

UZORKOVANJE NOSNOG SEKRETA ZA ISPITIVANJE PROTOČNOM CITOMETRIJOM U ZAPALJENSKIM BOLESTIMA NOSA I PARANAZALNIH SINUSA

Aleksandar Perić¹, Danilo Vojvodić², Milanko Milojević¹, Nenad Mladenović¹, Aleksandar Vujović³,
Snežana Živančević Simonović⁴

¹Klinika za otorinolaringologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

²Institut za medicinska istraživanja, Odeljenje kliničke i eksperimentalne imunologije, Vojnomedicinska akademija, Beograd

³Bolnica za bolesti uva, nosa i grla, Kliničko-bolnički centar „Dr Dragiša Mišović“, Beograd

⁴Institut za patološku fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac

SAMPLING OF NASAL SECRETIONS FOR FLOW-CYTOMETRIC ANALYSIS IN INFLAMMATORY DISEASES OF THE NOSE AND PARANASAL SINUSES

Aleksandar Perić¹, Danilo Vojvodić², Milanko Milojević¹, Nenad Mladenović¹, Aleksandar Vujović³,
Snežana Živančević-Simonović⁴

¹Department of Otorhinolaryngology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

²Institute for Medical Research, Division of Clinical and Experimental Immunology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

³Ear, Nose and Throat Hospital, Clinical Hospital Center “Dr Dragisa Misovic”, Belgrade, Serbia

⁴Institute for Pathological Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

SAŽETAK

Nosni sekret predstavlja prvu liniju odbrane sluzokože nosa i paranazalnih sinusa. U njemu epitelne ćelije i leukociti ispoljavaju svoje odbrambene mehanizme, zajedno sa mukocilijarnim transportom i medijatorima zapaljenskog i imunskog odgovora. Cilj ovog preglednog rada bio je upoznavanje sa svim do sada primenjivanim tehnikama za uzorkovanje nosnog sekreta. Opisane su aspiracione, apsorpcione i dilucione tehnike za prikupljanje uzoraka nosnog sekreta. Takođe, navedena su ograničenja svake od navedenih grupa tehnika. Posebna pažnja je posvećena, danas najčešće korišćenoj, apsorpcionoj metodi, uključujući njene prednosti i nedostatke. U nastavku je opisana i tehnika pripreme uzoraka za merenje koncentracija medijatora zapaljenske reakcije, kao i u poslednje vreme najčešće korišćena metoda, ispitivanje većeg broja medijatora u istom uzorku, zasnovano na protočnoj citometriji. Ispitivanje sastava nosnog sekreta može nam pružiti dragocene podatke o stanju zapaljenja sluzokože nosa / paranazalnih sinusa, kao i o evoluciji sinusne bolesti.

Ključne reči: nos; paranazalni sinusi; tečnosti i sekreti; medijatori inflamacije; protočna citometrija.

UVOD

Sakupljanje uzoraka sekreta i tkiva sluzokože iz nosa i paranazalnih šupljina izuzetno je važno za proučavanje i praćenje složenih patofizioloških mehanizama, koji su u osnovi različitih zapaljenskih i drugih bolesti gornjih disajnih puteva. Alergijski rinitis (AR), nealergijski rinitis sa eozinofilnim sindromom (NARES), akutni i hronični rinosinuzitis, kao i nosna polipoza najčešće su zapaljenske bolesti sluzokože nosa i paranazalnih sinusa (1). Hronični rinosinuzitis, alergijski rinitis i nosna polipoza često mogu

ABSTRACT

Nasal secretions represent the first line of defense medium, in which the leucocytes probably act as an efficient part of the defense mechanism along with the mucociliary transport system and the biochemical properties of the mucus. The aim of this review article is to introduce all techniques for nasal secretion sampling used up to now. We described aspiration, absorption, and dilution techniques for nasal fluid collection. We, also, noted all limitations of these techniques. We especially described absorption technique with its advantages and limitations. Furthermore, we described a technique for nasal fluid samples preparation and for inflammatory mediator measurement – flow cytometry bead-based multiple analyte detection. Nasal secretion content reflects the inflammatory status of the nasal/paranasal sinuses mucosa and the evolution of mucosal disease.

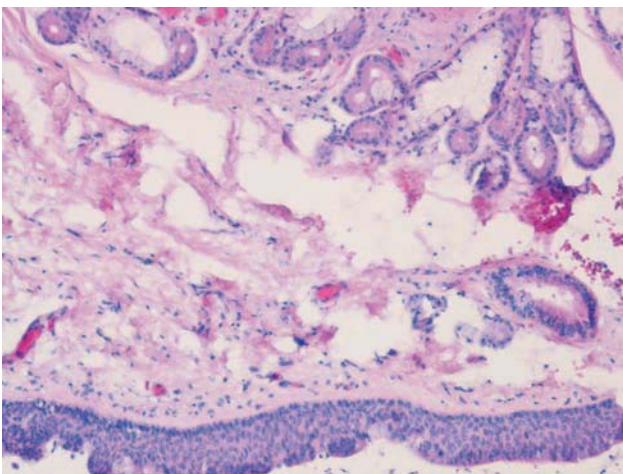
Key words: nose; paranasal sinuses; fluids and secretions; inflammation mediators; flow cytometry.

biti udruženi s bronhijalnom astmom (2) i preosetljivošću na nesteroidne antiinflamatorne analgetike, što znatno komplikuje dijagnostiku i lečenje bolesti. Zapaljenja gornjih respiratornih puteva su veoma česta, a njihova dijagnoza bazira se na anamnestičkim podacima, kliničkom pregledu (prednjoj i zadnjoj rinoskopiji i endoskopiji nosne šupljine), testiranju na alergije, radiološkim nalazima, funkcionalnim testovima (rinomanometriji, akustičkoj rinometriji, olfaktometriji, proučavanju maksimalnog protoka vazduha pri nosnom udahu – *peak nasal inspiratory flow*), merenju koncentracije azot-oksida (NO) u šupljini nosa i u izdahnutom vazduhu, kao i na citološkom nalazu (1, 3, 4). Međutim, diferencijalna dijagnoza hroničnih zapaljenja gornjih disajnih puteva često je veoma teška.

Koncentracije medijatora zapaljenske reakcije mogu se određivati direktno u homogenizatu uzoraka tkiva sluzokože nosa ili paranazalnih sinusa. Van Crombruggen i sar. (5), na osnovu razlike u koncentracijama citokina izmerenim u sluzokoži nosne šupljine i paranazalnih sinusa, napravili su model za jasnu distinkciju ovih bolesti. Nedostatak ove tehnike je njena veoma visoka cena. S druge strane, biohemijske i imunološke analize nosnog sekreta mogu da pruže dodatne informacije o urođenim i stečenim imunskim mehanizmima, koji se odvijaju u nosnoj sluzokoži, kao i o imunomodulacijskim efektima primene različitih lekova. Kramer i sar. (1), jasno su pokazali da merenje koncentracija bioloških markera u nosnom sekretu daje dragocene podatke, kako za diferencijalnu dijagnozu ovih zapaljenja tako i za određivanje strategije lečenja ovih bolesti. Cilj ovog preglednog članka jeste upoznavanje sa do sada primenjivanim tehnikama uzorkovanja nosnog sekreta, s njihovim prednostima i nedostacima. U nastavku su ukratko opisane tehnike pripreme uzoraka za imunološke analize, kao i danas najviše primenjivana tehnika za merenje koncentracija medijatora zapaljenske reakcije i imunskog odgovora – protočna citometrija.

SASTAV NOSNOG SEKRETA

Nosni sekret predstavlja prvu liniju odbrane sluzokože nosa i paranazalnih sinusa u kojoj leukociti sa svojim produktima, a zajedno s mukocilijarnim transportom i biohemijskom zaštitom mukusa, imaju zaštitnu ulogu (6, 7). On predstavlja smešu transudata/eksudata krvne plazme, ćelija i mukusa, koji proizvode peharaste ćelije i seromukozne žlezde (slika 1) (6). Normalno se sastoji od tzv. gel i sol faze. Gel faza se nalazi na površini. Ona je gušća i žilavija, a sastoji se od mukopolisaharida koje luče žlezde, rastvorenih u transudatu krvne plazme u velikoj koncentraciji (8–10). Sol faza se nalazi ispod. Ona je



Slika 1. Deo nosne sluzokože sa seromukoznim žlezdama i pseudoslojevitim respiratornim epitelom (hematoksilin-eozin, x200).

znatno ređa i čini je transudat/eksudat krvne plazme sa znatno manje mukopolisaharida. U njoj su rastvoreni elektroliti i organske materije u takvim koncentracijama da se proces mukocilijarnog transporta neometano odvija (8–10).

Voda čini 95% sastava nosnog sekreta, organske materije (mukopolisaharidi, proteini i masti) čine 3%, a elektroliti preostalih 2% (11). Najveći deo proteinskog sastava čine albumini i imunoglobulini, između 45% i 80%. Dok albumini vode poreklo iz transudata/eksudata krvne plazme, imunoglobuline proizvode imunokompetentne ćelije-plazmociti (11). U proteine nosnog sekreta ubrajamo i tzv. zaštitne materije (lizozim, laktoferin, kalikrein), kao i medijatore imunskog odgovora i zapaljenske reakcije – citokine i hemokine (11, 12).

Prema vrsti ćelija koje ih primarno proizvode, citokine delimo na Th1 (T pomagačke 1) i Th2 (T pomagačke 2). U Th1 ubrajamo TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-2, IL-12, IFN- γ i druge. Među Th2 citokinima najvažniji su IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 (11). Vrlo je važno pomenuti i hemokine – medijatore sa snažnim hemotaksičnim svojstvima. Glavni hemokin za neutrofilne granulocite je IL-8, dok su glavni hemokini za eozinofile CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), CCL11 (eotaksin-1), CCL24 (eotaksin-2) i CCL26 (eotaksin-3) (12). Važno je pomenuti i enzime – indikatore funkcije granulocitnih ćelija, u koje ubrajamo eozinofilni katjonski protein (ECP), kao glavni indikator funkcije eozinofila, mijeloperoksidazu (MPO), kao glavni indikator funkcije neutrofila i triptazu (TRY), kao glavni indikator funkcije mastocita (1, 12).

Koncentracije proteina u nosnom sekretu znatno se povećavaju tokom akutnih i hroničnih zapaljenja sluzokože nosa i paranazalnih sinusa (1, 12). Novija istraživanja pokazala su da sastav nosnog sekreta verno odlikava stanje zapaljenja sluzokože nosa i paranazalnih sinusa i prati evoluciju zapaljenskih bolesti (1, 11, 12). S obzirom na to da citokini i hemokini imaju glavnu ulogu u složenim patofiziološkim mehanizmima u sluzokoži nosa, određivanje njihovih koncentracija u nosnom sekretu može nam omogućiti da lakše shvatimo komplikovane kaskadne procese koji su u osnovi zapaljenskih reakcija.

TEHNIKE ZA UZORKOVANJE NOSNOG SEKRETA

Do sada nije usvojena univerzalna (opšteprihvaćena) tehnika za uzorkovanje nosnog sekreta, pa se u literaturi pominje nekoliko metoda, koje su klasifikovane na sledeći način (1, 13):

- 1) uzorkovanje nosnog sekreta izduvavanjem nosa;
- 2) sukcijska vakuum pumpom i mikrosukcija;
- 3) apsorpcione tehnike;
- 4) dilucione tehnike.

1) Uzorkovanje nosnog sekreta izduvavanjem nosa

Ispitanik izduvava obe strane nosa pojedinačno u aluminijsku posudu. Sekret se prenosi u ependorf (Eppendorf) epruvetu i razređuje fosfatno puferisanim fiziološkim rastvorom u odnosu 1 : 1 (13).

2) Sukcione (aspiracione) tehnike

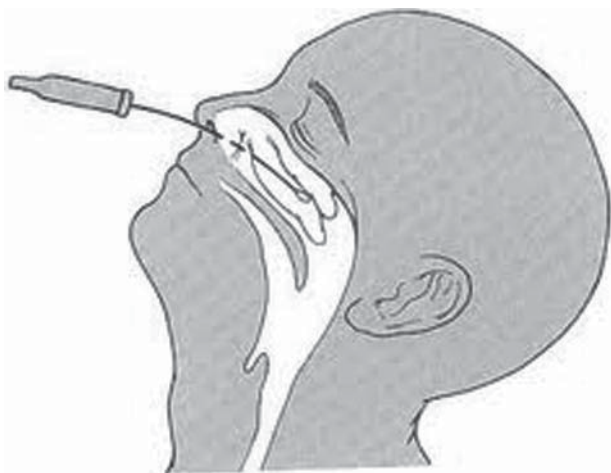
Sukcija vakuum pumpom. Sterilni ženski silikonski urinarni kateter uvodi se u donji nosni hodnik, a zatim se tokom 5 minuta sekret izvlači – aspirira vakuum pumpom, podešenom na pritisak od -0,2 bara (14).

Mikrosukcija. Standardna kapilarna staklena cevčica uvodi se u nosnu šupljinu i pomera po površini sluzokože donje nosne školjke, veoma pažljivo, kako se ova ne bi povredila. Nakon 10–15 minuta sakupljeni sekret izduva se u ependorf epruvetu i razređuje fosfatno puferisanim fiziološkim rastvorom u odnosu 1 : 1 (15).

3) Apsorpcione tehnike

Zasnivaju se na fenomenu kapilarne sukcije. Štapići od vate dužine oko 6 cm, a dijametra oko 1 cm, postavljaju se u srednji ili donji nosni hodnik bajonet-pincetom, tokom prednje rinoskopije, a uklanjaju se nakon 5 minuta (3, 16). Komadić filter-papira, dimenzija 14 x 14 mm postavlja se bajonet-pincetom tokom prednje rinoskopije u prostor između nosnog septuma i prednjeg pola donje nosne školjke, a uklanja nakon 10 minuta (17).

Modifikovana apsorpciona tehnika. Drveni štapić sa vatom na vrhu (deo sa vatom je dužine oko 10 mm, a širine oko 4 mm), tokom prednje rinoskopije postavlja se što bliže ili se drži u srednjem nosnom hodniku tokom 60 sekundi, koliko je potrebno da se komadić vate natopi nosnim sekretom (slika 2). Zatim se deo štapića sa vatom na vrhu odlomi i ubaci u ependorf epruvetu u kojoj se nalazi transfer-medijum (18–23).



Slika 2. Modifikovana apsorpciona tehnika za uzorkovanje nosnog sekreta: štapić sa vatom na vrhu je uveden u srednji nosni hodnik.

Primena „sakupljača nosnog sekreta“. Posebno pripremljeni listovi od poliuretanskog sundera se urolaju u cilindar, dijametra 12 mm, a dužine 24 mm. Tako oblikovan komadić sundera uvede se u prostor između nosnog septuma i donje nosne školjke. Nakon 5 minuta, on se uklanja iz nosa i uranja u ependorf epruvetu sa transfer-medijumom (24).

4) Dilucione tehnike

Zasnivaju se na principu razređivanja nosnog sekreta, kako bi se povećala količina uzetog uzorka. Ispiranje nosa pipetom. Ukupno 5 ml fiziološkog rastvora, temperature oko 37°C, unosi se u obe strane nosa pipetom, dok ispitanik drži glavu zabačenu do ugla od 45° u odnosu na horizontalnu ravan. Pri tome mu je nazofarinks okludiran mekim nepcem. Posle 10 sekundi, ispitanik menja položaj glave i izduvava ispirak nosnog sekreta u aluminijsku posudu. Ispirak se zatim unosi u ependorf epruvetu sa transfer-medijumom (25).

Ispiranje nosa sprejem. Isto kao u prethodnoj metodi, samo što se fiziološki rastvor u količini 3–5 ml unosi u nosnu šupljinu sprejem (26).

Ispiranje šupljine maksilarnog sinusa nakon donje antrostomije. Posle dezinfekcije nosnog vestibuluma i donjeg nosnog hodnika etanolom, u uslovima lokalne anestezije, sterilnim troakarom se u nivou donjeg nosnog hodnika napravi mali otvor (antrostoma) na medijalnom zidu maksilarnog sinusa. Kroz antrostomu se u šupljinu sinusa ubrizga 5 ml fiziološkog rastvora. Nakon 30 sekundi ispirak sinusa se vakuum-pumpom izvlači iz šupljine (27–29).

Ograničenja. Treba ponoviti da do danas ne postoji jedna standardizovana tehnika za uzorkovanje nosnog sekreta. Većina pomenutih tehnika imaju veće ili manje nedostatke. Tehnikom izduvavanja nosa, dobijamo veoma različite količine uzorka, što se odražava na kvalitet rezultata (13). Dakle, postoji problem validnosti i reproducibilnosti tehnike (13).

Sukcione i dilucione tehnike zahtevaju dobru saradnju ispitanika, što je teško postići kada su u pitanju deca, komatozne i mentalno retardirane osobe (14, 15, 25, 26). Osim toga, količina uzetog materijala može znatno da varira, što će se odraziti na rezultate merenja koncentracija proteina (14, 15, 25, 26). Moguće su povrede sluzokože nosa komadićima stakla ili vakuum-efektom. Kod donje antrostomije osnovni problem je invazivnost tehnike. Mada se uzimanje uzoraka radi u lokalnoj anesteziji, to može biti veoma neprijatno za ispitanika, ali i povezano sa komplikacijama kao što je npr. osteomijelitis maksile. Osnovni problem dilucionih tehnika jeste dobijanje razređenog materijala, pa iako koristimo najosetljivije metode merenja koncentracija medijatora, postoji problem njihove detektabilnosti (25, 26).

Prednosti i nedostaci apsorpcionih tehnika

Za razliku od ostalih, apsorpcionim tehnikama se može postići standardizovanost uzimanja materijala, što se odražava na validnost dobijenih rezultata. U uzorcima obično imamo visoke koncentracije medijatora zapaljenske reakcije i imunskog odgovora. Praktično se preslikava proteinski sastav sol faze nosnog sekreta. Konačno, veoma je mala verovatnoća da će doći do povrede sluzokože nosa. Ipak, jedna od studija pokazala je da je veća verovatnoća povrede sluzokože ukoliko koristimo filter papir nego komadiće vate (13). Razlozi za to su oblik i veličina celuloznih vlakana. Ona su u filter papiru kraća, oštrija i deblja, dok su pamučna vlakna vate veoma duga, nežna i tanka (13). Međutim, osnovni nedostatak apsorpcionih tehnika jeste problem koji se javlja prilikom uzimanja uzoraka zdravim ispitanicima. Kod njih je količina izlučenog sekreta često veoma mala. Taj problem se delimično može otkloniti primenom tzv. metaholinskog protokola (6). Metaholin se u koncentraciji od 15 mg/ml sprejem unosi u obe strane nosa do postizanja konačne doze od 6 mg. Uzorci nosnog sekreta se sakupljaju posle 3 minuta. Metaholin stimuliše žlezdanu sekreciju, pa na taj način možemo dobiti veću količinu uzorka. Međutim, ovde nedostaje onaj deo nosnog sekreta koji nastaje kao posledica eksudacije ili transudacije krvne plazme (6). Tako dobijeni sekret iz nosa nije kompletan, pa tako treba posmatrati i rezultate koji proističu iz merenja koncentracije medijatora.

MERENJE PROTOČNOM CITOMETRIJOM

Pošto se uzme uzorak nosnog sekreta, on se unosi u ependorf epruvetu u kojoj se nalazi 1 ml „transfer medijuma“ (18–23). To je fosfatno puferisani fiziološki rastvor sa 50 µg/ml gentamicina, 340 µg/ml penicilina G i 500 µg/ml fungizona, koji služe kao konzervansi i sprečavaju razmnožavanje bakterijskih i gljivičnih mikroorganizama u uzorku (18–23). U „transfer medijumu“ uzorak stoji minimalno 30 minuta, koliko je potrebno za difuziju citokina/hemokina iz uzorka sekreta, koji je hiperosmolalan u „transfer medijumu“, koji je hipoosmolalan. Zatim se sadržaj epruvete centrifugira tokom 10 minuta na 1.000 g, kako bi došlo do odvajanja supernatanta, u kome su difundovani citokini/hemokini, od taloga, u kome su delovi ćelija, kao i veliki molekuli proteina, masti i polisaharida (18–23). Posle odvajanja supernatanta, oni se zamrznu na -70°C i tako se čuvaju do detekcije medijatora (18–23). Pošto se uzorci nosnog sekreta odmrznu, vrši se priprema za merenje koncentracija citokina/hemokina na sledeći način (30,31):

1) Uzorci nosnog sekreta mešaju se sa komercijalnim flow citometrijskim kitom. Kit se sastoji od smeše perlica od polistirola, koje su obložene monoklonskim antitelom koje specifično reaguje sa odgovarajućim medijatorom koji se meri. Ukoliko je kit predviđen za

merenje koncentracije 11 različitih medijatora, znači da predstavlja smešu 11 subpopulacija perlica, od kojih je svaka subpopulacija specifična za odgovarajući citokin/hemokin. Nova smeša antigen-antitelo inkubira se jedan sat na sobnoj temperaturi.

- 2) Smeši se dodaju sekundarna antitela, obeležena biotinom, koja se specifično vezuju za svaki od molekula odgovarajućeg medijatora, koji je već reagovao s primarnim antitelom na perlicama. Ova inkubacija traje dva sata na temperaturi od 18° do 25°C.
- 3) Opisanoj smeši se dodaje rastvor streptavidin-fikoeritina, koji se sastoji od monoklonskih antitela obeleženih fluorohromom, a koja se specifično vezuju za biotin-konjugovano antitelo. Inkubacija traje jedan sat na temperaturi od 18° do 25°C.
- 4) Smeša se centrifugira dva puta po 5 minuta na 200 g. Nakon toga ona je pripremljena za protočnu citometriju.

Merenje koncentracija citokina

Protočna citometrija (*flow cytometry*) jeste kvantitativna metoda koja nam omogućava da veoma precizno odredimo koncentracije medijatora imunskog odgovora u nosnom sekretu. Ona se najjednostavnije može definisati kao određivanje karakteristika ćelija u protoku. Jedan od osnovnih principa ove metode jeste sortiranje ćelija – odvajanje ćelija u protoku na osnovu njihovih imunskih svojstava. To je, zapravo, fluorescencijom vođeno ćelijsko sortiranje. Protočnom citometrijom moguće je odrediti koncentracije različitih proteinskih molekula koji su ili ispoljeni na površini ćelijske membrane ili se nalaze u citoplazmi ćelija (30). Međutim, na taj način nije moguće izmeriti koncentracije već izlučenih molekula u različitim telesnim tečnostima, kao što su serum, krvna plazma, cerebrospinalni likvor, urin, nosni sekret, suze, sinovijalna tečnost i druge. U te svrhe koristimo posebnu metodu u okviru protočne citometrije – merenje koncentracija većeg broja medijatora pomoću polistirolskih perlica (*bead-based multiple analyte detection*) (31).

Koncentracije citokina/hemokina mere se u posebnom aparatu – protočnom citometru. To je aparat koji detektuje fluorescenciju svake od polistirolskih perlica za koju je vezan odgovarajući medijator. Svojim softverom on proračunava ukupan broj perlica koje fluoresciraju na isti način i tako određuje intenzitet signala koji se konvertuje u vrednost koncentracije odgovarajućeg citokina, izraženu u pg/ml. Protočni citometar je tzv. multiparametarski analikator, jer se njegovom upotrebom mogu meriti koncentracije čak do 20 medijatora u istom uzorku (31). To se može objasniti činjenicom da se u jednom flow citometrijskom kitu kombinuju polistirolske perlice različitih dimenzija, a označene fluorohromnim

obeleživačima (bojama) različitih intenziteta otpuštanja fotona. To će se odraziti na intenzitet krajnjeg signala, koji će biti pretvoren u koncentraciju odgovarajućeg medijatora.

Kada se smeša razlije u vibrirajuću protočnu komoru, obeležene perlice ulaze u tok. Na jednom mestu se komora sužava u kanal, širine dijametra jedne obeležene perlice. U jednoj tački svaka od usmerenih perlica nailazi na laserski snop, čija je talasna dužina 690 nm. Kada laser pogodi specifičnu boju kojom je obeležen molekul streptavidin-fikoeritina, pobudi elektrone koji prelaze na više orbite. Nakon izlaska iz snopa, elektroni se vraćaju u prethodne orbite i tada emituju fotonski snop, koji registruje fotodetektor aparata (30, 31). Intenzitet fotonskog signala direktno je proporcionalan koncentraciji merenog medijatora u smeši (30, 31). Za svaki od citokina/hemokina softver određuje odgovarajuću standardnu krivu, sa vrednostima koncentracije citokina na apscisi i vrednostima intenziteta detektovanog signala na ordinati. Koncentracija medijatora izmerenog u uzorku beleže se u odnosu na standardnu krivu (31). Prag detekcije za svaki od ispitivanih medijatora zavisi od tipa aparata protočnog citometra, kao i od flow citometrijskog kita koji se koristi za merenje (31).

Jedna od osnovnih karakteristika protočne citometrije jeste reproducibilnost metode. To znači da se u bilo kojoj drugoj laboratoriji, primenom iste tehnike uzorkovanja nosnog sekreta, korišćenjem istog aparata i upotrebom istih reagenasa za obradu uzoraka, mogu dobiti isti ili bar približno isti rezultati. Razlikujemo *intra-assay* i *inter-assay* reproducibilnost metode. *Intra-assay* reproducibilnost, ili reproducibilnost unutar jednog ispitivanja, prati se kroz tri nezavisna eksperimenta. Na osnovu njih se određuje srednji *intra-assay* koeficijent varijacije za svaki od ispitivanih medijatora. *Inter-assay* ili *assay to assay* reproducibilnost je reproducibilnost između različitih ispitivanja, a unutar jedne laboratorije. Ona se, takođe, prati kroz tri nezavisna eksperimenta, nakon čega se određuje srednji *inter-assay* koeficijent varijacije za svaki od medijatora.

ZAKLJUČAK

Ispitivanje sastava nosnog sekreta je široko primenjivano za određivanje koncentracija medijatora zapaljenske reakcije, uključenih u patogenezu zapaljenja gornjih disajnih puteva. Suprotno biopsijama, to su jednostavne i neinvazivne tehnike. Apsorpcione tehnike za uzorkovanje nosnog sekreta imaju prednosti nad ostalima, zbog jednostavnosti izvođenja, reproducibilnosti i komfora koje pružaju ispitanicima. Merenje koncentracija većeg broja medijatora pomoću polistirolskih perlica poseban je oblik protočne citometrije, gde se na relativno brz, precizan i jednostavan način mogu odrediti koncentracije većeg broja već izlučenih medijatora

imunskog odgovora u uzorcima nosnog sekreta. To je osetljiva i brza metoda za merenje koncentracija citokina/hemokina, koja nam može pružiti veliki broj informacija u vezi sa složenim patofiziološkim mehanizmima u akutnim i hroničnim zapaljenjima sluzokože nosa. Takođe, ima veliki značaj u proceni imunomodulacijskih efekata različitih lekova koji se primenjuju u lečenju ovih oboljenja, pre svega, antibiotika i kortikosteroida.

SKRAĆENICE

Th – T-helper (T-pomagački)

IL – interleukin

TNF –faktor nekroze tumora

IFN – interferon

CCL – CC-ligand

RANTES – 'regulated upon activation normal T cell expressed and secreted'

MCP – 'monocyte chemoattractant preoteins'

LITERATURA

1. Kramer MF, Burow G, Pfrogner E, Rasp G. In vitro diagnosis of chronic nasal inflammation. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1086–92.
2. Vučević D, Radosavljević T, Mladenović D. Uloga fibroblasta u patogenezi bronhijalne astme. *Med Čas* 2011; 45(2): 17–25.
3. Watelet JB, Gevaert P, Holtappels G, Van Cauwenberge P, Bachert C. Collection of nasal secretions for immunological analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 242–6.
4. Šegulja S, Zvonarek-Valković M, Buljević D. The role of exhaled nitric oxide in asthma control. *Medicina Fluminensis* 2010; 46: 55–9.
5. Van Crombruggen K, Van Bruaene N, Holtappels G, Bachert C. Chronic sinusitis: clinical terminology „Chronic rhinosinusitis“ further supported. *Rhinology* 2010; 48: 54–8.
6. Jankowski R, Persoons M, Foliguet B, Coffinet L, Thomas C, Verient-Montaut B. Eosinophil count in nasal secretions of subjects with and without nasal symptoms. *Rhinology* 2000; 38: 23–32.
7. Gnjiđić Ž, Grgić M, Turčić P, Malenica M, Stipić D. Nasal irrigation with Sterimar solution after transsphenoidal surgery of tumors in sellar region. *Medicina Fluminensis* 2011; 47: 206–11.
8. Mercke U, Lindberg S, Dolata J. The role of neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in the mucociliary defense of the rabbit maxillary sinus. *Rhinology* 1987; 25: 89–93.

9. Mygind N, Winther B. Immunological barriers in the nose and paranasal sinuses. *Acta Otolaryngol* 1987; 103: 363–8.
10. Ohkubo K, Masakazu I, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T, Okuda M. Mechanisms of IL-6, IL-8 and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology* 1998; 36: 156–61.
11. Pupek M, Mikulewicz W, Mielnik J, Batycka B, Katnik-Prestowska I. Time-dependent observations of secretion marker levels in nasal secretions after histamine and metacholine provocations. *Arch Immunol Ther Exp* 2003; 51: 259–65.
12. De Corso E, Baroni S, Romitelli F, et al. Nasal lavage CCL24 correlate with eosinophils trafficking and symptoms in chronic sino-nasal eosinophilic inflammation. *Rhinology* 2011; 49: 174–9.
13. Klimek L, Rasp G. Norm values for eosinophil cationic protein in nasal secretions: influence of specimen collection. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 367–74.
14. Borum P, Gronborg H, Brofeldt S, Mygind N. Nasal reactivity in rhinitis. *Eur J Respir Dis* 1983; 128(Suppl): 65–71.
15. Okuda M. IgE and IgE antibody to mite in nasal fluid. *ORL* 1975; 37: 344–8.
16. Bachert C, Van Kempen M, Van Cauwenberge P. Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 375–9.
17. Riechelmann H, Deutschle T, Friemel E, Gross H-J, Bachem M. Biological markers in nasal secretions. *Eur Respir J* 2003; 21: 600–5.
18. Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Vukomanović-Đurđević B, Perić AV, Miljanović O. Proinflammatory cytokine levels in nasal fluid as indicators of severity of nasal polyposis. *Acta Clin Croat* 2010; 49: 395–403.
19. Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Vukomanović-Đurđević B, Miljanović O. Correlation between cytokine levels in nasal fluid and eosinophil counts in nasal polyp tissue in asthmatic and non-asthmatic patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2011; 39: 133–9.
20. Perić A, Vojvodić D, Radulović V. Cytokine profiles in nasal fluid in patients with nasal polyps: a flow cytometric study. *J Med Biochem* 2010; 29: 28–33.
21. Perić A, Vojvodić D, Vukomanović-Đurđević B. Influence of allergy on clinical, immunological and histological characteristics of nasal polyposis. *B-ENT* 2012; 8: 25–32.
22. Perić A, Vojvodić D, Miljanović O. Influence of allergy on cytokine level in nasal discharge of patients with nasal polyps. *Acta Medica Medianae* 2010; 49: 40–3.
23. Perić A, Vojvodić D, Vukomanović-Đurđević B, Baletić N. Eosinophilic inflammation in allergic rhinitis and nasal polyposis. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011; 62: 341–8.
24. Lü FX, Esch RE. Novel nasal secretion collection method for the analysis of allergen specific antibodies and inflammatory biomarkers. *J Immunol Methods* 2010; 356: 6–17.
25. Naclerio RM, Togias A, Flowers B. Nasal lavage: a technique for elucidating the pathophysiology of allergic rhinitis. In: Mygind N, Pipkom U, Dahl R, eds. *Rhinitis and asthma similarities and differences*. Copenhagen: Munksgaard Publishers, 1990: 213–21.
26. Johansson SGO, Deuschl H. Immunoglobulins in nasal secretions with special reference to IgE. Methodological studies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 52: 364–75.
27. Kalogjera L, Vagić D, Baudoin T. Effect of endosinusal treatment on cellular markers in mild and moderate asthmatics. *Acta Otolaryngol* 2003; 123: 310–3.
28. Zurak K, Vagić D, Drviš P, Prohaska-Potočnik C, Džidić S, Kalogjera L. Bacterial colonization and granulocyte activation in chronic maxillary sinusitis in asthmatics and non-asthmatics. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1231–5.
29. Drviš P, Kalogjera L, Baudoin T. Prognostic value of IL-5 in sinus lavage in patients with chronic maxillary sinusitis. *Acta Clin Croat* 2003; 42: 315–9.
30. Appendix III: Laboratory techniques commonly used in immunology. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, eds. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2004: 515–30.
31. Scavuzzo MC, Rocchi V, Fattori B, et al. Cytokine secretion in nasal mucus of normal subjects and patients with allergic rhinitis. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 366–71.