CrossRef](#)]
158. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Workman, A.; Libermann, T.; Dillon, S.T.; Stegmann, A.; Wurm, J.; Iro, H.; Wendler, O.; Bleier, B.S. Significant polyomic and functional upregulation of the PAPP-A/IGFBP-4/5/IGF-1 axis in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2020**, *10*, 546–555. [[CrossRef](#)]
159. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Dillon, S.T.; Libermann, T.A.; Wendler, O.; Bleier, B.S. Tissue and Exosomal Serine Protease Inhibitors Are Significantly Overexpressed in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2019**, *33*, 359–368. [[CrossRef](#)]
160. Barham, H.P.; Osborn, J.L.; Snidvongs, K.; Mrad, N.; Sacks, R.; Harvey, R.J. Remodeling changes of the upper airway with chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 565–572. [[CrossRef](#)]
161. Stevens, W.W.; Lee, R.J.; Schleimer, R.P.; Cohen, N.A. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*, 1442–1453. [[CrossRef](#)]

Review

The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases

Katarzyna Piszczatowska ¹, Katarzyna Czerwaty ², Anna M. Cyran ³, Mathias Fiedler ⁴, Nils Ludwig ⁴, Jacek Brzost ⁵ and Mirosław J. Szczepański ^{1,2,*}

¹ Department of Biochemistry, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland; kpiszczatowska@wum.edu.pl

² Department of Otolaryngology, The Medical Centre of Postgraduate Education, 01-813 Warsaw, Poland; katarzynaczerwaty@gmail.com

³ Department of Pathology and Laboratory Medicine, Brown University, Providence, RI 02912, USA; anna_cyran@brown.edu

⁴ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; mathias1.fiedler@stud.uni-regensburg.de (M.F.); nils.ludwig@klinik.uni-regensburg.de (N.L.)

⁵ The Children's Memorial Health Institute, 04-730 Warsaw, Poland; jbrzost@vp.pl

* Correspondence: mszczepanski@wum.edu.pl

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are produced and released by all cells and are present in all body fluids. They exist in a variety of sizes, however, small extracellular vesicles (sEVs), the EV subset with a size range from 30 to 150 nm, are of current interest. By transporting a complex cargo that includes genetic material, proteins, lipids, and signaling molecules, sEVs can alter the state of recipient cells. The role of sEVs in mediating inflammatory processes and responses of the immune system is well-documented, and adds another layer of complexity to our understanding of frequent diseases, including chronic rhinosinusitis (CRS), asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and upper airway infections. In these diseases, two aspects of sEV biology are of particular interest: (1) sEVs might be involved in the etiopathogenesis of inflammatory airway diseases, and might emerge as attractive therapeutic targets, and (2) sEVs might be of diagnostic or prognostic relevance. The purpose of this review is to outline the biological functions of sEVs and their capacity to both augment and attenuate inflammation and immune response in the context of pathogen invasion, CRS, asthma, and COPD.

Keywords: small extracellular vesicles; exosomes; inflammatory airway diseases; chronic rhinosinusitis; otitis media; lung diseases; bronchial diseases; inflammation



Citation: Piszczatowska, K.; Czerwaty, K.; Cyran, A.M.; Fiedler, M.; Ludwig, N.; Brzost, J.; Szczepański, M.J. The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases. *Diagnostics* **2021**, *11*, 222. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020222>

Academic Editor: Rita Zamarchi

Received: 19 December 2020

Accepted: 29 January 2021

Published: 2 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are produced and released by all cells and are present in all body fluids. They exist in a variety of sizes, but of particular interest are small extracellular vesicles (sEVs), which range in size from 30 to 150 nm [1–3]. They originate from the endocytic compartment of the producer cell, and, because of their endosomal origin, sEVs are distinct from larger EVs, such as microvesicles (MVs), which are formed by “pinching off” the cellular membrane or from apoptotic bodies. Despite extensive research on EVs, their nomenclature is not fully established, leading to possible overlaps among various EV subtypes. According to the newest guidelines of the International Society for Extracellular Vesicles [4], we decided to use the term sEVs in this review for vesicles that are often also referred to as exosomes in the literature. A growing body of evidence indicates that sEVs play a major role in intercellular communication in physiological as well as in pathological conditions [5–7]. While the initially suspected role of sEVs was in eliminating cellular waste products [8], the growing interest in sEVs has led to an active international research community as well as improved isolation methods [9] that continuously broaden our understanding of sEV biogenesis, structure, and functions (Figure 1).

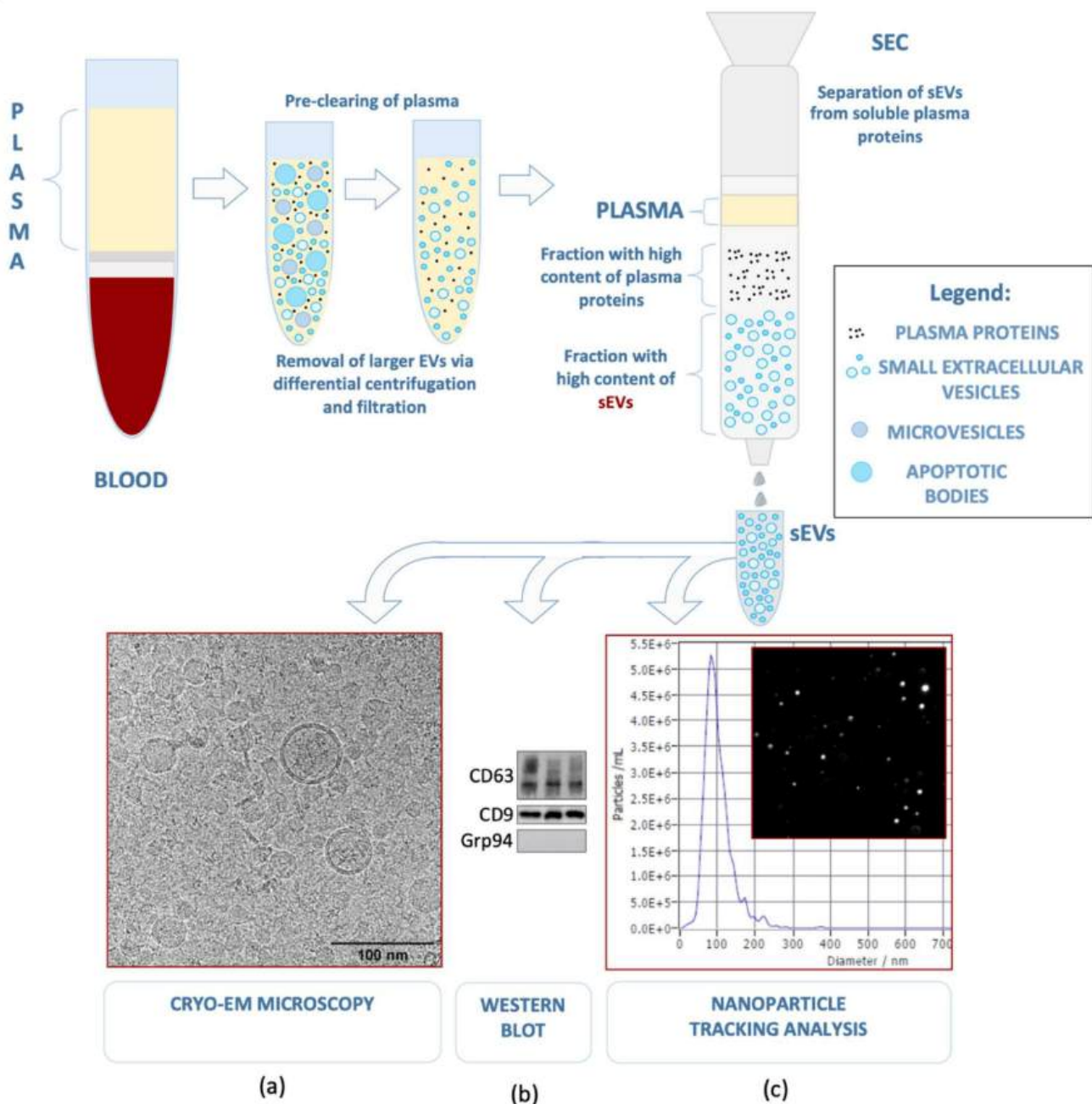


Figure 1. Small extracellular vesicles present in human plasma may be separated using pre-clearing with differential centrifugation and a 200 nm filter (not shown), followed by size exclusion chromatography. The isolated sEVs can be characterized according to the guidelines of the International Society for Extracellular Vesicles [4] with the use of (a) Cryo-EM microscopy (52,000 \times) to estimate their size and morphology, (b) western blot for two positive (CD63 and CD9) and one negative (Grp94) sEV marker, and (c) nanoparticle tracking analysis (NTA), which allows the evaluation of vesicle size (average diameter = 90.9 nm) and concentration (1.3×10^{11} particles/mL) [9] (modified).

sEVs are uniquely positioned to mediate immune response and inflammatory reactions [10]. In recent years, research interest in sEVs has surged; sEVs have been linked to a number of human pathologies i.e., chronic rhinosinusitis, asthma, and airway infections, which are multifactorial in etiology, but unfailingly associated with excessive stimulation of the immune system. sEVs are present in many types of body fluids, including blood [11,12], urine [13], saliva [14], bronchioalveolar lavage fluid (BALF) [15], lymph [16], and nasal lavage fluid [17]. Therefore, sEVs are considered an attractive opportunity for non-invasive diagnostics with regards to their potential use as a liquid biopsy. In addition, sEVs might be

a promising approach to monitor disease progression or response to therapy, as shown for malignant diseases [18]. First attempts have been made to harness the properties of sEVs and use them for drug delivery [19], and thus utilize them as therapeutic vesicles [20]. EV-based therapeutics are currently being developed to treat cancer, as well as inflammatory and autoimmune diseases [21].

In this article, we discuss the contribution of sEVs to inflammatory conditions of the respiratory tract. Our focus will be chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) or without nasal polyps (CRSsNP), acute upper airway infections, asthma, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We will present the role of sEVs in the group of airway diseases that are associated with a strong inflammatory background. We decided to exclude cancers of the respiratory system because of their wide etiologic spectrum that needs to be broadly and particularly addressed. We also address the multifaceted role of sEVs in infection and their interplay with pathogens, to which the airway epithelium is invariably exposed. Lastly, we outline the diagnostic and therapeutic possibilities.

2. Small Extracellular Vesicles—Biogenesis, Cargo Components, and Functions

2.1. Biogenesis

The biogenesis of sEVs begins by directing cargos intended for secretion to the early endosomes (EEs). EEs accumulate intraluminal vesicles and later convert to multivesicular bodies (MVBs) [5,22]. Upon invagination of the endosomal membrane, a portion of cytoplasm is engulfed within the newly formed vesicle. Most MVBs later fuse with lysosomes, which ensures the degradation of their content by hydrolases. However, vesicles harbouring CD63, LAMP1, LAMP2, and MHCII can avoid degradation and fuse with the plasma membrane, releasing sEVs into the intercellular space [1,5].

Four endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) play a key role in both cargo creation and vesicle separation [23]. In the first step, ESCRT-0 and ESCRT-I direct cargos to the assembly site. Then, ESCRT-II and -III facilitate sEV budding and fission; sEVs may also be formed in the absence of ESCRT. Several mechanisms have been described, and one of them involves the formation of transmembrane protein clusters composed of tetraspanins and other proteins at the sites of MVBs, which then invaginate to form a vesicle. These mechanisms are distinct but overlapping, and each cell likely features a population of EVs from different origins [24]. TSG101 (tumor susceptibility gene 101 protein), ALIX, and VPS4 (vacuolar protein sorting-associated protein 4) are proteins carried by EVs that can be used to determine the origin from MVBs. Syndecan-1 and syntenin-1 were demonstrated to interact with ALIX and ESCRT-I and -III, and might be involved in the formation of sEVs [25]. The trafficking and secretion is mediated by small GTPases from the Rab family, for instance Rab27a and Rab27b [26]. Another crucial process is the merging of MVBs with the plasma membrane, which is mediated by SNARE complexes (soluble *N*-ethylmaleimide sensitive fusion attachment protein receptor) [25].

2.2. Cargo Components

The cargo composition of sEVs highly depends on the cell of origin, as well as on the status of the secreting cell [27,28]. A comprehensive analysis of nucleic acids enclosed in sEVs has shown a distinct repertoire of extracellular RNA [29], as well as the presence of DNA associated with sEVs [4,30]. Furthermore, proteomic analyses have revealed members of various cellular pathways, including cytoskeletal components, annexins, signal transducers, metabolic enzymes, and chaperone proteins; sEVs originating from antigen-presenting cells carry major histocompatibility complex (MHC) molecules and costimulatory molecules CD86 and CD54 [31]. Certain protein families are particularly abundant. The most notable examples are tetraspanins, a group of transmembrane proteins with a role in cell aggregation and motility [32]. Tetraspanins may act as molecular traps, binding to a variety of proteins and directing them to sEVs. Some family members, such as CD81, CD63, and CD9, have been proposed as sEV markers [5] (Figure 2). Nevertheless, the molecular composition of sEVs is much narrower than the repertoire of the parent

cell. Although these patterns are only beginning to emerge, current observations suggest the existence of an elaborate mechanism governing the inclusion of molecules to sEVs. Due to the biological structure of sEVs, their cargo components can either be associated with the sEV membrane or they can be enclosed in the vesicle lumen [24] (Figure 2, Table 1). To distinguish the cellular origins of sEVs or the type of disease, several specific abbreviations were established in the literature. For instance: tumor-derived sEVs: TEX [33], nasal mucus-derived sEVs: rhinosomes [34], and dendritic cell-derived sEVs: DEX [35].

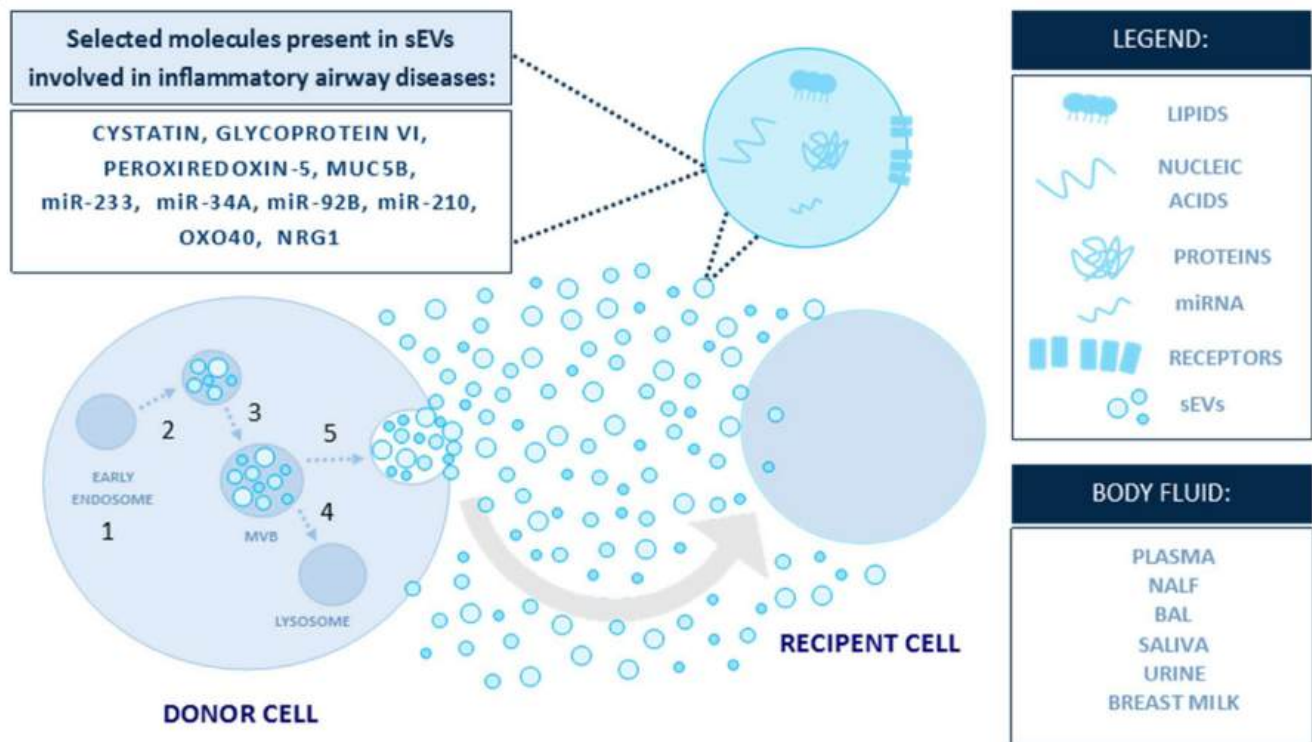


Figure 2. sEVs are carriers of a complex biologically active cargo [27] (modified). The figure presents selected molecules carried within sEVs that are involved in inflammatory airway diseases. The biogenesis of sEVs begins when cargos for secretion are located in early endosomes, (1) which accumulate intraluminal vesicles (2) and later convert to multivesicular bodies (MVBs) (3). MVBs might fuse with lysosomes and degrade (4) or fuse with the plasma membrane, (5) releasing sEVs into the intercellular space.

2.3. Functions

sEVs were first described as vesicles secreted upon fusion with the plasma membrane by maturing reticulocytes [36]. This observation has sparked the idea that sEVs present an alternative route to eliminate molecules no longer needed for cellular homeostasis or ones resistant to lysosomal degradation. Raposo et al. revealed that sEVs originating from B-cells harbor a functional MHCII complex, and are capable of inducing an antigen-specific T cell response [37]. These findings paved the path for further discoveries of sEV functions in antigen presentation, immunosuppression, mediation of inflammation, and viral infection [24]. However, the functions of sEVs appear to be even more complex, and sEVs are now considered to play a crucial role in cell-to-cell communication [6]. They are capable of reprogramming recipient cells by transporting mRNAs and miRNAs, which are able to trigger the translation of specific proteins [1]. Their role in transmitting chemokines, cytokines, and other signaling molecules is of particular interest, as the complexity of the sEV cargo composition has the capacity to induce effects on recipient cells. Several biological functions of sEV cargo components have been described in the literature, including angiogenic/anti-angiogenic effects, tissue regeneration, immune cell activation, or immunosuppression, as well as metastasis and cancer progression; sEVs

derived from human mesenchymal stroma cells might have promising therapeutic potential in allergic airway inflammation. Inhibition of ILC2 (innate lymphoid cells), infiltration of inflammatory cells, decreased production of mucus in the lung, and reduced Th2 cytokine levels were associated with human mesenchymal stroma cell-derived sEVs; miR-146a transported by this EV type could be responsible for these effects [38]. The biological functions of sEVs are summarized in Table 1.

Table 1. Comparison of articles from our literature search with emphasis on the source of sEVs, their cargo, and biological effects. Abbreviations: CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSsNP: chronic rhinosinusitis without nasal polyps; P-gp: permeability glycoprotein; TLR: toll-like receptor; PAPP-A: pappalysin A; LncGAS5: long-noncoding RNA GAS5); NLF: nasal lavage fluid; ADAM10: disintegrin and metalloprotease 10; MEE: middle ear effusion; MUC5B: mucin 5B; hNECS: human nasal epithelial cells; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; SERPINE1: serpin family E member 1; PERP: P53 apoptosis effector related to PMP22; PLTP: phospholipid transfer protein; HMEEC: human middle-ear epithelial cells; hRNP: heterogenous nuclear ribonucleoprotein; miR/miRNA: microRNA; RANKL: receptor activator of nuclear factor—kappa B ligand; hCPFS: human cholestatoma perimatrix fibroblasts; ARDS: acute respiratory distress syndrome; EPC: endothelial progenitor cells; MPO: myeloperoxidase; NHBE: normal human bronchial epithelial cells; BALF: bronchoalveolar lavage fluid; NRG1: neuregulin 1; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; tRNA: transfer RNA; piRNA: Piwi-interacting RNA; snRNA: small nuclear RNA; snoRNA: small nucleolar RNA.

Reference	Disease; Source of sEVs	sEVs Cargo	Possible Biological Function
Nocera et al. [34]	CRSwNP; nasal mucus	• P-gp	Possible regulation Th2 cytokine production
Mueller et al. [39]	CRSwNP; nasal mucus	• Cystatin-SN, • Peroxiredoxin-5, • Glycoprotein VI	Cysteine protease inhibition Innate immune regulation Activation of TLRs Antioxidant activity Activation of platelets
Miyake et al. [40]	CRSwNP; CRSsNP nasal mucus	• Cystatin-1 • Cystatin-2	Epithelial barrier functions
Mueller et al. [41]	CRSwNP; nasal mucus	• PAPP-A	Epithelial proliferation Polyp growth
Mueller et al. [42]	CRSwNP; nasal mucus	• Serpins	Polyp fibrin deposition
Zhu et al. [43]	Allergic rhinitis; nasal mucus, nasal epithelial cells	• LncGAS5	Suppression of CD4+ to Th1 differentiation, promoted Th2 differentiation
Zhang et al. [44]	CRSwNP;NLF	• ADAM10	Angiogenesis Vascular permeability
Val et al. [45]	Otitis media, MEE	• miR-233 • MUC5B	IL- 8 activity Neutrophil functions Innate immune responses Tissue repair and remodeling
Zhou et al. [46]	CRSwNP, CRSsNP + asthma; hNECS	• Proteins involved in p53 and PPAR signaling pathways SERPINE1, PERP, PLTP, ladinin-1, myosin-9	Immune system signaling Immune responses to viruses and bacteria Cell cycle signaling Cell growth and replication Cell cycle control
Val et al. [47]	Haemophilus influenzae infection; HMEEC	• hnRNP A2B1 • hnRNP Q • miR-378-a-3p • miR-378i • miR-200a-3p • miR-378g • miR30d-5p • miR-222-3p	Immunity regulation Inflammatory pathways Angiogenesis Neutrophil adhesion
Gong et al. [48]	Middle ear cholestatoma; keratinocytes	• miRNA-17	Upregulation of RANKL Osteoclast differentiation Angiogenesis
Li et al. [49]	Cholestatoma; hCPFS	• miR-106b-5p	Overexpression of Angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells Tube formation Cell migration
Zhou et al. [50]	ARDS; EPC	• miR-126	Reduction of permeability and inflammation Reduced MPO activity Lung injury protection
Huang et al. [51]	Pneumonia; Adenovirus Infection; serum	• miR-450a-5p/miR-103a-3p, • miR-103b/miR-98-5p	Immunoregulatory function
Bartel et al. [52]	Asthma; NHBE nasal lavage	• miR-34a, • miR-92b, • miR-210	Th2 response Dendritic cell activity

Table 1. Cont.

Reference	Disease; Source of sEVs	sEVs Cargo	Possible Biological Function
Huang et al. [53]	Asthma; Dendritic cells	• OXO40 ligand	CD4+ T cell proliferation Increase IL-4 Th2 response Inflammation
Quazi et al. [15]	Sarcoidosis; BALF	• NRG1	Proliferation Cell survival
Hough et al. [54]	Asthma; BALF	• lipids	Inflammation
Torregrosa et al. [55]	Asthma; BALF	• enzymes for leukotriene biosynthesis • miRNAs • tRNAs	Upregulation of cytokines and leukotrienes in airway epithelium
Sundar et al. [56]	COPD; plasma	• piRNAs • snRNAs • snoRNAa	Inflammation Extracellular matrix and tissue remodeling

3. Role of sEVs in Inflammatory Airway Diseases

Inflammatory airway diseases are complex with regards to their heterogeneous etiologies. The literature about sEVs in inflammatory airway diseases addresses different aspects of sEV biology, however, the diagnostic/prognostic values of sEVs and their role in etiopathogenesis are the most frequently investigated topics. In the following sections, we will focus on different inflammatory airway diseases and present the available sEV-based literature, with special emphasis on diagnostic/prognostic or etiopathologic aspects of sEVs. Our main focus will be the role of sEVs in mediating inflammation and immune responses.

Inflammation is triggered by antigen presentation, as well as stimulation by cytokines, chemokines, and other signaling molecules. The complex inflammatory cascade consists of several steps that have been shown to be influenced by sEVs, suggesting that sEVs can play a pro- and anti-inflammatory role. The cargo composition of sEVs is considered to reflect the state of the parent cell [57,58] and, therefore, depending on the cell of origin, they may carry a cocktail of signaling molecules and other inflammatory substrates. Examples include the trafficking of enzymes for leukotriene biosynthesis [59] and Hsp70, which induces the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 13 (IL-13), and interferon- γ (IFN- γ) in target cells [60]; sEVs can also engage immune cells. Dendritic cells exchange miRNAs, which are encapsulated in sEVs and alter gene expression and direct immune response in accordance with the specific miRNA sequence carried [61]. Moreover, antigen-presenting cell (APC)-derived sEVs can directly stimulate naïve T cells. MHC complexes on sEVs are recognized by CD8+ lymphocytes, despite the absence of APC, and invoke an immunogenic response in the presence of co-stimulators [62].

3.1. Upper Airways

3.1.1. sEVs and Chronic Rhinosinusitis (CRS)

Chronic rhinosinusitis is a heterogeneous disease involving inflammation of the sinonasal mucosal lining. It is a prevalent problem, adversely affecting the quality of life of 5–12% of the global population. The traditional phenotypic classification into CRS with and without nasal polyps failed to account for the diverse molecular pathomechanisms underlying the disease. The publications about CRS of the last 10 years have led to a paradigm shift in the understanding of this disease. It is now considered as a disease resulting from a maladjusted interplay between environmental cues (pathogen invasion, microbiome, and permeability of mucosal lining) and the immune system. The European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020 [63] turns away from the phenotypic classification and focuses on the pathophysiology of the disease instead. Based on the endotype, CRS is now divided into primary and secondary. It is further defined by anatomic localization and endotype dominance, classified either into type 2 (associated with more severe manifestations and resistance to therapy) or non-type. Likewise, secondary CRS is characterized as localized or diffuse, and further defined by endotype

dominance [63]. This approach focuses on upstream regulators rather than manifestations, paving the way for personalized, etiology-driven therapies.

The ability to reproducibly and non-invasively obtain and analyze sEVs from nasal fluids could offer the possibility of defining CRS endotypes, aligning them with clinical outcomes, and introducing them into a routine diagnostic workup. A proteomic analysis of such samples from patients with CRS showed 123 differentially expressed proteins, pointing to over 40 dysregulated signaling pathways. Significant differences in sEV proteome were found between CRS with polyps (CRSwNP) and the control group. Among the most promising molecular markers of CRSwNP were cystatin, glycoprotein VI, and peroxiredoxin-5 [39]. In another study, high levels of epithelial protease inhibitors cystatin-1 and -2 were found in sEVs. Based on this finding, cystatin-2 was proposed as a marker for CRS, capable of predicting the disease phenotype [40]; sEVs may also contribute to the formation of polyps due to the upregulation of pappalysin and serpins [41,42].

One of the hallmarks of the CRS phenotypes is the imbalance between Th1 and Th2 cells. While CRSwNP relies on Th2 cells, CRSsNP is dominated by the Th1 response; sEVs can shift this equilibrium by promoting the differentiation of Th2 and suppressing Th1 lymphocytes [43]. Ickrath et al. have shown that tissue samples from patients with CRSwNP feature higher levels of CD8+ than CD4+ T cells. Their study also suggests the possibility of a local regulation mechanism within the polyp microenvironment [64]. Interestingly, studies have shown that sEVs can have an effect on the profile of T cells. Stimulation of resting CD3+ T cells with IL-2 and sEVs from their activated counterparts shifted the T cell profile to CD8+ and changed the cytokine profile [65]. Studies in mouse models demonstrated that mast cell-derived sEVs may impact B and T cell functions, ultimately contributing to inflammation [66]. It was shown that sEVs are transported through the lymphatic system from the periphery to the lymph node, and that B cells, together with macrophages, are key players in sEV uptake [16].

3.1.2. sEVs and Airway Epithelium

The airway epithelium is the first line of defense against pathogens, and consists of several different barriers to prevent pathogen invasion. Its antimicrobial properties include secretion of lysozyme, lactoferrin, hydrogen peroxide, nitric oxide, and mucins. Epithelial cells express toll-like receptors (TLRs), capable of recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and activating an immune cell response [67]. Recent observations showed that sEVs can modulate the innate immune response in the airway. Bacterial lipopolysaccharides (LPSs) recognized by TLR4 increased the production of sEVs by epithelial cells, which carry nitric oxide synthase [68]. In CRSsNP, the expression of TLR2 and TLR4 correlates with neutrophil abundance [69], and it was demonstrated that sEVs correspond to the expression of TLR receptors in airway epithelium [70].

Nasal polyps are benign outgrowths of sinonasal mucosa, characterized by increased epithelial cell proliferation, interstitial edema, and increased angiogenesis. Interestingly, sEVs isolated from the epithelium of CRSwNP patients contain proteins participating in proliferative pathways and enzymes known for their role in angiogenesis, suggesting that sEVs are involved in inflammatory tissue remodeling [44,46]. CRSwNP-derived sEVs contain high levels of permeability glycoprotein (P-gp), which regulates cytokine secretion [34].

The structures of the middle ear, which connect to the upper respiratory tract and nasal cavity via the Eustachian tube, are also covered with a respiratory-type epithelium. The middle ear epithelium (MEE) plays an important role in the development of middle ear otitis (OME), and is composed of ciliated cells, secretory cells, non-secretory cells, and basal cells. Secretory cells are responsible for the production of mucins and various anti-microbial proteins, such as lactotransferrin, lysozyme, defensins, and surfactants [71,72]. Val et al. were the first to isolate sEVs from the middle ear fluid samples of 16 pediatric patients. Not unexpectedly, the proteomic analysis showed an enrichment in neutrophil markers and molecules associated with innate immunity, such as immunoglobulins, MUC5B, and heat-

shock proteins; also related to neutrophil stimulation were 29 enriched miRNA sequences unique to the middle ear samples, including the most abundant miR-223 [45]. On the cellular level, it was shown that human middle ear epithelial cells treated with *Haemophilus influenzae* lysate secrete sEVs containing heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, such as hnRNP A2B1 and hnRNP Q, and also miRNAs that might be involved in immunity regulation [47].

It is also suspected that sEVs play a role in the pathogenesis of chronic otitis media with cholesteatoma. In middle ear cholesteatoma patients, sEVs derived from keratinocytes might induce osteoclast differentiation. This was observed after the addition to fibroblasts co-cultured with osteoclast precursor cells. Downregulated miR-17 enclosed in sEVs, which regulates *Tnfsf11* expression in fibroblasts, appears to be responsible for this effect [48]. Another in vitro study showed that human cholesteatoma perimatrix fibroblast-derived sEVs promote angiogenesis through downregulation of miR-106b-5p in sEVs, leading to the overexpression of Angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Furthermore, sEVs contributed to enhanced tube formation and cell migration [49]. These findings posit sEVs as important factors in the pathogenesis and progression of OME and chronic otitis media with cholesteatoma.

3.1.3. sEVs and Bacteria in Upper-Airway Inflammation

There is a close cooperation between the host's immunity and the microbiome. Chronic inflammatory processes, such as CRS, are often associated with decreased microorganism diversity and an imbalance within the microbiome, which likely contributes to the perpetual inflammatory signaling. This notion is confirmed by observations that potentially pathogenic bacterial species may be present, albeit in low proportions, in healthy patients [73,74]. At the same time, sEVs secreted by microbiological flora shape the host's immune response, and can be a causative factor in inflammatory conditions [75]. Bacteria-derived sEVs contain various molecules, including proteins, nucleic acids, lipids, and glycans. It is likely that these sEVs impact different cytotoxic and immunomodulatory mechanisms to ultimately facilitate the survival of the pathogen. Another important fact is that bacteria-derived sEVs transport LPS that is known for its immunomodulatory functions [76]. Bacterial EVs were shown to interact with various cells, including dendritic cells, macrophages, and neutrophils; sEV-associated PAMPs allow binding to receptors present on the surface of immune cells, and activate immune response pathways that result in pro-inflammatory cytokine production. Additionally, it is suggested that sEVs may convey antigens to stimulate the immune response [77,78]. Participation of bacteria-derived sEVs in the regulation of gene expression is also suspected. For example, *Pseudomonas aeruginosa*-derived sEVs were able to suppress the expression of the group of MHC proteins in lung macrophages [79]. On the other hand, some data indicate a positive and non-pathogenic role of bacteria-derived sEVs to the functionality of the healthy microbiome [80]. Metagenomic analysis of bacteria-derived sEVs isolated from the nasal lavage fluid of CRS patients also revealed their high abundance with decreased diversity. Several differences between CRS and non-CRS patients were discovered, since some bacterial groups were decreased in the CRS group, while increased in non-CRS individuals. Additionally, CRSwNP was correlated with a more prominent presence of *Staphylococcus aureus* and its EVs [81]. Research on bacteria-derived sEVs is a relatively new but growing field of knowledge that will contribute to a better understanding of the molecular basis of diseases and the search for new therapeutic solutions. Especially in inflammatory diseases of the respiratory tract, where the physiological microbiome meets environmental factors, including pathogenic microorganisms, this could be of importance.

3.1.4. sEVs and Respiratory Viruses

Upper-airway viral infections are the most frequent illnesses of the respiratory tract, with adults experiencing the common cold 2–4 times a year and children 6–10 times a year [82]. Acute exacerbation of chronic airway conditions, especially asthma and

COPD, are also frequent clinical problems. In both instances, viral infections are the most common cause [83]. On a cellular level, viruses can exploit the host's machinery for vesicle biogenesis and use it to their advantage [84]; sEVs from infected cells carry viral genetic material, proteins, and, in some cases, whole viruses. As one vesicle contains several virus particles, this type of transmission is highly infectious [85]. For non-enveloped viruses, the phospholipid bilayer of the sEV serves as a protective barrier from neutralizing antibodies. To spread, viruses also exploit the cellular sEV release mechanism. This process prevents cytolysis, which is a very immunogenic event [8]. However, sEVs have a complex and contextual role in disease, as they can both mitigate and exacerbate the course of the disease. To that end, sEVs present in tracheobronchial mucus contribute to its antimicrobial function by presenting α -2,6-linked sialic acid on their surface, which is known to bind and neutralize human influenza virus particles [86].

Consistent with their role as messengers at the intersection of inflammation and immune response, sEVs released from cells during respiratory syncytial virus (RSV) infection were found to contain both viral RNA (mRNA, rRNA, and short non-coding RNA) and proteins. These sEVs were not infective and had no diagnostic value, but were able to induce chemokine release from monocytes and epithelial cells *in vitro* [87]. Similarly, human rhinovirus (RV) triggers the release of the pro-inflammatory protein Tensacin-C, which is associated with sEVs. This in turn leads to increased cytokine production by macrophages [88].

Paracrine communication between alveolar macrophages and lung epithelial cells plays an important role in the damage and repair of alveoli. Scheller et al. analyzed sEV-associated miRNAs in BALF from patients with influenza A induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). In comparison to samples from healthy volunteers, four miRNAs were significantly deregulated. Most striking was the overexpression of miR17-5p, which was shown to enhance viral replication *in vitro* by downregulation of Mx1 antiviral factor [89]. In contrast, a beneficial role of sEV-associated miRNAs was described in a mouse model of LPS-induced acute lung injury. An intratracheal administration of sEVs that contained miRNA-126 derived from endothelial progenitor cells facilitated the regeneration of the alveolar epithelium [50]. Lastly, miRNAs associated with serum-derived sEVs were proposed as biomarkers of adenoviral pneumonia in the pediatric population [51].

3.2. Lower Airways

sEVs in Bronchial and Lung Diseases

EVs, including sEVs, participate in the regulation of immune cell functions during inflammatory diseases of the airways. Current research suggests that sEVs are important players in the pathogenic states of bronchial epithelium, such as the development of asthma; sEVs are released from airway epithelium and carry miRNAs (miR-34a, miR-92b, miR-210) that may impact the Th2-dependent immune response in asthma [52], and sEVs derived from mesenchymal stroma cells influence Treg suppression through the activation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to secrete IL-10 and TGF- β . Due to their capacity in the interaction with B cells and monocytes, but not with CD4+ T cells, sEVs may lead to Treg suppression. That might be of high importance in the asthma pathogenesis and in consequence be a potential therapeutic target [90]. In patients with asthma, dendritic cells treated with thymic stromal lymphopoietin (TSLP) secrete sEVs containing OX40 ligand. This triggers CD4+ T cell proliferation, increases the levels of IL-4, and directs the Th2 response [53]. Interestingly, it was shown that sEVs are also able to transfer mitochondrial components from myeloid-derived regulatory cells to T cells [91]. Other studies demonstrated the potential of EVs to transport mtDNA [92], as well as functional respiratory complexes [93]. In mouse models and cell culture models of allergy and asthma, increased levels of sEVs were demonstrated. Stimulation with epithelial-derived sEVs that carried IL-13 induced proliferation of inflammatory cells. Inhibition of sEV secretion also resulted in a decrease in inflammation [94].

Previous studies demonstrated that sEVs transfer proteins and miRNA between primary human tracheobronchial cells to the adenocarcinoma cells of the lung, contributing to the activity of recipient cells [95]. It was demonstrated that pro-inflammatory properties of BALF-derived sEVs may induce and foster the progress of inflammation in sarcoidosis. They carry increased levels of NRG1, which can be important for cell survival and proliferation, and are common in cancer [15]; sEVs from BALF of asthmatic patients carry an altered lipid composition, which may be important for the developed inflammation [54]. Other studies emphasize the role of sEVs in the acute lung injury (ALI) and ARDS generated in mouse models through inflammatory and non-inflammatory agents. Levels of EVs in BALF were elevated, affecting macrophages and enhancing lung inflammation [96]. In mice, macrophages that are involved in ALI pathogenesis secrete sEVs that stimulate other macrophages to produce TNF- α . In addition, lung epithelium-derived IL-25 downregulates proteins involved in sEV secretion in macrophages, and consequently inhibits sEV release and TNF- α secretion [97]. Analysis of BALF-derived sEVs from asthmatic and healthy patients indicated changes in their properties. In the context of asthma, sEVs contribute to an upregulation of cytokines and leukotrienes in airway epithelium [55].

Studies conducted on models of asthma and COPD have shown that bacterial and viral infections of the respiratory system lead to an increased release of EVs and a heightened secretion of cytokines, which stimulate neutrophils [98]; sEV secretion from airway epithelia is subject to regulation. Cigarette smoke can upregulate this process. In contrast, thiol antioxidants may inhibit this process and have a beneficial effect in COPD and other respiratory pathologies [99]. Another study examining plasma-derived EVs, including sEVs, isolated from patients with COPD, tobacco users, and non-smoking healthy individuals showed differential miRNA expression, which suggests their use as biomarkers [56].

4. Future Perspectives: Diagnostic and Therapeutic Potential

sEV research is a relatively new but rapidly growing field of research, and sEVs emerge as promising prognostic, diagnostic, and therapeutic tools for future clinical use [100,101]. Despite the great potential of using sEV-based methods in clinical practice, to the best of our knowledge, none have been approved so far. In inflammatory airway diseases, sEVs isolated from different body fluids, such as serum, plasma, nasal lavage fluid, or bronchoalveolar lavage fluid, have been shown to carry a complex molecular cargo that has great potential to be utilized for diagnostic purposes. One example are the specific miRNAs that are found in sEVs isolated from the serum of children suffering from human adenovirus-induced pneumonia [51]. Another example for the prognostic and diagnostic value of sEVs are the airway-associated cancers. Pleural lavage-derived EVs carry a signature of miRNAs (miRNA-1-3p, miRNA-144-5p, miRNA-150-5p) that are promising biomarkers for lung cancer diagnosis [102]. Serum-derived sEVs in non-small lung cancer carry miR-1269a, which serves as a diagnostic marker, and also plays an oncogenic role by regulating *FOXO1* [103]. A significant research effort will be necessary to unravel the complexity of biological functions of sEVs. Safe usage in clinical applications will require a standardization of isolation procedures from clinical material and cell culture, as well as unification of analytic methods.

5. Summary

A growing body of evidence suggests that sEVs might be useful as biomarkers in many diseases [102,104–106], as well as prognostic agents providing information about the phase of disease or predicted therapy outcomes [107–109]; sEVs transfer specific cargo components depending on the cell of origin, and ensure a safe environment for transported compounds. This allows their delivery to both neighboring and distant cells, which is an important modality of communication between tissues and organs. Furthermore, sEVs are involved in antigen presentation, and can activate immune cells, which allows them to stimulate or inhibit immunological pathways; sEVs are considered safe, are well-tolerated by the organism, and, therefore, show great potential for drug transport or vaccination.

Regulation of sEV secretion that enhances or inhibits their release might be an interesting therapeutic strategy. Finally, their ubiquitous presence in body fluids gives hope for their use in liquid biopsy [33].

Author Contributions: conceptualization, M.J.S.; writing—original draft preparation, K.P., K.C., A.M.C., M.F., N.L. and J.B.; writing—review and editing, K.P., N.L. and M.J.S.; visualization, K.P. and K.C.; supervision, M.J.S.; project administration, M.J.S.; funding acquisition, M.J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Science Centre, Poland UMO-2017/25/B/NZ5/02949# to Mirosław J. Szczepański.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Colombo, M.; Raposo, G.; Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 255–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Whiteside, T.L. Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer. *Clin. Exp. Immunol.* **2017**, *189*, 259–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Whiteside, T.L. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Adv. Clin. Chem.* **2016**, *74*, 103–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Thery, C.; Witwer, K.W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M.J.; Anderson, J.D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G.K.; et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7*, 1535750. [[CrossRef](#)]
5. Thery, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 569–579. [[CrossRef](#)]
6. Pegtel, D.M.; Gould, S.J. Exosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 487–514. [[CrossRef](#)]
7. Whiteside, T.L. Lymphoma exosomes reprogram the bone marrow. *Blood* **2018**, *131*, 1635–1636. [[CrossRef](#)]
8. Van Niel, G.; D’Angelo, G.; Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2018**, *19*, 213–228. [[CrossRef](#)]
9. Ludwig, N.; Hong, C.S.; Ludwig, S.; Azambuja, J.H.; Sharma, P.; Theodoraki, M.N.; Whiteside, T.L. Isolation and Analysis of Tumor-Derived Exosomes. *Curr. Protoc. Immunol.* **2019**, *127*, e91. [[CrossRef](#)]
10. Slomka, A.; Urban, S.K.; Lukacs-Kornek, V.; Zekanowska, E.; Kornek, M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2723. [[CrossRef](#)]
11. Zhang, H.; Liu, J.; Qu, D.; Wang, L.; Wong, C.M.; Lau, C.W.; Huang, Y.; Wang, Y.F.; Huang, H.; Xia, Y.; et al. Serum exosomes mediate delivery of arginase 1 as a novel mechanism for endothelial dysfunction in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E6927–E6936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ludwig, S.; Floros, T.; Theodoraki, M.N.; Hong, C.S.; Jackson, E.K.; Lang, S.; Whiteside, T.L. Suppression of Lymphocyte Functions by Plasma Exosomes Correlates with Disease Activity in Patients with Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 4843–4854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Motamedinia, P.; Scott, A.N.; Bate, K.L.; Sadeghi, N.; Salazar, G.; Shapiro, E.; Ahn, J.; Lipsky, M.; Lin, J.; Hruby, G.W.; et al. Urine Exosomes for Non-Invasive Assessment of Gene Expression and Mutations of Prostate Cancer. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zlotogorski-Hurvitz, A.; Dayan, D.; Chaushu, G.; Korvala, J.; Salo, T.; Sormunen, R.; Vered, M. Human saliva-derived exosomes: Comparing methods of isolation. *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, *63*, 181–189. [[CrossRef](#)]
15. Qazi, K.R.; Torregrosa Paredes, P.; Dahlberg, B.; Grunewald, J.; Eklund, A.; Gabriellson, S. Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax* **2010**, *65*, 1016–1024. [[CrossRef](#)]
16. Srinivasan, S.; Vannberg, F.O.; Dixon, J.B. Lymphatic transport of exosomes as a rapid route of information dissemination to the lymph node. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24436. [[CrossRef](#)]
17. Lasser, C.; O’Neil, S.E.; Ekerljung, L.; Ekstrom, K.; Sjostrand, M.; Lotvall, J. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2011**, *25*, 89–93. [[CrossRef](#)]
18. Czystowska-Kuzmicz, M.; Whiteside, T.L. The potential role of tumor-derived exosomes in diagnosis, prognosis, and response to therapy in cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2020**, *1–18*. [[CrossRef](#)]
19. Qiu, Y.; Sun, J.; Qiu, J.; Chen, G.; Wang, X.; Mu, Y.; Li, K.; Wang, W. Antitumor Activity of Cabazitaxel and MSC-TRAIL Derived Extracellular Vesicles in Drug-Resistant Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 10809–10820. [[CrossRef](#)]
20. Zipkin, M. Big pharma buys into exosomes for drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 1221–1223. [[CrossRef](#)]
21. Kalluri, R.; LeBleu, V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **2020**, *367*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Simons, M.; Raposo, G. Exosomes—Vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 575–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Colombo, M.; Moita, C.; van Niel, G.; Kowal, J.; Vigneron, J.; Benaroch, P.; Manel, N.; Moita, L.F.; Thery, C.; Raposo, G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 5553–5565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Robbins, P.D.; Morelli, A.E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 195–208. [[CrossRef](#)]
25. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavieu, G.; Thery, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ostrowski, M.; Carmo, N.B.; Krumeich, S.; Fanget, I.; Raposo, G.; Savina, A.; Moita, C.F.; Schauer, K.; Hume, A.N.; Freitas, R.P.; et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12* (Suppl. S11–13), 19–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Glusko, A.; Szczepanski, M.J.; Ludwig, N.; Mirza, S.M.; Olejarz, W. Exosomes in Cancer: Circulating Immune-Related Biomarkers. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 1628029. [[CrossRef](#)]
28. Villarroya-Beltri, C.; Baixauli, F.; Gutierrez-Vazquez, C.; Sanchez-Madrid, F.; Mittelbrunn, M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *28*, 3–13. [[CrossRef](#)]
29. Jeppesen, D.K.; Fenix, A.M.; Franklin, J.L.; Higginbotham, J.N.; Zhang, Q.; Zimmerman, L.J.; Liebler, D.C.; Ping, J.; Liu, Q.; Evans, R.; et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **2019**, *177*, 428–445. [[CrossRef](#)]
30. Kahlert, C.; Melo, S.A.; Protopopov, A.; Tang, J.; Seth, S.; Koch, M.; Zhang, J.; Weitz, J.; Chin, L.; Futreal, A.; et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3869–3875. [[CrossRef](#)]
31. Clayton, A.; Court, J.; Navabi, H.; Adams, M.; Mason, M.D.; Hobot, J.A.; Newman, G.R.; Jasani, B. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **2001**, *247*, 163–174. [[CrossRef](#)]
32. Hemler, M.E. Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 1103–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Whiteside, T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring: An update. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2018**, *18*, 1029–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nocera, A.L.; Miyake, M.M.; Seifert, P.; Han, X.; Bleier, B.S. Exosomes mediate interepithelial transfer of functional P-glycoprotein in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope* **2017**, *127*, E295–E300. [[CrossRef](#)]
35. Pitt, J.M.; Andre, F.; Amigorena, S.; Soria, J.C.; Eggermont, A.; Kroemer, G.; Zitvogel, L. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1224–1232. [[CrossRef](#)]
36. Johnstone, R.M.; Adam, M.; Hammond, J.R.; Orr, L.; Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9412–9420. [[CrossRef](#)]
37. Raposo, G.; Nijman, H.W.; Stoorvogel, W.; Liejendekker, R.; Harding, C.V.; Melief, C.J.; Geuze, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1161–1172. [[CrossRef](#)]
38. Fang, S.-B.; Zhang, H.-Y.; Wang, C.; He, B.-X.; Liu, X.-Q.; Meng, X.-C.; Peng, Y.-Q.; Xu, Z.-B.; Fan, X.-L.; Wu, Z.-J.; et al. Small extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells prevent group 2 innate lymphoid cell-dominant allergic airway inflammation through delivery of miR-146a-5p. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]
39. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Dillon, S.T.; Gu, X.; Wendler, O.; Otu, H.H.; Libermann, T.A.; Bleier, B.S. Noninvasive exosomal proteomic biosignatures, including cystatin SN, peroxiredoxin-5, and glycoprotein VI, accurately predict chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2019**, *9*, 177–186. [[CrossRef](#)]
40. Miyake, M.M.; Workman, A.D.; Nocera, A.L.; Wu, D.; Mueller, S.K.; Finn, K.; Amiji, M.M.; Bleier, B.S. Discriminant analysis followed by unsupervised cluster analysis including exosomal cystatins predict presence of chronic rhinosinusitis, phenotype, and disease severity. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2019**, *9*, 1069–1076. [[CrossRef](#)]
41. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Workman, A.; Libermann, T.; Dillon, S.T.; Stegmann, A.; Wurm, J.; Iro, H.; Wendler, O.; Bleier, B.S. Significant polyomic and functional upregulation of the PAPP-A/IGFBP-4/5/IGF-1 axis in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mueller, S.K.; Nocera, A.L.; Dillon, S.T.; Libermann, T.A.; Wendler, O.; Bleier, B.S. Tissue and Exosomal Serine Protease Inhibitors Are Significantly Overexpressed in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2019**, *33*, 359–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhu, X.; Wang, X.; Wang, Y.; Zhao, Y. Exosomal long non-coding RNA GAS5 suppresses Th1 differentiation and promotes Th2 differentiation via downregulating EZH2 and T-bet in allergic rhinitis. *Mol. Immunol.* **2020**, *118*, 30–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhang, W.; Zhang, J.; Cheng, L.; Ni, H.; You, B.; Shan, Y.; Bao, L.; Wu, D.; Zhang, T.; Yue, H.; et al. A disintegrin and metalloprotease 10-containing exosomes derived from nasal polyps promote angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 5921–5927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Val, S.; Jeong, S.; Poley, M.; Krueger, A.; Nino, G.; Brown, K.; Preciado, D. Purification and characterization of microRNAs within middle ear fluid exosomes: Implication in otitis media pathophysiology. *Pediatr. Res.* **2017**, *81*, 911–918. [[CrossRef](#)]
46. Zhou, M.; Tan, K.S.; Guan, W.J.; Jiang, L.J.; Deng, J.; Gao, W.X.; Lee, Y.M.; Xu, Z.F.; Luo, X.; Liu, C.; et al. Proteomics profiling of epithelium-derived exosomes from nasal polyps revealed signaling functions affecting cellular proliferation. *Respir. Med.* **2020**, *162*, 105871. [[CrossRef](#)]

47. Val, S.; Krueger, A.; Poley, M.; Cohen, A.; Brown, K.; Panigrahi, A.; Preciado, D. Nontypeable *Haemophilus influenzae* lysates increase heterogeneous nuclear ribonucleoprotein secretion and exosome release in human middle-ear epithelial cells. *FASEB J.* **2018**, *32*, 1855–1867. [[CrossRef](#)]
48. Gong, N.; Zhu, W.; Xu, R.; Teng, Z.; Deng, C.; Zhou, H.; Xia, M.; Zhao, M. Keratinocytes-derived exosomal miRNA regulates osteoclast differentiation in middle ear cholesteatoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *525*, 341–347. [[CrossRef](#)]
49. Li, Y.; Liang, J.; Hu, J.; Ren, X.; Sheng, Y. Down-regulation of exosomal miR-106b-5p derived from cholesteatoma perimatrix fibroblasts promotes angiogenesis in endothelial cells by overexpression of Angiopoietin 2. *Cell Biol. Int.* **2018**, *42*, 1300–1310. [[CrossRef](#)]
50. Zhou, Y.; Li, P.; Goodwin, A.J.; Cook, J.A.; Halushka, P.V.; Chang, E.; Zingarelli, B.; Fan, H. Exosomes from endothelial progenitor cells improve outcomes of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Crit. Care* **2019**, *23*, 44. [[CrossRef](#)]
51. Huang, F.; Bai, J.; Zhang, J.; Yang, D.; Fan, H.; Huang, L.; Shi, T.; Lu, G. Identification of potential diagnostic biomarkers for pneumonia caused by adenovirus infection in children by screening serum exosomal microRNAs. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 4306–4314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bartel, S.; La Grutta, S.; Cilluffo, G.; Perconti, G.; Bongiovanni, A.; Giallongo, A.; Behrends, J.; Kruppa, J.; Hermann, S.; Chiang, D.; et al. Human airway epithelial extracellular vesicle miRNA signature is altered upon asthma development. *Allergy* **2020**, *75*, 346–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Huang, L.; Zhang, X.; Wang, M.; Chen, Z.; Yan, Y.; Gu, W.; Tan, J.; Jiang, W.; Ji, W. Exosomes from Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Dendritic Cells Promote Th2 Differentiation through the OX40 Ligand. *Pathobiology* **2019**, *86*, 111–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hough, K.P.; Wilson, L.S.; Trevor, J.L.; Strenkowski, J.G.; Maina, N.; Kim, Y.I.; Spell, M.L.; Wang, Y.; Chanda, D.; Dager, J.R.; et al. Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10340. [[CrossRef](#)]
55. Torregrosa Paredes, P.; Esser, J.; Admyre, C.; Nord, M.; Rahman, Q.K.; Lukic, A.; Radmark, O.; Gronneberg, R.; Grunewald, J.; Eklund, A.; et al. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy* **2012**, *67*, 911–919. [[CrossRef](#)]
56. Sundar, I.K.; Li, D.; Rahman, I. Small RNA-sequence analysis of plasma-derived extracellular vesicle miRNAs in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease as circulating biomarkers. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *8*, 1684816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hezel, M.E.V.; Nieuwland, R.; Bruggen, R.V.; Juffermans, N.P. The Ability of Extracellular Vesicles to Induce a Pro-Inflammatory Host Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*. [[CrossRef](#)]
58. Yanez-Mo, M.; Siljander, P.R.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borrás, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27066. [[CrossRef](#)]
59. Esser, J.; Gehrmann, U.; D’Alexandri, F.L.; Hidalgo-Estevéz, A.M.; Wheelock, C.E.; Scheynius, A.; Gabriëlsson, S.; Radmark, O. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *126*, 1032–1040. [[CrossRef](#)]
60. Van der Pol, E.; Boing, A.N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 676–705. [[CrossRef](#)]
61. Alexander, M.; Hu, R.; Runtsch, M.C.; Kagele, D.A.; Mosbrugger, T.L.; Tolmachova, T.; Seabra, M.C.; Round, J.L.; Ward, D.M.; O’Connell, R.M. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hwang, I.; Shen, X.; Sprent, J. Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: Distinct roles for CD54 and B7 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6670–6675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Fokkens, W.J.; Lund, V.J.; Hopkins, C.; Hellings, P.W.; Kern, R.; Reitsma, S.; Toppila-Salmi, S.; Bernal-Sprekelsen, M.; Mullol, J.; Alobid, I.; et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology* **2020**, *58*, 1–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ickrath, P.; Kleinsasser, N.; Ding, X.; Ginzkey, C.; Beyersdorf, N.; Hagen, R.; Kerkau, T.; Hackenberg, S. Characterization of T-cell subpopulations in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy Rhinol.* **2017**, *8*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wahlgren, J.; Karlson Tde, L.; Glader, P.; Telemo, E.; Valadi, H. Activated human T cells secrete exosomes that participate in IL-2 mediated immune response signaling. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Skokos, D.; Le Panse, S.; Villa, I.; Rousselle, J.C.; Peronet, R.; David, B.; Namane, A.; Mecheri, S. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 868–876. [[CrossRef](#)]
67. Parker, D.; Prince, A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *45*, 189–201. [[CrossRef](#)]
68. Nocera, A.L.; Mueller, S.K.; Stephan, J.R.; Hing, L.; Seifert, P.; Han, X.; Lin, D.T.; Amiji, M.M.; Libermann, T.; Bleier, B.S. Exosome swarms eliminate airway pathogens and provide passive epithelial immunoprotection through nitric oxide. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**. [[CrossRef](#)]
69. Wang, X.; Zhao, C.; Ji, W.; Xu, Y.; Guo, H. Relationship of TLR2, TLR4 and tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 1199–1212.

70. Lehmann, R.; Muller, M.M.; Klassert, T.E.; Driesch, D.; Stock, M.; Heinrich, A.; Conrad, T.; Moore, C.; Schier, U.K.; Guthke, R.; et al. Differential regulation of the transcriptomic and secretomic landscape of sensor and effector functions of human airway epithelial cells. *Mucosal. Immunol.* **2018**, *11*, 627–642. [[CrossRef](#)]
71. Lin, J.; Tsuprun, V.; Kawano, H.; Paparella, M.M.; Zhang, Z.; Anway, R.; Ho, S.B. Characterization of mucins in human middle ear and Eustachian tube. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2001**, *280*, L1157–L1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. McGuire, J.F. Surfactant in the middle ear and eustachian tube: A review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **2002**, *66*, 1–15. [[CrossRef](#)]
73. Chalermwatanachai, T.; Vilchez-Vargas, R.; Holtappels, G.; Lacoere, T.; Jauregui, R.; Kerckhof, F.M.; Pieper, D.H.; Van de Wiele, T.; Vanechoutte, M.; Van Zele, T.; et al. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by dysbacteriosis of the nasal microbiota. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Ramakrishnan, V.R.; Feazel, L.M.; Gitomer, S.A.; Ir, D.; Robertson, C.E.; Frank, D.N. The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e85507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Fujita, Y.; Kadota, T.; Araya, J.; Ochiya, T.; Kuwano, K. Extracellular Vesicles: New Players in Lung Immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *58*, 560–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Kuipers, M.E.; Hokke, C.H.; Smits, H.H.; Nolte-'t Hoen, E.N.M. Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2182. [[CrossRef](#)]
77. Schorey, J.S.; Cheng, Y.; Singh, P.P.; Smith, V.L. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 24–43. [[CrossRef](#)]
78. Kaparakis-Liaskos, M.; Ferrero, R.L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 375–387. [[CrossRef](#)]
79. Armstrong, D.A.; Lee, M.K.; Hazlett, H.F.; Dessaint, J.A.; Mellinger, D.L.; Aridgides, D.S.; Hendricks, G.M.; Abdalla, M.A.K.; Christensen, B.C.; Ashare, A. Extracellular Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Suppress MHC-Related Molecules in Human Lung Macrophages. *Immunohorizons* **2020**, *4*, 508–519. [[CrossRef](#)]
80. Shen, Y.; Giardino Torchia, M.L.; Lawson, G.W.; Karp, C.L.; Ashwell, J.D.; Mazmanian, S.K. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 509–520. [[CrossRef](#)]
81. Choi, E.B.; Hong, S.W.; Kim, D.K.; Jeon, S.G.; Kim, K.R.; Cho, S.H.; Gho, Y.S.; Jee, Y.K.; Kim, Y.K. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy* **2014**, *69*, 517–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Proud, D. Upper airway viral infections. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2008**, *21*, 468–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Tan, K.S.; Lim, R.L.; Liu, J.; Ong, H.H.; Tan, V.J.; Lim, H.F.; Chung, K.F.; Adcock, I.M.; Chow, V.T.; Wang, D.Y. Respiratory Viral Infections in Exacerbation of Chronic Airway Inflammatory Diseases: Novel Mechanisms and Insights From the Upper Airway Epithelium. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Caobi, A.; Nair, M.; Raymond, A.D. Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Viral Infections in Humans. *Viruses* **2020**, *12*. [[CrossRef](#)]
85. Altan-Bonnet, N. Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *32*, 77–81. [[CrossRef](#)]
86. Kesimer, M.; Scull, M.; Brighton, B.; DeMaria, G.; Burns, K.; O'Neal, W.; Pickles, R.J.; Sheehan, J.K. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: A possible role in innate defense. *FASEB J.* **2009**, *23*, 1858–1868. [[CrossRef](#)]
87. Chahar, H.S.; Corsello, T.; Kudlicki, A.S.; Komaravelli, N.; Casola, A. Respiratory Syncytial Virus Infection Changes Cargo Composition of Exosome Released from Airway Epithelial Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 387. [[CrossRef](#)]
88. Mills, J.T.; Schwenzler, A.; Marsh, E.K.; Edwards, M.R.; Sabroe, I.; Midwood, K.S.; Parker, L.C. Airway Epithelial Cells Generate Pro-inflammatory Tenascin-C and Small Extracellular Vesicles in Response to TLR3 Stimuli and Rhinovirus Infection. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1987. [[CrossRef](#)]
89. Scheller, N.; Herold, S.; Kellner, R.; Bertrams, W.; Jung, A.L.; Janga, H.; Greulich, T.; Schulte, L.N.; Vogelmeier, C.F.; Lohmeyer, J.; et al. Proviral MicroRNAs Detected in Extracellular Vesicles From Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients With Influenza Virus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 540–543. [[CrossRef](#)]
90. Du, Y.M.; Zhuansun, Y.X.; Chen, R.; Lin, L.; Lin, Y.; Li, J.G. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma. *Exp. Cell Res.* **2018**, *363*, 114–120. [[CrossRef](#)]
91. Hough, K.P.; Trevor, J.L.; Strenkowski, J.G.; Wang, Y.; Chacko, B.K.; Tousif, S.; Chanda, D.; Steele, C.; Antony, V.B.; Dokland, T.; et al. Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biol.* **2018**, *18*, 54–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Sansone, P.; Savini, C.; Kurelac, I.; Chang, Q.; Amato, L.B.; Strillacci, A.; Stepanova, A.; Iommarini, L.; Mastroleone, C.; Daly, L.; et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E9066–E9075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Panfoli, I.; Ravera, S.; Podesta, M.; Cossu, C.; Santucci, L.; Bartolucci, M.; Bruschi, M.; Calzia, D.; Sabatini, F.; Bruschetini, M.; et al. Exosomes from human mesenchymal stem cells conduct aerobic metabolism in term and preterm newborn infants. *FASEB J.* **2016**, *30*, 1416–1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Kulshreshtha, A.; Ahmad, T.; Agrawal, A.; Ghosh, B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 1194–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Gupta, R.; Radicioni, G.; Abdelwahab, S.; Dang, H.; Carpenter, J.; Chua, M.; Mieczkowski, P.A.; Sheridan, J.T.; Randell, S.H.; Kesimer, M. Intercellular Communication between Airway Epithelial Cells Is Mediated by Exosome-Like Vesicles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 209–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Lee, H.; Zhang, D.; Laskin, D.L.; Jin, Y. Functional Evidence of Pulmonary Extracellular Vesicles in Infectious and Noninfectious Lung Inflammation. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 1500–1509. [[CrossRef](#)]
97. Li, Z.G.; Scott, M.J.; Brzoska, T.; Sundd, P.; Li, Y.H.; Billiar, T.R.; Wilson, M.A.; Wang, P.; Fan, J. Lung epithelial cell-derived IL-25 negatively regulates LPS-induced exosome release from macrophages. *Mil. Med. Res.* **2018**, *5*, 24. [[CrossRef](#)]
98. Eltom, S.; Dale, N.; Raemdonck, K.R.; Stevenson, C.S.; Snelgrove, R.J.; Sacitharan, P.K.; Recchi, C.; Wavre-Shapton, S.; McAuley, D.F.; O’Kane, C.; et al. Respiratory infections cause the release of extracellular vesicles: Implications in exacerbation of asthma/COPD. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101087. [[CrossRef](#)]
99. Benedikter, B.J.; Volgers, C.; van Eijck, P.H.; Wouters, E.F.M.; Savelkoul, P.H.M.; Reynaert, N.L.; Haenen, G.R.M.M.; Rohde, G.G.U.; Weseler, A.R.; Stassen, F.R.M. Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108*, 334–344. [[CrossRef](#)]
100. Hofmann, L.; Ludwig, S.; Vahl, J.M.; Brunner, C.; Hoffmann, T.K.; Theodoraki, M.-N. The Emerging Role of Exosomes in Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Head and Neck Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*. [[CrossRef](#)]
101. Chaput, N.; Thery, C. Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.* **2011**, *33*, 419–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Roman-Canal, B.; Moiola, C.P.; Gatius, S.; Bonnin, S.; Ruiz-Miro, M.; Gonzalez, E.; Ojanguren, A.; Recuero, J.L.; Gil-Moreno, A.; Falcon-Perez, J.M.; et al. EV-associated miRNAs from pleural lavage as potential diagnostic biomarkers in lung cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Wang, X.; Jiang, X.; Li, J.; Wang, J.; Binang, H.; Shi, S.; Duan, W.; Zhao, Y.; Zhang, Y. Serum exosomal miR-1269a serves as a diagnostic marker and plays an oncogenic role in non-small cell lung cancer. *Thorac. Cancer* **2020**, *11*, 3436–3447. [[CrossRef](#)]
104. Whiteside, T.L. Validation of plasma-derived small extracellular vesicles as cancer biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 719–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Chung, C.C.; Huang, P.H.; Chan, L.; Chen, J.H.; Chien, L.N.; Hong, C.T. Plasma Exosomal Brain-Derived Neurotrophic Factor Correlated with the Postural Instability and Gait Disturbance-Related Motor Symptoms in Patients with Parkinson’s Disease. *Diagnostics* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
106. Galardi, A.; Colletti, M.; Lavarello, C.; Di Paolo, V.; Mascio, P.; Russo, I.; Cozza, R.; Romano, A.; Valente, P.; De Vito, R.; et al. Proteomic Profiling of Retinoblastoma-Derived Exosomes Reveals Potential Biomarkers of Vitreous Seeding. *Cancers* **2020**, *12*. [[CrossRef](#)]
107. Zhang, Z.; Zhang, L.; Yu, G.; Sun, Z.; Wang, T.; Tian, X.; Duan, X.; Zhang, C. Exosomal miR-1246 and miR-155 as predictive and prognostic biomarkers for trastuzumab-based therapy resistance in HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, *86*, 761–772. [[CrossRef](#)]
108. Muraoka, S.; Jedrychowski, M.P.; Yanamandra, K.; Ikezu, S.; Gygi, S.P.; Ikezu, T. Proteomic Profiling of Extracellular Vesicles Derived from Cerebrospinal Fluid of Alzheimer’s Disease Patients: A Pilot Study. *Cells* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]
109. Zhou, R.; Wang, L.; Zhao, G.; Chen, D.; Song, X.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Yuan, H. Circulating exosomal microRNAs as emerging non-invasive clinical biomarkers in heart failure: Mega bio-roles of a nano bio-particle. *IUBMB Life* **2020**, *72*, 2546–2562. [[CrossRef](#)]

4. Podsumowanie i wnioski

Dane literaturowe wskazują na istotną rolę zmian aktywności układu odpornościowego w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. W oparciu o przegląd literatury powstała praca pogładowa pt. *„Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis”*, opisująca aktywność poszczególnych składowych układu odpornościowego oraz zaburzeń w błonie śluzowej wyściełającej jamy nosa i zatoki przynosowe w przebiegu choroby. Dokonana w pracy analiza literatury wykazała udział poszczególnych populacji komórek immunologicznych w rozwoju przewlekłego stanu zapalnego oraz obecność zmian strukturalnych i funkcjonalnych jakie mają miejsce w nabłonku górnych dróg oddechowych. Zwrócono także uwagę na szczególną rolę ścieżek TGF β /Smad i HMGB1/RAGE, które zaangażowane są w przebudowę tkanki towarzyszącą PZZP.

W związku z tym, że etiopatogeneza PZZP oraz profil molekularny poszczególnych endotypów choroby pozostają nadal słabo poznane, a najnowsze doniesienia naukowe podkreślają znaczącą rolę małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, tzw. egzosomów, w patogenezie licznych chorób, w kolejnej pracy pogładowej pt. *„The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases”* przeprowadzony został przegląd literatury, którego celem była ocena znaczenia pęcherzyków w chorobach górnych dróg oddechowych związanych z przewlekłym stanem zapalnym, ze szczególnym uwzględnieniem PZZP. W artykule opisano biogenezę powstawania egzosomów, rodzaje transportowanego przez nie ładunku molekularnego oraz ich funkcje w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Szczególną uwagę skoncentrowano na przedstawieniu badań pokazujących rolę egzosomów w patogenezie PZZP oraz innych schorzeń górnych dróg oddechowych, a także wskazaniu ich potencjału do zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych w przyszłości. W pracy zostały zawarte także nasze wstępne, nieopublikowane analizy dotyczące izolacji i charakterystyki markerów egzosomów z osocza pacjentów z PZZP.

Jak wskazały liczne doniesienia naukowe, w patogenezie PZZP szczególną rolę odgrywają egzosomy wydzielane przez nabłonek górnych dróg oddechowych. Wiele badań wykazało, że

pęcherzyki stanowią odzwierciedlenie produkujących je komórek. Zatem ocena ekspresji wybranych antygenów w tkankach pacjentów z PZZP, a następnie w izolowanych z popłuczyn jam nosa lub osocza pęcherzyków, może pozwolić na identyfikację nowych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę oraz posłużyć do opracowania biomarkerów choroby pozwalających na jej łatwiejszą diagnostykę oraz leczenie. To skłoniło nas do oceny ekspresji wybranych antygenów w nabłonku oddechowym pacjentów, co zostało opisane w kolejnej pracy pt. „*Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSSNP)*”. Celem badań była ocena ekspresji w nabłonku oddechowym cząstek TGFβ1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy. Do badań wykorzystano tkanki pobrane od pacjentów poddawanych Funkcjonalnym Endoskopowym Operacjom Zatok Przynosowych (FESS) oraz pacjentów operowanych z przyczyn innych niż PZZP (głównie septoplastyki) stanowiących grupę kontrolną. Analiza immunohistochemiczna wykazała dodatnią ekspresję TGFβ1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy w nabłonku oddechowym oraz naciekach zapalnych zlokalizowanych w warstwie podnabłonkowej u pacjentów ze wszystkich trzech grup: PZZPbP, PZZPzP i grupy kontrolnej. Poziom ekspresji Smad2 był wyższy w przypadku pacjentów z PZZPbP niż PZZPzP i kontrolnych, pSmad3 i TGFβ1 wyższy u PZZPzP niż kontrolnych, natomiast poziom CNPazy był niższy u pacjentów PZZPbP niż kontrolnych. Dodatkowo, zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją CNPazy i TGFβ1 u pacjentów PZZPbP, co skłoniło nas do wykonania barwienia immunofluorescencyjnego, w którym zauważyliśmy kolokalizację obu białek w obszarze nabłonka. Uzyskane wyniki sugerują możliwe współdziałanie ścieżki TGFβ1 i CNPazy nieopisane do tej pory w przypadku patogenezы PZZP. Co więcej, zgodnie z naszą wiedzą jako pierwsi wykazaliśmy ekspresję CNPazy w nabłonku górnych dróg oddechowych pochodzącym z zatok przynosowych. Dodatkowo, wcześniej przeprowadzone badania sugerują rolę CNPazy w regulacji stężenia małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [80], które jak opisaliśmy w naszej pracy poglądowej odgrywają istotną rolę w patogenezie PZZP.

W naszych badaniach zaobserwowaliśmy także podwyższony poziom obecnych we krwi eozynofili u pacjentów z polipami w porównaniu do grupy kontrolnej oraz jego pozytywną

korelację z TGFβ1. Poziom eozyfilii we krwi korelował także dodatnio z poziomem ekspresji nabłonkowej CNPazy zarówno w przypadku PZZPzP, jak i PZZPbP.

Analiza statystyczna wykazała również korelacje pomiędzy nabłonkową ekspresją TGFβ1, Smad2 i pSmad3, a wybranymi symptomami PZZP, co może sugerować ich ważną rolę w przebudowanie tkanki i znalazło także istotne statystycznie przełożenie w samopoczuciu pacjentów.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały pozytywną ekspresję TGFβ1, Smad2, pSmad3 oraz CNPazy w nabłonku oddechowym pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok oraz grupy kontrolnej, jednak zaobserwowano statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji poszczególnych antygenów pomiędzy grupami pacjentów, co pozwala wnioskować ich możliwe odmienne zaangażowanie w poszczególnych endotypach choroby. Ponadto jako pierwsi wykazaliśmy obecność CNPazy w nabłonku pochodzącym od pacjentów z PZZP oraz jej możliwe współdziałanie z TGFβ1, co sugeruje istnienie niepoznanej dotąd ścieżki molekularnej zaangażowanej w patogenezę choroby. Istotny jest także fakt, iż CNPaza, może przyczyniać się do regulacji wydzielania egzozymów, których funkcjonowanie ma ogromne znaczenie dla aktywności komórek układu odpornościowego i komórek budujących wyściełającą zatoki przynosowe błonę śluzową. Biorąc pod uwagę doniesienia wskazujące, że egzosomy odzwierciedlają aktywność wydzielających je komórek, w kolejnych etapach badań warto będzie ocenić przenoszony przez nie ładunek molekularny i jego powiązanie z nabłonkową ekspresją ocenianych przez nas w tej pracy antygenów. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania mogą otworzyć ścieżkę do odkrycia niepoznanych dotąd mechanizmów patogenezы choroby, ustalenia specyficznych dla danego endotypu biomarkerów i w przyszłości skuteczniejszych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych.

Próba znalezienia nowych biomarkerów PZZP była jednym z celów badań w ramach przedstawionej dysertacji. Odnalezienie nowych biomarkerów choroby odwzorowujących molekularny profil danego typu PZZP jest niezwykle ważne ze względu na potrzebę opracowania metod diagnostycznych pozwalających na specyficzne, szybkie, efektywne, szeroko dostępne zdiagnozowanie poszczególnych typów choroby umożliwiające ukierunkowanie leczenia pacjentów. Nowe biomarkery poszczególnych typów PZZP mogą także stanowić punkt uchwytu

dla opracowania nowych terapii mających na celu przywrócenie prawidłowego funkcjonowania zatok przynosowych lub zapobieganie nawrotom choroby i konieczności ponownych operacji. Wyniki przedstawionych badań pokazujące różnicę w ekspresji poszczególnych antygenów pomiędzy typami PZZP lub w odniesieniu do grupy kontrolnej mogą z jednej strony otworzyć ścieżkę do poznania nowych mechanizmów patogenezy choroby, z drugiej stanowić potencjalne biomarkery do zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych. Co istotne, podwyższony poziom eozynofilii we krwi pacjentów z PZZPzP oraz ich korelacja z nabłonkową ekspresją TGF β 1 i CNPazy może mieć także znaczenie prognostyczne oraz przyczynić się do ulepszenia obecnie obowiązujących kryteriów włączenia pacjentów do leczenia biologicznego, gdzie jednym z istotnych czynników branych pod uwagę jest eozynofilia. W celu potwierdzenia potencjalnej możliwości zastosowania uzyskanych wyników dotyczących badanych antygenów jako biomarkerów choroby, należy przeprowadzić analizę z włączeniem znacząco większej ilości chorych oraz pacjentów stanowiących grupę kontrolną. Do badania przedstawionego w ramach niniejszej pracy włączeni zostali pacjenci poddawani pierwszorazowo operacji FESS. Bazując na danych literaturowych oraz przeprowadzonych w ramach badań obserwacyjnych, warto byłoby przeprowadzić analizy ekspresji antygenów także w tkankach pobieranych od pacjentów operowanych ponownie z powodu nawrotu choroby, co dałoby szansę na uchwycenie nowych biomarkerów wspomagających również monitorowanie i prognozowanie przebiegu choroby oraz jej nawrotowości przyczyniając się do przełożenia na skuteczniejsze leczenie PZZP, a co najważniejsze ostatecznie poprawie zdrowia i jakości życia pacjentów.

5. Opinia Komisji Bioetycznej



CENTRUM MEDYCZNE KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO
ul. Marymoncka 99/103, 01 - 813 Warszawa

KOMISJA BIOETYCZNA

Tel.: + (48) 22 56 01 066

www.cmkp.edu.pl

komisja.bioetyczna@cmkp.edu.pl

Uchwała Komisji Bioetycznej nr 50/PB/2019

z dnia 10 Kw. 2019

Komisja Bioetyczna przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego powołana przez Dyrektora Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego Zarządzeniem nr 116/2018 z dnia 10.09.2018r. zapoznała się z wnioskiem o wyrażenie opinii o projekcie eksperymentu medycznego/badania klinicznego:

pt: „Ocena ekspresji wybranych receptorów odporności wrodzonej na komórkach nabłonka oddechowego jamy nosa w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych z polipami lub bez polipów”

zgłoszonym przez głównego badacza:

lek. Katarzynę Czerwatę

miejsce przeprowadzenia badania:

Klinika Otolaryngologii CMKP

Mazowiecki Szpital Bródnowski Sp. z o. o.

Bródnowskie Centrum Kliniczne

ul. Kondratowicza 8, 03-242 Warszawa

Po zapoznaniu się z całością dokumentacji Komisja Bioetyczna działając zgodnie z art. 29 ust. 2, 2a ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U z 2019r., poz. 537) i § 6 rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480) oraz zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej GCP:

- wyraziła **pozytywną opinię*** o **rozpoczęciu** eksperymentu medycznego/badania klinicznego zgodnie z przedstawionym wnioskiem, o którym stanowi Załącznik nr 1 do niniejszej uchwały.

- odrzuciła wniosek* z powodu:

(* - niepotrzebne skreślić)

Data

PRZEWODNICZĄCA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego

prof. dr hab. n. med. Ewa Marciniowska-Suchowińska

10 Kw. 2019

6. Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład

Warszawa, 05.11.2024 r.

Mgr Katarzyna Piszczatowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analiza i interpretacja danych doświadczalnych, redakcja manuskryptu, wizualizacje danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40%.


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 05.11.2024 r.

Mgr Katarzyna Piszczatowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pisanie oryginalnej wersji artykułu, edytowanie i wizualizacje.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40%.


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 05.11.2024 r.

Mgr Katarzyna Piszczałowska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przegląd literatury, przygotowanie grafik i edycja tekstu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30%.


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 05.11.2024 r.

Dr hab. n.med. Mirosław Szczepański

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konceptualizacja badań, udział w przygotowaniu metodologii badań, walidacja, analiza formalna, przeprowadzenie badań, analiza danych, zbieranie materiału klinicznego, pisanie i edytowanie manuskryptu, wizualizacje, nadzór, administracja i finansowanie projektu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstanie publikacji określam jako 40%,

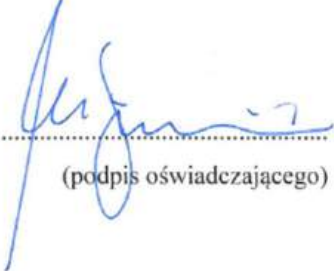
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizacje danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 05.11.2024 r.

Dr hab. n.med. Mirosław Szczepański

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji, pisanie i edytowanie manuskryptu, wizualizacje, praca nad sprawami administracyjnymi, nadzorczymi i finansowymi związanymi z przygotowaniem artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie oryginalnej wersji artykułu, edytowanie, wizualizacje.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 05.11.2024 r.

Dr hab. n.med. Mirosław Szczepański

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji, pisanie i edytowanie manuskryptu, analizę formalną oraz nadzór nad przygotowaniem artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 30%.


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przegląd literatury, przygotowywanie grafik oraz edycję tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Lek. Katarzyna Czerwaty

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie materiału i danych klinicznych, walidacja i analiza danych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 12%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizację danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Katarzyna Czerwaty.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Lek. Katarzyna Czerwaty

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przegląd literatury i przygotowanie części grafik.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 7%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%,

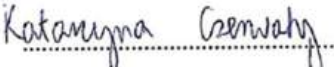
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie oryginalnej wersji artykułu, edytowanie, wizualizacje.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Lek. Katarzyna Czerwaty

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pisanie i redakcję manuskryptu oraz przygotowywanie ostatecznej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstanie publikacji określam jako 30%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przegląd literatury, przygotowywanie grafik oraz edycję tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Katarzyna Czerwaty.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warsaw, 07.11.2024

Dr Nils Ludwig

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pisanie manuskryptu, analiza formalna i walidacja.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizacje danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

STATEMENT

As the Co-Author of the publication: „ Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” I declare my substantive contribution to the preparation, conduction and describe of research and presenting study in the article concerned: writing manuscript, formal analysis and validation.

My percentage contribution in the article preparation I estimate 4%.

Contribution of Katarzyna Piszczatowska in the creation of publication I estimate as 40%,

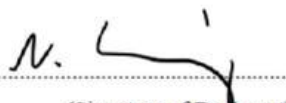
(name and surname of the PhD candidate)

And it include: participation in the methodology preparation, research conduction, data analysis and interpretation, manuscript redaction, visualization, administration and partially funding.

(substantive description of the candidate contribution to the article)*

At the same time, I consent to the use of above-mentioned publication as the part of the PhD dissertation of Katarzyna Piszczatowska, MSc.

(name and surname of the PhD candidate)


.....
(Signature of Declarant)

*in particular contribution to the preparation of concept, methodology, realization, interpretation of results

Warsaw, 07.11.2024

Dr Nils Ludwig

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pisanie oryginalnej wersji artykułu i edytowanie.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie oryginalnej wersji artykułu, edytowanie, wizualizacje.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

STATEMENT

As the Co-Author of the publication: „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” I declare my substantive contribution to the preparation, conduction and describe of research and presenting study in the article concerned: writing of the original manuscript and edition.

My percentage contribution in the article preparation I estimate 10%.

Contribution of Katarzyna Piszczatowska in the creation of publication I estimate as 40%.

(name and surname of the PhD candidate)

and it include: writing of the original manuscript, edition and visualization.

(substantive description of the candidate contribution to the article)*

At the same time, I consent to the use of above-mentioned publication as the part of the PhD dissertation of Katarzyna Piszczatowska, MSc.

(name and surname of the PhD candidate)



(Signature of Declarant)

*in particular contribution to the preparation of concept, methodology, realization, interpretation of results

Warsaw, 07.11.2024

Dr Nils Ludwig

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: praca nad koncepcją artykułu, pisanie i edytowanie manuskryptu oraz analiza formalna.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 30%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przegląd literatury, przygotowanie grafik i edycję tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

STATEMENT

As the Co-Author of the publication: „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” I declare my substantive contribution to the preparation, conduction and describe of research and presenting study in the article concerned: conception of article, writing and editing of the original manuscript, formal analysis.

My percentage contribution in the article preparation I estimate 5%.

Contribution of Katarzyna Piszczatowska in the creation of publication I estimate as 30%.

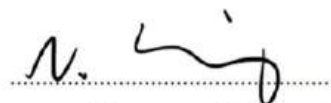
(name and surname of the PhD candidate)

and it include: literature review, graphics preparation and text edition.

(substantive description of the candidate contribution to the article)*

At the same time, I consent to the use of above-mentioned publication as the part of the PhD dissertation of Katarzyna Piszczatowska, MSc.

(name and surname of the PhD candidate)



(Signature of Declarant)

*in particular contribution to the preparation of concept, methodology, realization, interpretation of results

Warszawa, 13.11.2024 r.

... Natalia Jermakow

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRS_{sw}NP) and without Nasal Polyps (CRS_{np})” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza statystyczna i walidacja.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 8%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizacje danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Dr hab. n. med. Karolina Dżaman, Prof. CMKP

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie materiału i danych klinicznych oraz walidację.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%.

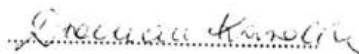
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizacje danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Dr hab. n. med. Karolina Dżaman, Prof. CMKP

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: praca nad koncepcją artykułu, pisanie i edytowanie oryginalnej wersji publikacji, analiza formalna oraz sprawy administracyjne i finansowe.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 30%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przegląd literatury, przygotowywanie grafik oraz edycję tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....*Karolina Dżaman*.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 07.11.2024 r.

Dr n.med. Anna M. Cyran

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pomoc w przygotowaniu oryginalnej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%,


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie oryginalnej wersji artykułu, edytowanie, wizualizacje.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 15.11.2024 r.

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Kantor

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie materiału i danych klinicznych oraz walidację.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstanie publikacji określam jako 40%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analizę i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizację danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

dr hab. n. med. Ireneusz Kantor
specjalista chorób wewnętrznych
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i
Diagnostyki Laboratoryjnej
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Lek. Jacek Brzost

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Evaluation of CNPase and TGFβ1/Smad Signalling Pathway Molecule Expression in Sinus Epithelial Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis with (CRSwNP) and without Nasal Polyps (CRSsNP)” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: walidację danych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przygotowaniu metodologii badań, przeprowadzenie badań, analiza i interpretację danych doświadczalnych, redakcję manuskryptu, wizualizację danych, sprawy administracyjne związane z projektem, częściowe finansowanie.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Lek. Jacek Brzost

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pomoc w przygotowaniu oryginalnej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstawanie publikacji określam jako 40%,

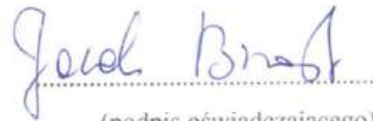
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie oryginalnej wersji artykułu, edytowanie, wizualizacje.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 13.11.2024 r.

Lek. Jacek Brzost

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pisanie oryginalnej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Katarzyny Piszczatowskiej w powstanie publikacji określam jako 30%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: przegląd literatury, przygotowywanie grafik oraz edycję tekstu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piszczatowskiej.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

7. Literatura:

1. Fokkens, W.J., et al., *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020*. Rhinology, 2020. **58**(Suppl S29): p. 1-464.
2. Carr, T.F., *Complications of sinusitis*. Am J Rhinol Allergy, 2016. **30**(4): p. 241-5.
3. DeConde, A.S., et al., *Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*. Laryngoscope, 2017. **127**(3): p. 550-555.
4. Wang, D.Y., et al., *Upper airway stem cells: understanding the nose and role for future cell therapy*. Curr Allergy Asthma Rep, 2015. **15**(1): p. 490.
5. Keir, J., *Why do we have paranasal sinuses?* J Laryngol Otol, 2009. **123**(1): p. 4-8.
6. Ha, J.G. and H.J. Cho, *Unraveling the Role of Epithelial Cells in the Development of Chronic Rhinosinusitis*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(18).
7. Leland, E.M., et al., *Environmental air pollution and chronic rhinosinusitis: A systematic review*. Laryngoscope Investig Otolaryngol, 2022. **7**(2): p. 349-360.
8. Peeters, S., et al., *Association between outdoor air pollution and chronic rhinosinusitis patient reported outcomes*. Environ Health, 2022. **21**(1): p. 134.
9. Shih, L.C., et al., *Chronic rhinosinusitis and premorbid autoimmune diseases: a population-based case-control study*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 18635.
10. Fokkens, W.J. and R.A. Scheeren, *Upper airway defence mechanisms*. Paediatr Respir Rev, 2000. **1**(4): p. 336-41.
11. Soyka, M.B., et al., *Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(5): p. 1087-1096 e10.
12. Huang, Z.Q., et al., *Updated epithelial barrier dysfunction in chronic rhinosinusitis: Targeting pathophysiology and treatment response of tight junctions*. Allergy, 2024. **79**(5): p. 1146-1165.
13. Psaltis, A.J., et al., *Unraveling the role of the microbiome in chronic rhinosinusitis*. J Allergy Clin Immunol, 2022. **149**(5): p. 1513-1521.
14. Hoggard, M., et al., *Evidence of microbiota dysbiosis in chronic rhinosinusitis*. Int Forum Allergy Rhinol, 2017. **7**(3): p. 230-239.
15. Liang, Y., et al., *Alterations of nasal microbiome in eosinophilic chronic rhinosinusitis*. J Allergy Clin Immunol, 2023. **151**(5): p. 1286-1295 e2.
16. Bankova, L.G. and N.A. Barrett, *Epithelial cell function and remodeling in nasal polyposis*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2020. **124**(4): p. 333-341.
17. Bae, C.H., et al., *Clusterin Induces MUC5AC Expression via Activation of NF-kappaB in Human Airway Epithelial Cells*. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2018. **11**(2): p. 124-132.
18. Gudis, D., K.Q. Zhao, and N.A. Cohen, *Acquired cilia dysfunction in chronic rhinosinusitis*. Am J Rhinol Allergy, 2012. **26**(1): p. 1-6.
19. Cho, D.Y., et al., *Expression of dual oxidases and secreted cytokines in chronic rhinosinusitis*. Int Forum Allergy Rhinol, 2013. **3**(5): p. 376-83.
20. Kim, D.K., et al., *The role of interleukin-33 in chronic rhinosinusitis*. Thorax, 2017. **72**(7): p. 635-645.
21. Johnston, L.K. and P.J. Bryce, *Understanding Interleukin 33 and Its Roles in Eosinophil Development*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 51.

22. Shin, H.W., et al., *IL-25 as a novel therapeutic target in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(6): p. 1476-85 e7.
23. Liao, B., et al., *Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. Allergy, 2015. **70**(9): p. 1169-80.
24. Park, S.K., et al., *IL-25-induced activation of nasal fibroblast and its association with the remodeling of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0181806.
25. Boita, M., et al., *Release of Type 2 Cytokines by Epithelial Cells of Nasal Polyps*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 2643297.
26. Soyka, M.B., et al., *The Induction of IL-33 in the Sinus Epithelium and Its Influence on T-Helper Cell Responses*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0123163.
27. Kohanski, M.A., et al., *Solitary chemosensory cells are a primary epithelial source of IL-25 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **142**(2): p. 460-469 e7.
28. Kohanski, M.A., et al., *Bitter taste receptor agonists regulate epithelial two-pore potassium channels via cAMP signaling*. Respir Res, 2021. **22**(1): p. 31.
29. Parker, D. and A. Prince, *Innate immunity in the respiratory epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(2): p. 189-201.
30. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
31. Vareille, M., et al., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 210-29.
32. Kato, A., *Immunopathology of chronic rhinosinusitis*. Allergol Int, 2015. **64**(2): p. 121-30.
33. Iwasaki, N., et al., *Single cell RNA sequencing of human eosinophils from nasal polyps reveals eosinophil heterogeneity in chronic rhinosinusitis tissue*. J Allergy Clin Immunol, 2024.
34. Bachert, C., et al., *Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps: Treatment efficacy by comorbidity and blood eosinophil count*. J Allergy Clin Immunol, 2022. **149**(5): p. 1711-1721 e6.
35. Tsuda, T., et al., *Eosinophil-derived neurotoxin enhances airway remodeling in eosinophilic chronic rhinosinusitis and correlates with disease severity*. Int Immunol, 2019. **31**(1): p. 33-40.
36. Huang, X., et al., *Association of mucus eosinophil-derived neurotoxin levels with disease control status in patients with chronic rhinosinusitis*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2024. **281**(8): p. 4191-4199.
37. Czerwaty, K., et al., *Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis*. Diagnostics (Basel), 2022. **12**(10).
38. Vickery, T.W., V.R. Ramakrishnan, and J.D. Suh, *The Role of Staphylococcus aureus in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis*. Curr Allergy Asthma Rep, 2019. **19**(4): p. 21.
39. Shaghayegh, G., et al., *Chronic Rhinosinusitis, S. aureus Biofilm and Secreted Products, Inflammatory Responses, and Disease Severity*. Biomedicines, 2022. **10**(6).
40. Schleimer, R.P., *Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis*. Annu Rev Pathol, 2017. **12**: p. 331-357.
41. Kuhar, H.N., et al., *Inflammatory infiltrate and mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis with and without polyps: structured histopathologic analysis*. Int Forum Allergy Rhinol, 2017. **7**(7): p. 679-689.

42. Hirshoren, N., et al., *Angiogenesis in chronic rhinosinusitis with nasal polyps and in antrochoanal polyps*. *Inflamm Res*, 2011. **60**(4): p. 321-7.
43. Saitoh, T., et al., *Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis*. *Rhinology*, 2009. **47**(3): p. 275-279.
44. Zhang, M., et al., *Hypoxia disrupts the nasal epithelial barrier by inhibiting PTPN2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Int Immunopharmacol*, 2023. **118**: p. 110054.
45. Stevens, W.W., et al., *Chronic rhinosinusitis pathogenesis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2015. **136**(6): p. 1442-1453.
46. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 178-96.
47. Moon, Y.M., et al., *Nox4 mediates hypoxia-stimulated myofibroblast differentiation in nasal polyp-derived fibroblasts*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012. **159**(4): p. 399-409.
48. Gupta, R., et al., *Intercellular Communication between Airway Epithelial Cells Is Mediated by Exosome-Like Vesicles*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019. **60**(2): p. 209-220.
49. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. **30**: p. 255-89.
50. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. *J Extracell Vesicles*, 2024. **13**(2): p. e12404.
51. Nocera, A.L., et al., *Exosomes mediate interepithelial transfer of functional P-glycoprotein in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Laryngoscope*, 2017. **127**(9): p. E295-E300.
52. Nocera, A.L., et al., *Exosome swarms eliminate airway pathogens and provide passive epithelial immunoprotection through nitric oxide*. *J Allergy Clin Immunol*, 2018.
53. Miyake, M.M., et al., *Discriminant analysis followed by unsupervised cluster analysis including exosomal cystatins predict presence of chronic rhinosinusitis, phenotype, and disease severity*. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2019. **9**(9): p. 1069-1076.
54. Mueller, S.K., *Exosomes and chronic rhinosinusitis*. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2018. **4**(3): p. 175-178.
55. Mueller, S.K., et al., *Noninvasive exosomal proteomic biosignatures, including cystatin SN, peroxiredoxin-5, and glycoprotein VI, accurately predict chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2019. **9**(2): p. 177-186.
56. Mueller, S.K., et al., *Highly multiplexed proteomic analysis reveals significant tissue and exosomal coagulation pathway derangement in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2018. **8**(12): p. 1438-1444.
57. Mueller, S.K., et al., *Significant polyomic and functional upregulation of the PAPP-A/IGFBP-4/5/IGF-1 axis in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2020.
58. Shenoy, G.N., et al., *Exosomes Represent an Immune Suppressive T Cell Checkpoint in Human Chronic Inflammatory Microenvironments*. *Immunol Invest*, 2020: p. 1-18.
59. Zhou, M., et al., *Proteomics profiling of epithelium-derived exosomes from nasal polyps revealed signaling functions affecting cellular proliferation*. *Respir Med*, 2020. **162**: p. 105871.
60. Piszczatowska, K., et al., *The Emerging Role of Small Extracellular Vesicles in Inflammatory Airway Diseases*. *Diagnostics (Basel)*, 2021. **11**(2).

61. Zhang, Y., et al., *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential*. Cell Biosci, 2019. **9**: p. 19.
62. Gluszko, A., et al., *Small Extracellular Vesicles from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Carry a Proteomic Signature for Tumor Hypoxia*. Cancers (Basel), 2021. **13**(16).
63. Whiteside, T.L., *Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Tumor-Induced Immune Suppression*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
64. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono, *TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(5).
65. Deng, Z., et al., *TGF-beta signaling in health, disease, and therapeutics*. Signal Transduct Target Ther, 2024. **9**(1): p. 61.
66. Breuss, J.M., et al., *Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2241-51.
67. Cheifetz, S., et al., *Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20533-8.
68. Lai, L.Y.S., et al., *SMAD proteins: Mediators of diverse outcomes during infection*. Eur J Cell Biol, 2022. **101**(2): p. 151204.
69. Kim, H.J., et al., *TGF-beta1-induced HSP47 regulates extracellular matrix accumulation via Smad2/3 signaling pathways in nasal fibroblasts*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 15563.
70. Shieh, J.M., et al., *TGFbeta mediates collagen production in human CRSsNP nasal mucosa-derived fibroblasts through Smad2/3-dependent pathway and CTGF induction and secretion*. J Cell Physiol, 2019. **234**(7): p. 10489-10499.
71. Nakayama, T., et al., *Inflammatory molecular endotypes of nasal polyps derived from White and Japanese populations*. J Allergy Clin Immunol, 2022. **149**(4): p. 1296-1308 e6.
72. Wang, Q.P., et al., *Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor-beta is involved in the pathogenesis of nasal polyps*. Laryngoscope, 1997. **107**(7): p. 926-31.
73. Pacini, E.S.A., et al., *Extracellular cAMP-Adenosine Pathway Signaling: A Potential Therapeutic Target in Chronic Inflammatory Airway Diseases*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 866097.
74. Jackson, E.K., J. Ren, and Z. Mi, *Extracellular 2',3'-cAMP is a source of adenosine*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33097-106.
75. Jackson, E.K., et al., *Role of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the renal 2',3'-cAMP-adenosine pathway*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(1): p. F14-24.
76. Li, Y., Y. Zhao, and Y. Wang, *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase contributes to epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through the notch signalling pathway*. Cell Prolif, 2019. **52**(6): p. e12707.
77. Bifulco, M., et al., *2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 1807-12.
78. Vasiukov, G., et al., *Adenosine/TGFbeta axis in regulation of mammary fibroblast functions*. PLoS One, 2021. **16**(6): p. e0252424.
79. Vasiukov, G., et al., *Myeloid Cell-Derived TGFbeta Signaling Regulates ECM Deposition in Mammary Carcinoma via Adenosine-Dependent Mechanisms*. Cancer Res, 2020. **80**(12): p. 2628-2638.

80. Ludwig, N., et al., *Simultaneous Inhibition of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Triggers a Multi-Fold Increase in Secretion of Exosomes: Possible Role of 2'3'-cAMP*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 6948.
81. Wynne, M., et al., *Contribution of Epithelial Cell Dysfunction to the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps*. *Am J Rhinol Allergy*, 2019. **33**(6): p. 782-790.
82. Wang, Y., Z. Li, and J. Lu, *Single-cell RNA sequencing reveals the epithelial cell, fibroblast, and key gene alterations in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *Sci Rep*, 2024. **14**(1): p. 2270.
83. Richer, S.L., et al., *Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps*. *Am J Rhinol*, 2008. **22**(3): p. 228-34.
84. Kim, K.K., D. Sheppard, and H.A. Chapman, *TGF-beta1 Signaling and Tissue Fibrosis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(4).
85. Halwani, R., et al., *Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **44**(2): p. 127-33.
86. Van Bruaene, N., et al., *TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **124**(2): p. 253-9, 259 e1-2.
87. Ohwada, K., et al., *Effects of HMGB1 on Tricellular Tight Junctions via TGF-beta Signaling in Human Nasal Epithelial Cells*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).