

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО УШНИ, НОСНИ И ГЪРЛЕНИ БОЛЕСТИ**  
**УМБАЛ „ЦАРИЦА ЙОАННА – ИСУЛ“**

**БИОФИЛМ ИНФЕКЦИИ ПРИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА**  
**УШИТЕ, НОСА И ГЪРЛОТО**

**Д-Р ГЕОРГИ КИРИЛОВ ПОПОВ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И**  
**НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**Научна специалност: Оториноларингология**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**  
**ПРОФ. Д-Р ДИАНА ПЕТРОВА ПОПОВА, ДМН**

**СОФИЯ, 2023**

Дисертационният труд съдържа 133 страници, 38 фигури и 53 таблици.

Цитирани са 298 литературни и 5 електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Ушни, носни и гърлени болести, Медицински университет – София.

Всички включени в дисертацията изследвания са извършени в УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, в Лаборатория по Геномна стабилност, Институт по Молекулярна биология към Българска Академия на Науките и в Центъра по Молекулярна Медицина, Катедра по Медицинска Химия и Биохимия, Медицински университет – София.

Настоящото изследване е финансирано от план-сметка за учебна година 2018/2019, вх. №3942/29.06.2018 г.; План-сметка за учебна година 2019/2020, вх. №3040/29.05.2019 г.; Проект „Млад Изследовател 2020“; Медицински университет – София; № Д-79/24.06.2020 г., ПРОЕКТ вх. №8370/20.11.2019 г;

Дисертационният труд бе представен на заседание на катедрен съвет на Катедра по Ушни, носни и гърлени болести, Медицински университет – София, на 18.05.2023.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 17.11.2023 в Катедра по Ушни, носни и гърлени болести към Медицински университет – София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, ул. Бяло море №8, гр. София пред научно жури в състав:

Председател:

Доц. д-р Годор Мирославов Попов, дм – вътрешен член и рецензент

Членове:

Доц. д-р Годор Мирославов Попов, дм – вътрешен член и рецензент

Доц. д-р Юлиан Димитров Рангачев, дм – вътрешен член

Проф. д-р Валентин Костов Стоянов, дмн – външен член и рецензент

Доц. д-р Александър Вълков Вълков, дм – външен член

Доц. д-р Даниел Петков Петков, дм – външен член

Резервни членове:

Доц. д-р Дончо Петров Дончев, дм

Номерацията на фигурите, таблиците и цитациите в автореферата не отговаря на тази в дисертационния труд.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Ушни, носни и гърлени болести към Медицински университет – София, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, ул. Бяло море №8, гр. София

## Съдържание

1. Увод.....	5
2. Цели и задачи.....	6
2.1. Цел.....	6
2.2. Задачи.....	6
3. Материали и методи.....	7
3.1. Пациенти и набиране на биологичен материал.....	7
3.2. Методи.....	8
3.2.1. Клинични методи.....	8
3.2.2. Установяване на наличие на бактериален биофилм.....	9
3.2.3. Определяне на нивото на експресия на <i>MUC5AC</i> и <i>MUC5B</i> .....	15
4. Резултати.....	21
4.1. Демографски анализ.....	21
4.2. Дескриптивен анализ.....	24
4.2.1. Субективна симптоматика, SNOT22.....	24
4.2.2. Тютюнопушене.....	25
4.2.3. Консервативно лечение с назални стероиди.....	26
4.2.4. Оценка на КТ находка по Lund-Mackay.....	27
4.3. Статистически анализ.....	28
4.3.1. Наличие на бактериален биофилм – анализ на данните.....	28
4.3.2. Муцинова експресия.....	35
4.3.2.1. Ниво на експресия на <i>MUC5AC</i> – анализ на данните.....	35
4.3.2.2. Ниво на експресия на <i>MUC5B</i> – анализ на данните.....	43

4.3.3. Взаимовръзка между двата фактора при пациентите с ХРС.....	52
4.3.3.1. Взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на <i>MUC5A</i> .....	52
4.3.3.2. Взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на <i>MUC5B</i> .....	54
5. Дискусия.....	57
6. Заключение.....	69
7. Изводи.....	69
8. Приноси.....	71
9. Списък със съкращения.....	72
10. Библиография.....	74
11. Публикации, участия в конгреси и в проекти, свързани с дисертационния труд.....	81

## 1. Увод

Хроничният риносинуит (ХРС, Chronic rhinosinusitis, CRS) е заболяване, засягащо в различна степен около 15% от възрастното население в развитите страни и водещо до съществени социални и икономически последици. В САЩ до 16% от възрастните граждани страдат от ХРС<sup>1</sup>, а в Европа средният процент е 10,9% като има не малки разлики в честотата между различните държави, като най-малка честота - 6,9%, се докладва в Бранденбург, Германия, а най-голяма – 27,1%, в Португалия<sup>2</sup> като генерално честотата е по-голяма в по-южните държави<sup>2</sup>. Само в САЩ към 2017 директните икономически последици от болестта се изчисляват на 10 до 13 милиарда долара годишно<sup>3</sup> (отговарящо на 12 до 16 милиарда долара през 2023<sup>4</sup>), а индиректните – на 20 милиарда долара<sup>3</sup> (отговарящо на 24 милиарда долара през 2023<sup>4</sup>). ХРС води до значително понижено качество на живот и често влошава придружаващи заболявания<sup>5</sup> като за отбелязване е, че до 25% от пациентите с диагнозата имат придружаваща депресия<sup>6</sup>.

Хроничният риносинуит най-често се класифицира като такъв с полипи<sup>7</sup> (CRSwNP) и такъв без полипи<sup>7</sup> (CRSsNP) като обаче съществуват други категории като например алергичен гъбичен риносинуит<sup>7</sup> (AFS/AFRS), както и други разделения като например еозинофилен и неоеозинофилен<sup>8</sup>.

ХРС е многофакторно заболяване<sup>9</sup> като влияние оказват предишни инфекции, тютюнопушене, климат, замърсяване на въздуха, генетични фактори, придружаващи заболявания и бактериална колонизация, включително относително скоро разкритото участие на инфекция с бактериален биофилм.

Множество проучвания достигат до заключение, че бактериални биофилми (ББФ) играят роля в патогенезата на ХРС<sup>10-15</sup> като пациентите, при които такава инфекция е била доказана генерално имат по-тежка клинична симптоматика и цялостно по-лош следоперативен резултат, когато биват подложени на оперативно лечение.

Друг фактор, за чието влияние се появяват все повече данни, са гликопротеините муцини, намиращи в лигавицата на дихателните пътища и имащи ключова роля за реологията на мукуса и за улавянето и прочистването на мукозата от бактерии. Абнормалното им количество и променената им експресия се свързват с повишена честота на различни патологии<sup>16-18</sup>, включително и на хроничен риносинуит<sup>19-21</sup> като в това отношение секреторните муцини MUC5AC и MUC5B са най-често изучаваните<sup>21</sup>.

Естествено възникващ въпрос е доколко двата фактора – бактериалните биофилми и муцините, си влияят и взаимно се потенцират при развитието на ХРС. Има данни, че както повишено количество или променени свойства на муцините улесняват прикрепването на бактериите и оформянето на биофилм<sup>22-24</sup>, така и обратното – че

бактериалното присъствие води до повишен синтез и отделяне на муцини в лигавиците на горните дихателни пътища (ГДП)<sup>25,26</sup>.

В настоящето проучване бе изследвано наличието на бактериален биофилм при пациенти с ХРС, нивото им на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B* (при изписване с *наклон* се касае за съответните гени), както и взаимовръзката на тези два фактора с някои анамнестични и клинични белези като тютюнопушене, субективна тежест на симптомите, употреба на медикаменти и т.н. Най-накрая бе анализирана взаимовръзката между нивата на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B* и наличието на бактериален биофилм.

## 2. Цели и задачи

### 2.1. Цел

Цел на проучването е изследването на връзката между хроничния риносинусит и наличието на бактериален биофилм, както и установяване на ролята на експресията на муциновите гени *MUC5AC* и *MUC5B*; да се установи налично ли е взаимодействие между тези фактори и ако да – какво; да се събере максимално подробна информация за всеки отделен пациент. Стремешът ни е на база на установените резултати и при разкриване на зависимости, включително на такива, свързани с навици, предходна терапия и т.н. да се предложи по-оптимална стратегия за лечебен подход и начин на проследяване на пациентите с хроничен риносинусит.

### 2.2. Задачи

1. Да се уточни максимално състоянието на болния и тежестта на патологията с анамнеза, физикални методи, вкл. ендоскопско изследване, да се анализират налични образни изследвания и получените данни да се стандартизират по общоприети скали.
2. Интраоперативно да се вземат оптимални тъканни проби, които веднага да бъдат обработени съобразно методът, с който ще бъдат изследвани.
3. Пробите, предназначени за установяване на наличието на бактериален биофилм да се изследват с конфокален сканиращ лазерен микроскоп с въртящи се дискове в Института по Молекулярна биология към БАН.
4. Пробите, предназначени за установяване на нивото на експресия на муциновите гени *MUC5AC* и *MUC5B* да се изследват с PCR в Центъра по Молекулярна медицина към МУ София и да се определи количествено експресията.

5. Данните да се обработят и статистически да се установят наличните зависимости.
6. При установяване на зависимости на хроничния риносинусит с клинични, поведенчески или терапевтични фактори да се изгради план за наблюдение на пациентите, включващ новите данни и зависимости.

### **3. Материали и методи**

#### **3.1. Пациенти и набиране на биологичен материал**

След получаване на одобрение от Етична комисия КЕНИМУС на МУ София (решение с протокол №25 от дата 20.09.2019) се получи писмено информирано съгласие от 85 пациенти, всички над 18-годишна възраст, на които предстоеше оперативна интервенция под обща анестезия в Клиниката по ушни, носни и гърлени болести в УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“. Пациентите бяха предвидени за оперативно лечение поради хроничен риносинусит (ХРС група, 71 пациенти), което бе предвидено да се извърши с функционална ендоскопска техника (ФЕСХ/FESS) или поради остро-настъпила носна травма (контролна група, 14 пациенти). Бяха съблюдавани критериите за ХРС на American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery<sup>27</sup>:

- 1) 12 седмици или повече от два или повече от следните белези или симптоми: мукопурулентен секрет (дрениращ се напред през ноздрите, назад към назофаринкса или и двете), запушване на носа (назална обструкция/конгестия), чувство за тежест или болка над синусите, намалено обоняние
- 2) Възпаление, доказано и документирано чрез една или повече от следните находки: пурулентен секрет или оточност на средния носов ход или предния етмоидален район, полипи в носната кухина или в средния носов ход, образно-диагностични данни за възпаление в синусите

За контроли бяха подбрани пациенти с остра травматична патология в областта на носа (най-често фрактура на носни кости) поради нуждата от оперативно лечение под обща анестезия, което да гарантира спокойно и безболезнено взимане на пробата. В допълнение изборът ни на такива пациенти за контроли се основаваше на липсата им на хронична патология в областта на носа и синусите<sup>19,28-31</sup> и на употребата на тъкани от пациенти с остра травматична патология като контроли при други проучвания с риносинусит<sup>19,28,29</sup>. Такава контролна група е използвана, както при проучване, разглеждащо ролята и наличието на бактериалните биофилми при пациенти с ХРС<sup>29</sup>, така и при такова, разглеждащо ролята на муцините при пациенти с ХРС<sup>19</sup>. Решението ни да не използваме като контроли пациенти, подложени на септопластика поради *deviatio septi nasi* (изкривена носна преграда), както е правено в други

проучвания<sup>12,30,32</sup>, бе обусловено от хроничността на този тип патология (макар и да не е възпалителна), както и на хипотезата, че благодарение на промените в нормалната аерация и модел на муко-цилиарен клирънс, налични при пациенти с *deviation septi nasi*, тази патология може да е фактор за развитие на ХРС<sup>33</sup>. В добавка към изброените аргументи има и данни, че при пациенти с изкривена носна преграда има променена флора в среден носов ход<sup>34</sup>.

От всеки пациент бяха взети 2 проби от областта на *processus uncinatus* като едната бе съхранена и обработена по протокола за конфокална сканираща микроскопия за идентификация на наличие или отсъствие на бактериален биофилм, а втората бе съхранена и обработена по протокола за PCR за муцинови гени за MUC5AC и MUC5B. *Processus uncinatus* бе избран като място за взимане на пробата поради ключовата му позиция в остиомеаталния комплекс и поради честата му употреба в предходни изследвания, касаещи ХРС<sup>12,23,35–38</sup>. При контролите не бе отстранен целият *processus uncinatus* (унцинатектомия), а само бе взета ограничена тъканна проба като използването му при контролни пациенти е също срещано в литературата<sup>29,37</sup>. От 85-мата пациенти 5-ма (всички от групата с ХРС) отпаднаха поради лошо качество или недостатъчно количество на пробите. Съответно крайната бройка на пациентите, чийто резултати се отчитат и анализират в нашето проучване, бе 66 пациенти в групата с ХРС и 14 пациенти в контролната група.

При набирането им за целите на изследването всички пациенти бяха щателно разпитани и от всеки от тях бе попълнен въпросникът SNOT22 (пациентите от контролната група, които бяха приети по повод остро настъпило травматично увреждане бяха помолени да оценят симптоматиката си преди травмата), бяха оценени и документирани индивидуални фактори например налични алергии, опитано предходно лечение с назални стероиди и предишни оперативни интервенции в зоната. Пациентите с наличен КТ на глава преди операцията бяха оценени и по скалата на Lund-Mackay.

## **3.2. Методи**

### **3.2.1. Клинични методи**

В хода на проучването бяха събрани проби от общо 85 пациенти, които бяха подложени на оперативно лечение под обща анестезия в Клиника по УНГ болести – ИСУЛ по повод хроничен риносинусит (71 души) или остра травматична патология (контроли, 14 души). Още при приемането на пациентите бе снета подробна анамнеза и статус и бяха разпитани за придружаващи болести, алергии, предходни операции и т.н. От всеки пациент бяха взимани по две проби – една за определяне на биофилм наличност чрез конфокална сканираща микроскопия и една за определяне на нивото на експресия на муциновите гени за MUC5AC и MUC5B. Петима пациенти, всички от групата с ХРС, отпаднаха от изследването поради лошо ка-

чество или недостатъчно количество на взетите проби. Така ефективно бяха получени резултати за общо 66 души с ХРС и 14 контроли.

### **3.2.2. Установяване на наличие на бактериален биофилм**

#### **3.2.2.1. Конфокална сканираща лазерна микроскопия с въртящи се дискове (SDCM)\***

Пробите, предназначени за микроскопска оценка на наличието на биофилм, незабавно след вземането се поставяха в клетъчна хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Cat# 41966-029) с добавен в нея 10% фетален телешки серум (Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific, Cat# 10270) с цел запазване на жизнеността на клетките<sup>39</sup>. След това препаратите се транспортираха до Лаборатория по геномна стабилност към Институтът по молекулярна биология към БАН, където се оцветяваха с помощта на кит LIVE/DEAD™ BacLight™ (Thermo Fisher Scientific, Cat# L7007) според инструкциите на производителя.

Накратко процесът е следният: пробите се промиват внимателно с фосфатен буфер с физиологична концентрация на натриев хлорид (Phosphate Buffer Saline, Merck, Cat# 524650) за премахване на останала от вземането на препарата кръв, след което се поставят в багрещия разтвор за 20 минути. Багрещият разтвор съдържа комбинация от две органични багрила, които са разтворени във физиологичен разтвор: първото багрило, Syto9, оцветява в зелено само живи прокариотни и еукариотни клетки, докато второто багрило, пропидиев йодид (PI) навлиза и оцветява в червено единствено мъртви клетки. Оцветявайки по този начин пробите, може да се съди за жизнеността както на бактериалните клетки, формиращи биофилма, така и за клетките на подлежащата лигавица. Така обработените проби се поставят в 35mm микроскопски петрита със стъклено дъно (MatTek, Cat# P35G-1.5-14-C), така че лигавицата да бъде разположена надолу към стъкленото дъно на петритото. Пробите се затискат отгоре с покривно микроскопско стъкълце, за да се притиснат към стъклото на петритото и да се изгонят въздушните мехурчета под пробата, които биха затруднили микроскопирането. Микроскопското наблюдение на пробите се осъществяваше с помощта на спининг-диск конфокална микроскопска система (Spinning disk confocal microscopy – SDCM; Фигура 1) Andor Revolution (Andor, Oxford Instruments). Пробите се поставят на инвертен микроскоп Nikon Ti-Eclipse (Nikon) и се наблюдават с помощта на воден обектив Nikon CFI Plan Apo VC 60x (Nikon) с апертура 1.20 (Numerical Aperture (NA) 1.20). За възбуждане и наблюдение на зеленото багрило Syto9 беше използван 488nm син лазер с номинална енергия 30mW, атенюирана до 20%, а за детектиране на червеното багрило пропидиев йодид беше използван 561nm жълто-зелен лазер с номинална енергия 50mW, атенюирана до 8.3%. В зависимост от качеството на оцветяване на пробите бяха използвани

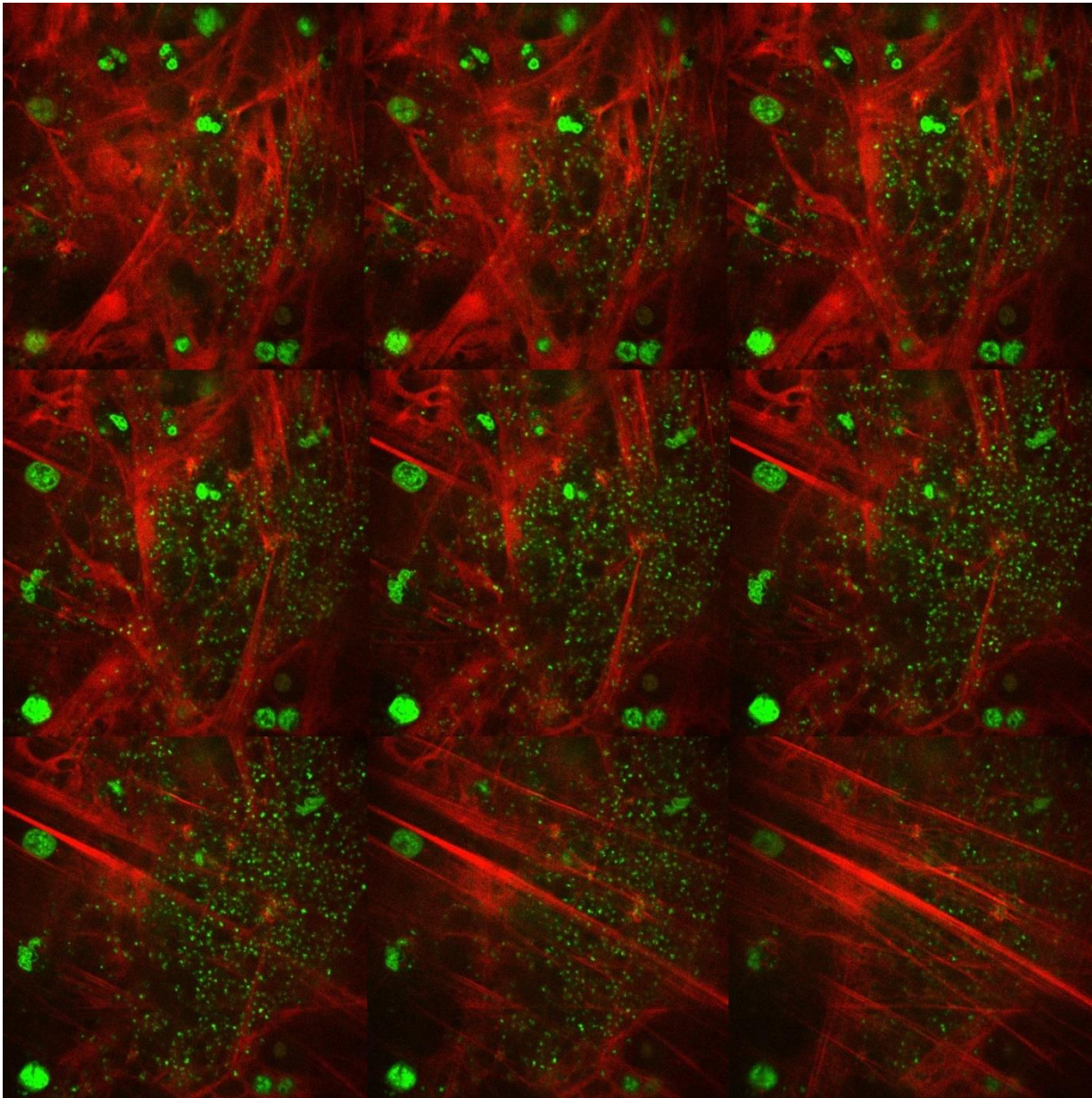
времена за експозиция в диапазона 50-200ms за всеки заснет кадър. Детекцията на излъчения от пробите сигнал беше осъществена с високо-чувствителна EMCCD (Electron Multiplying Charge-Coupled Device) камера Andor iXon 897 (Andor, Oxford Instruments).

Конфокалната микроскопия с въртящи се дискове (SDCM) е вид конфокална сканираща лазерна микроскопия (CSLM); В текста се ползват и двата термина и в контекста на проучването са взаимозаменяеми

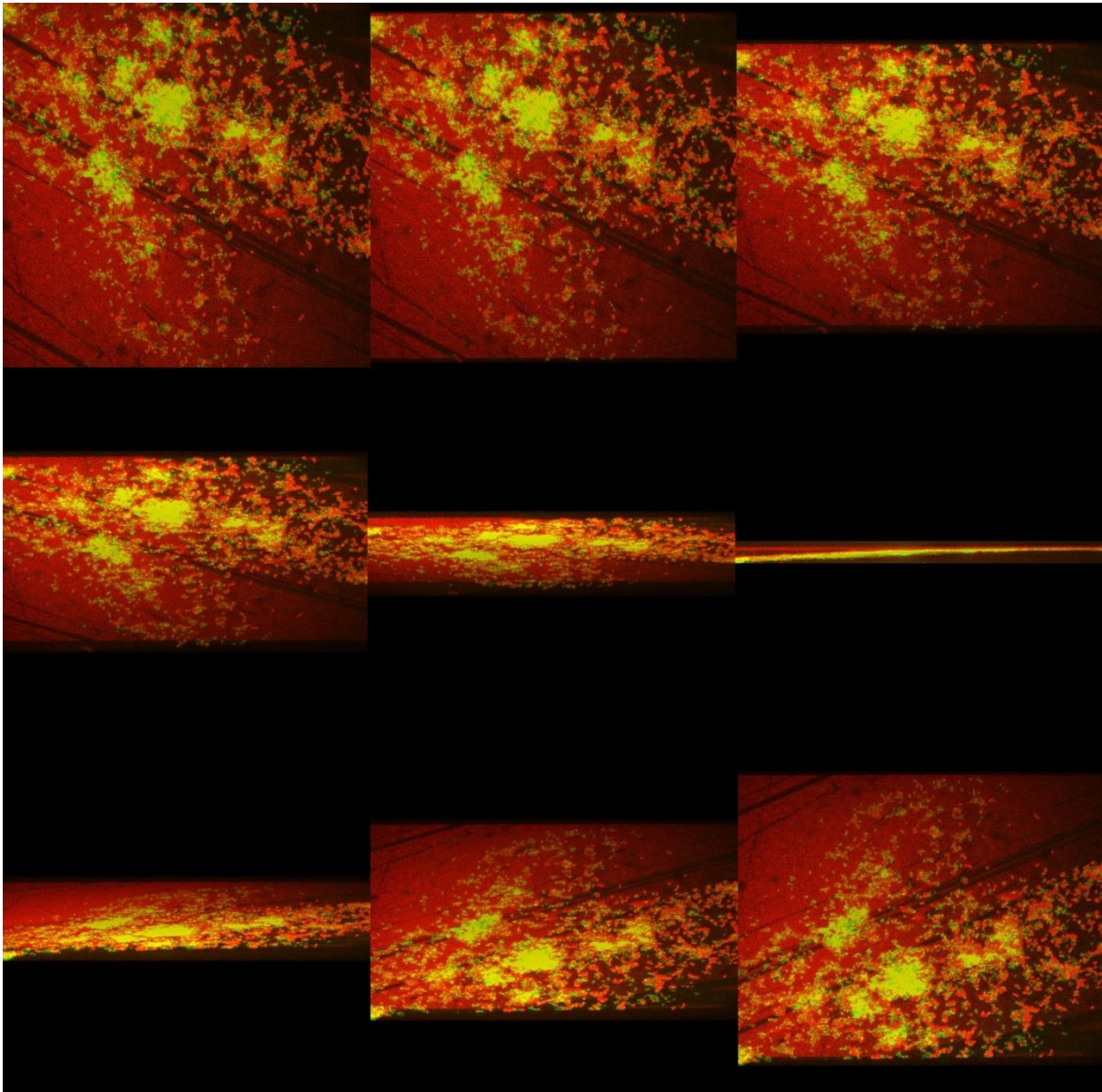


Фигура 1. Конфокален микроскоп с въртящи дискове, Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология към БАН

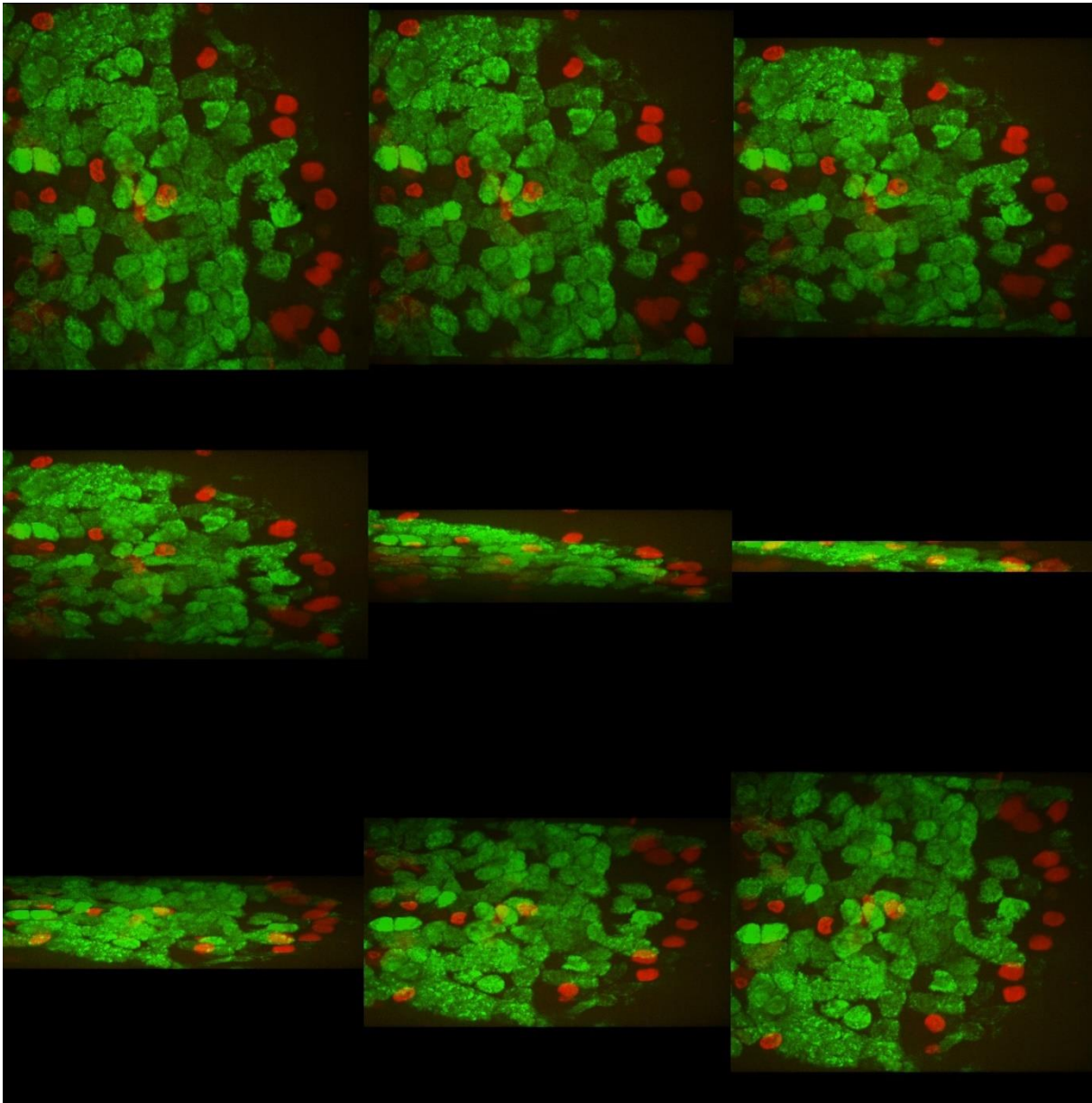
Всеки препарат беше подробно преглеждан и заснеман неколkokратно, както в зеления, така и в червения канал, като всяко едно заснемане включваше генерирането на т.нар. Z-stack – поредица от равнини на заснемане през цялата дебелина на препарата (>40 отделни фокални равнини на разстояние 0.5 $\mu$ m една от друга), което позволява да се заснеме епитела в цялата му дебелина както и намиращият се над него мукусен слой (Фигура 2). Общо се заснеха 642 подобни образа. Така заснетите препарати позволиха препаратите да се разгледат „триизмерно“ и да се ротират в различни равнини (Фигура 3, Фигура 4) и съответно позволиха да се направи точна и детайлна оценка както за наличието на биофилм, така и за състоянието на подлежащия епителен слой.



Фигура 2. Сканиране на препарат; Наслоени една след друга отделните изображения представляват един Z-stack



Фигура 3. Триизмерно изображение на бактериален биофилм, ротация по X-оста



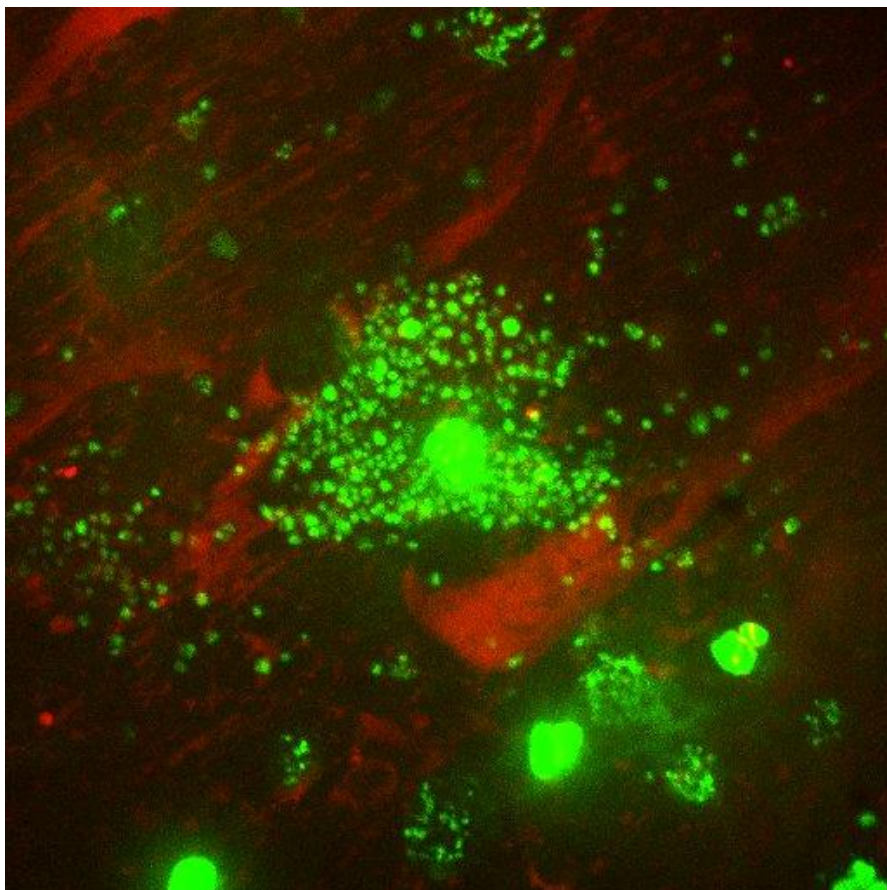
Фиг. 4. Триизмерно изображение на здрава лигавица, ротация по X-оста

#### 3.2.2.2. Критерии за наличие на биофилм

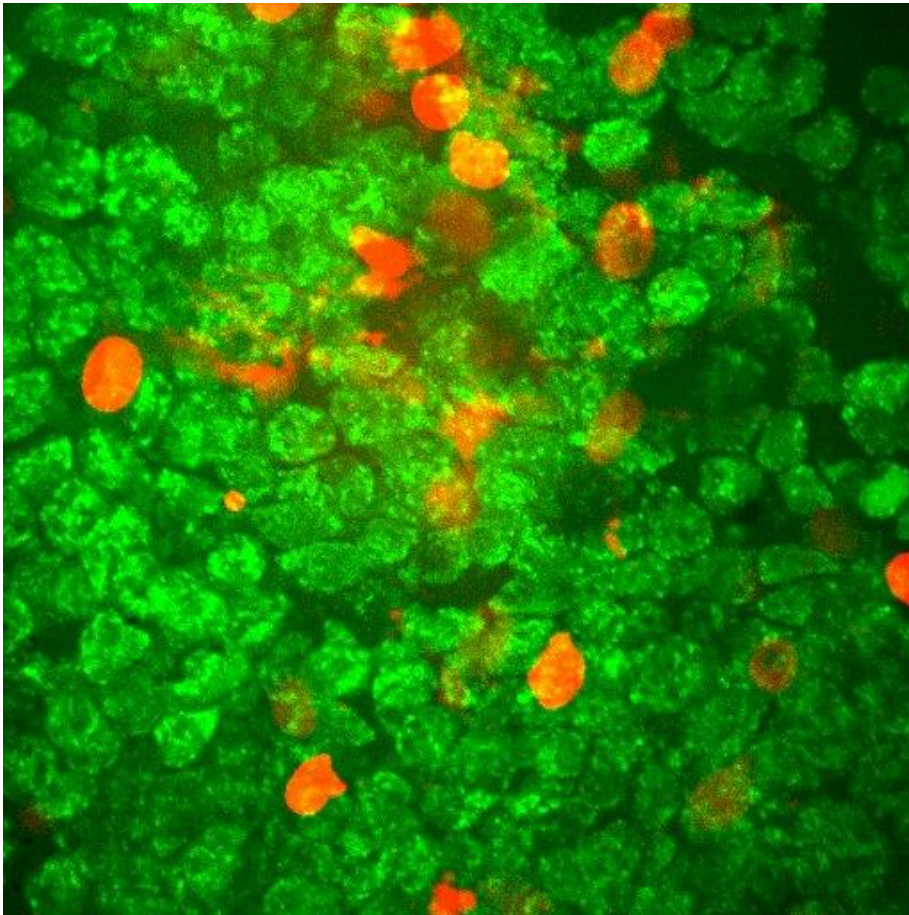
За коректно дефиниране и в следствие – прилагане на критериите за установяване на наличие на биофилм при използване на конфокална микроскопия бе направен обстоен литературен обзор. В допълнение се осъществиха и консултации за критериите за дефиниране на препарат като позитивен за биофилм структура с проф. Питър Уърмолд (Peter Wormald) и проф. Гартх Ерлих (Garth Ehrlich).

Критериите за наличие на биофилм бяха следните:

За бактериален биофилм се определяха струпвания на флуоресцентни елементи с размер, подобен на очаквания при бактерии ( $0.5\text{--}3\ \mu\text{m}$ )<sup>24,40,41</sup> и приблизително окръглена форма, подредени в характерна триизмерна структура. По-малко интензивен като сила на флуоресценция „ореол“<sup>12,41</sup>, ограждащ такива силно флуоресциращи елементи се приемаше, че се дължи на екзополизахаридния матрикс на биофилма, включващ и извънклетъчни нуклеинови киселини. Както бе посочено в 4.2.2.1. предвид характеристиките на използваното багрило живите клетки бяха оцветени в зелен цвят, а мъртвите – в червен, като това важи както за прокариотните бактериални клетки, така и за еукариотните клетки от лигавицата. Двама наблюдатели (проф. Р. Гергова и д-р Г. Попов) независимо един от друг оцениха образите за наличие на бактериален биофилм като наличие се отбелязваше при оценка, че такава има и от двамата (Фигура 5, Фигура 6).



Фигура 5. Бактериален биофилм



Фигура 6. Лигавица без следи от биофилм

### 3.2.3. Определяне на нивото на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B*

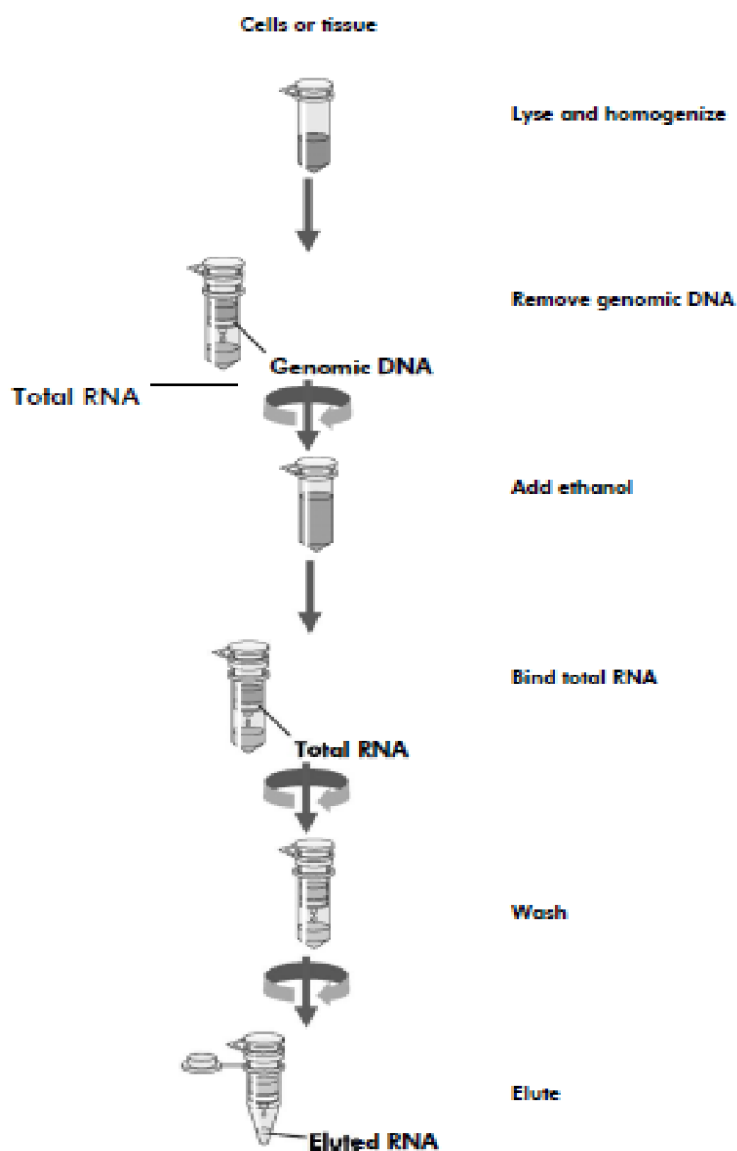
Незабавно след взимането им пробите, предназначени за установяване на експресията на *MUC5AC* и *MUC5B* бяха поставяни в разтвор RNeasy® и замразявани. В такова състояние те бяха транспортирани до Центъра по Молекулна Медицина към Катедрата по Химия и Биохимия към МФ на МУ-София. За установяване на експресионния статус на *MUC5AC* и *MUC5B* гените ние приложихме метода на qRT-PCR (Фигура 7). Последователно описани са стъпките на алгоритъма, който бе приложен за всяка една от взетите тъканни проби.



Фигура 7. Апаратура за qRT-PCR, Център по Молекулна Медицина

#### 3.2.3.1. Изолиране на РНК от тъкан.

От събраните тъкани проби беше изолирана тотална РНК с помощта на RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) като се следваха инструкциите на производителя (Фигура 8). Малка част от тъканата проба беше хомогенизирана на стайна температура. Полученият хомогенат беше пречистен от генома ДНК посредством gDNA Eliminator центрофужни колонки. След това тоталната РНК в хомогената беше закачена на центрофужни колонки с силициево – базирана мембрана (RNeasy MinElute колонки). Следваха стъпки за промиване на колонката и нейното елуиране.



Фигура 8. Стъпки при изолирането на тотална РНК с помощта на RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen).

3.2.3.2. Определяне на концентрацията и качеството на изолираните РНК проби спектрофотометрично с помощта на NanoDrop.

С помощта на спектрофотометър NanoDrop Microvolume Spectrophotometer (Thermofisher) се определи концентрацията и качеството на изолираните РНК проби.

### 3.2.3.3. Провеждане на обратна транскрипция за синтез на кДНК

С помощта на High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (според инструкциите на производителя) бе проведена обратна транскрипция за синтез на кДНК. Като изходен материал за синтеза на кДНК беше използвано 100ng РНК. В Таблица 1 са показани реактивите използвани за RT-PCR и техните количества, а в Таблица 2 условията за протичане на реакцията.

Компонент	Количество (µl) За една реакция
10X RT Buffer	2.0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2.0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3.2 µl
РНК матрица	10.0 µl
Краен Обем	20 µl

Таблица 1. Компоненти на RT-PCR реакцията.

Температура	Време (мин)
25°C	10
37°C	120
85°C	5
4°C	изчакване/∞

Таблица 2. Условия за протичане на обратната транскрипция.

### 3.2.3.4. Провеждане на RT-qPCR

За провеждане на RT-qPCR използвахме QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) и праймери QuantiTect Primer Assay (Quiagen). Методът се базира на принципите на количествен RT-PCR и позволява количествено определяне на кДНК (комплемен-

тарна на изследваната иРНК) по време на амплификационната реакция чрез проследяване количеството на флуоресцентното багрило - SYBR Green I. С него се отчитат всички двойноверижни ДНК продукти на реакцията, като с продуцирането на нови двойноверижни ампликони флуоресцентният сигнал на SYBR Green багрилото нараства. Компонентите на реакцията са представени на Таблица 3, а условията за протичане на RT-qPCR реакцията са представени в Таблица 4.

Компонент	Количество ( $\mu\text{l}$ ) за една реакция
2x QuantiTect	5 $\mu\text{l}$
SYBR Green PCR Master Mix	
10x QuantiTect Primer Assay	1 $\mu\text{l}$
RNase- free H <sub>2</sub> O	Варира
кДНК матрица	Варира
Краен Обем	10 $\mu\text{l}$

Таблица 3. Компоненти на RT-qPCR реакцията.

Температура	Време
95°C	15 min
94°C	5 s
55°C	30 s
70°C	

Таблица 4. Условия за протичане на RT-qPCR.

3.2.3.5. Експресионен анализ на *MUC* гените между пациентите и контролите чрез  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  метода.

Съществуват два метода за определяне на генната експресия: абсолютен и относителен. В нашето изследване беше използвано относително количествено определяне на генната експресия чрез  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  метода.

Дефиниции:

Ендогенна контрола (енд.к.) - ген, чиято експресия не варира между пробите, които се изследват.

Калибратор - пробата към която се сравняват всички останали.

Ct - PCR цикъл. Обикновено един RT-qPCR има около 40 цикъла. Ct е стойността, където PCR кривата пресича някакъв праг в линейната част на кривата. Тази стойност се използва в анализа. По-високите Ct стойности означават, че по-малко mRNA присъстват.

PCR реакцията е експоненциален процес, където специфично амплифициращия се продукт се удвоява след всеки цикъл. Количествено определяна кДНК по време на амплификационната реакция се осъществява чрез проследяване на флуоресцентния сигнал от репортера – при нарастване на броя на амплифициращите се ампликони флуоресцентният сигнал също се увеличава. Измерваната Cq (Ct) стойност е логаритмична стойност, която е необходимо да бъде конвертирана в линейна количествена стойност чрез функцията:  $RQ_{unkn} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ .

$\Delta Ct = Ct (\text{мРНК}) - Ct (\text{енд.к.})$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{изследвана проба}) - \Delta Ct (\text{калибратор})$  като изследваните проби в случая са тъкани на пациентите, а за калибратора се използват тъкани на контролите

$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , където RQ е relative quantification (относително ниво на експресия)

Всяка една проба бе повторена три пъти и за изчисляване на  $\Delta Ct$  се взимат средните Ct стойности, получени за изследваната мРНК и ендогенната контрола.

Като референтен ген (ендогенна контрола) при анализа на експресията на *MUC5AC* и *MUC5B* беше използван *GAPDH* гена.

Стойността RQ показва с колко пъти е променена експресията в сравнение с калибратора. Калибраторът има RQ стойност 1 (нормална експресия). Всички проби се сравняват с калибратора. RQ стойност 10 означава, че изследваната мРНК е 10 пъти по-силно експресирана в дадената проба в сравнение с калибраторната проба. Стойност на RQ 0.1 означава, че изследваната мРНК е с 10 пъти по-ниска експресия.

Приема се, че RQ е значима, когато стойността е по-голяма от 2 или по-малко от 0.50. При стойност на RQ над 2 означава, че има положителна промяна в експресията (повишение) на съответния изследвана мРНК. При стойност на  $RQ < 0.50$ , се смята че експресията е с отрицателна стойност и е понижена.

## 4. Резултати

### 4.1. Демографски анализ

Разпределение по пол при пациентите изобщо, включващо пациентите в ХРС групата и контролите беше 54 мъже (67,5%) и 26 жени (32,5%), средната възраст бе 44,7 години (диапазон 18-85).

Само за ХРС групата разпределението бе следното: от 66-тимата пациенти 44-ма се определяха като мъже и 22-ма – като жени (Фигура 9). Средната им възраст бе 47,24 години (диапазон: 19-85). Средната възраст на мъжете в групата бе 47,52 години, а на жените – 46,68 години (Фигура 12). 48 от 66 имаха ХРС с назална полипоза (36 мъже и 12 жени, Фигура 10) като за 3-ма от тях (и тримата мъже) това беше повторна операция. Останалите 18 пациенти нямаха полипи и при всички се касаеше за първа операция.

Сред контролите 10 бяха мъже, а 4 – жени (Фигура 11), средната възраст на контролите бе 32,71 години (диапазон: 18-74). Средната възраст на мъжете в групата бе 30,3 години, а на жените – 38,75 (Таблица 5; Фигура 12), като обаче е редно да се спомене, че средната възраст е повишена спрямо мъжете до голяма степен заради наличието на пациентка на възраст 74 години на фона на малкия брой пациенти жени – контроли изобщо (4). Нито един от пациентите в контролната група нямаше история за каквато и да е хронична патология в областта на носа и синусите. За един от контролите оперативното лечение по повод остра травматична патология, в неговия случай – фрактура на носни кости, беше второ такова, като и предходния път фрактурата е била наместена в болнични условия, без остатъчна симптоматика.

	Мъже	Жени	Общо
ХРС група	47,52	46,68	47,24
Контролна група	30,3	38,75	32,71
Общо	44,33	45,46	44,7

Таблица 5. Средна възраст на пациентите в години, вкл. разбита по пол



Фигура 9. Разпределение на пациентите с ХРС по пол

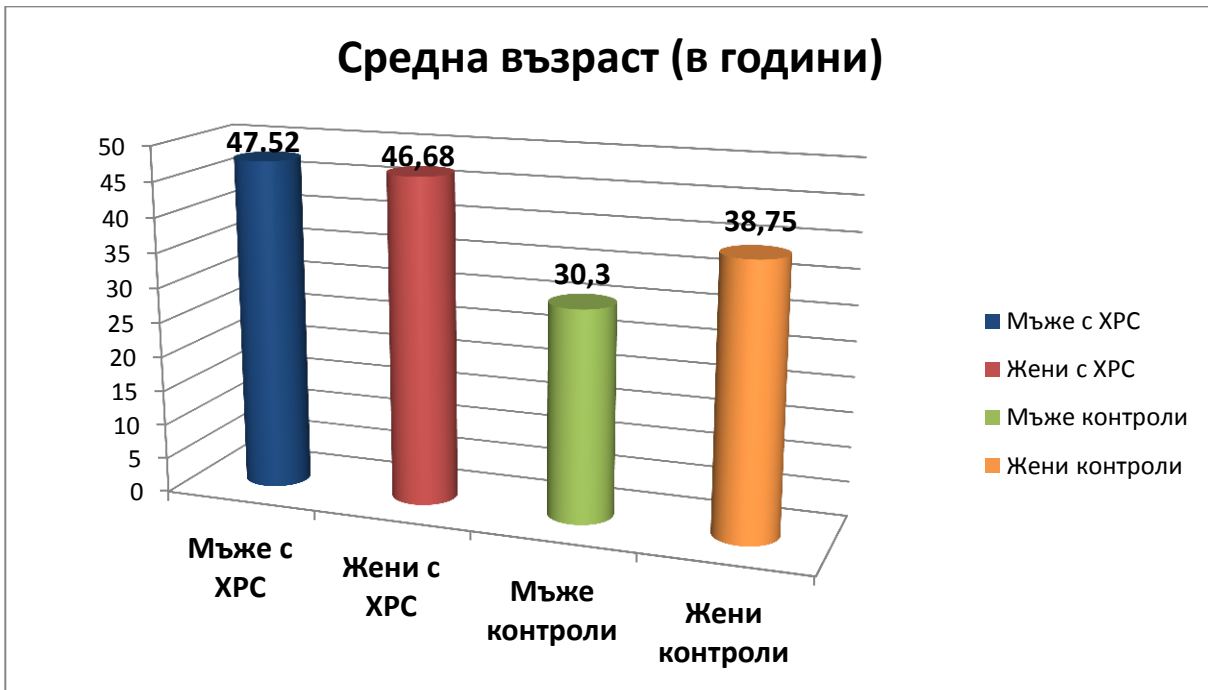


Фигура 10. Разпределение на пациентите от ХРС групата съобразно подтипа на ХРС



Фигура 11. Разпределение на пациентите контроли по пол

Впечатление прави по-ниската възраст на пациентите от контролната група, както при мъжете, така и при жените (Фигура 12). Това в много отношения е очаквано предвид емпиричното наблюдение, което е и потвърдено от статистически данни<sup>42</sup>, че по-млади пациенти по-често имат дейности, които водят или биха могли да доведат до травма в лицевата област<sup>42</sup>.



Фигура 12. Средна възраст на пациенти с ХРС и контроли, разбито по пол

## 4.2. Дескриптивен анализ

### 4.2.1. Субективна симптоматика оценена с въпросник SNOT22

Отговорите и резултатите от въпросника SNOT22 бяха обработени, осреднени и групирани. При групата на пациенти с ХРС средната оценка е 41,15 като 110 е максималната оценка означаваща максимална тежест на симптоматиката. При мъжете и жените средната оценка е съответно 42,95 и 37,54 (Таблица 6).

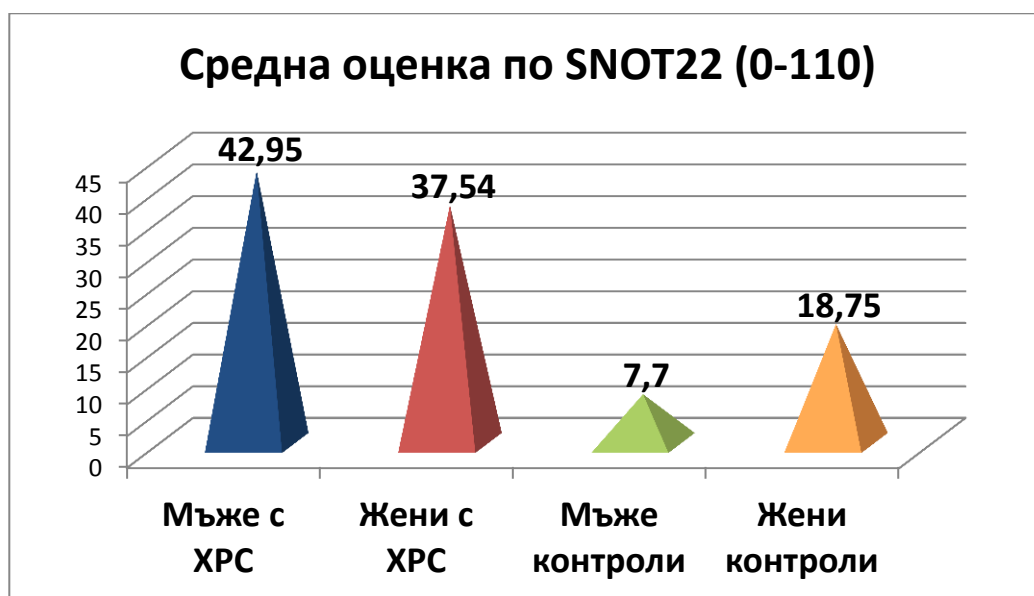
ХРС група	Средна оценка SNOT22 (от 110)
Мъже	42,95
Жени	37,54
Общо	41,15

Таб. 6. Средна оценка по SNOT22 при мъже, жени и общо при пациентите с ХРС

При групата на пациентите контроли средната оценка е 10,86 като при мъжете средната оценка е по-ниска – 7,7 отколкото при жените – 18,75 (Таблица 7). Важна забележка, която бе посочена и в 3.1. е, че пациентите от контролната група бяха помолени да оценят симптомите си от преди претърпяването на травматичната увреда, поради която са приети в болницата, т.е. когато са били здрави.

Контролна група	Средна оценка SNOT22 (от 110)
Мъже	7,7
Жени	18,75
Общо	10,86

Таблица 7. Средна оценка по SNOT22 при мъже, жени и общо при контролите



Фигура 13. Средна оценка по SNOT22 в различните група пациенти

Интересно наблюдение е, че пациентите с диагноза ХРС мъже имат по-висока средна оценка по SNOT22 от пациентите с диагноза ХРС жени (Фигура 13). Обратното се наблюдава при контролните пациенти, при които жените са оценили наличните си симптоми преди остро-настъпилата травма като по-силни от пациентите-контроли мъже.

#### 4.2.2. Тютюнопушене

Пациентите бяха разпитани за тютюнопушене, от групата с ХРС близо 40% съобщиха, че са пушили активно във времето преди операцията и поне 1 година назад. Сред мъжете този процент беше 38,63%, а сред жените – 40,90% (Таблица 8; Фигура 14). Процентът при мъжете е приблизително равен на този на пушачите мъже в общата популация в България – 40,5%, докато този при жените е осезаемо по-голям от нивото в популацията – 18,9%<sup>43</sup>.

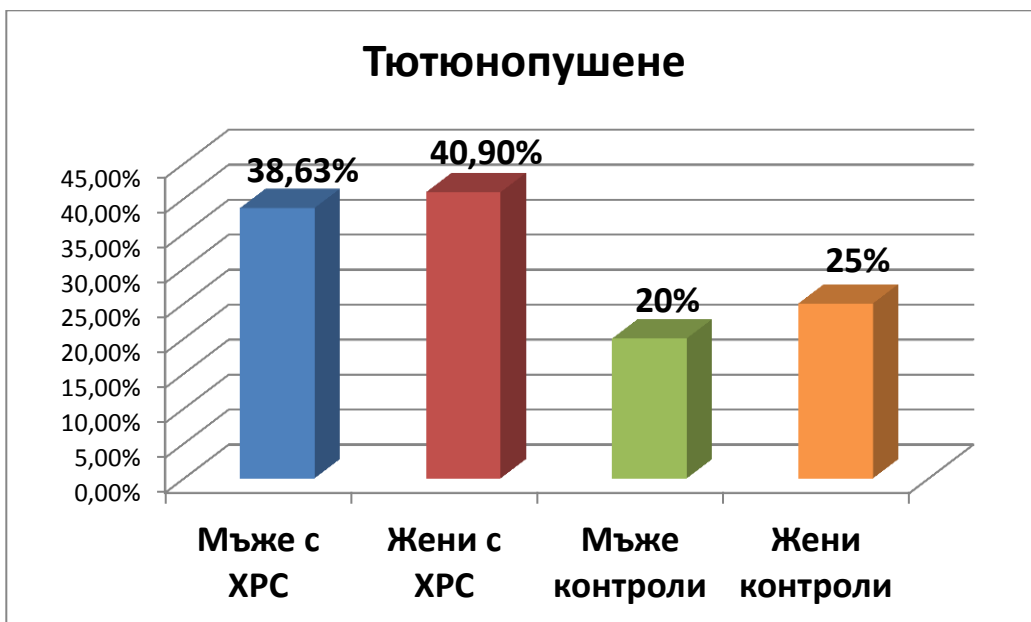
Пушене ХРС	Пушачи	Непушачи
Мъже	17/44 (38.63%)	27/44 (61.36%)
Жени	9/22 (40.90%)	13/22 (59.09%)
Общо	26/66 (39.39%)	40/66 (60.60%)

Таб. 8. Тютюнопушене поне в последната година преди операцията сред групата с ХРС

Сред контролите процентът на пушачи беше по-нисък – общо 21,42% и разбито полове – 20% при мъжете и 25% при жените (Таблица 9; Фигура 14) като е редно да се има предвид относително малката големина на извадката.

Пушене Контроли	Пушачи	Непушачи
Мъже	2/10 (20%)	8/10 (80%)
Жени	1/4 (25%)	3/4 (75%)
Общо	3/14 (21.42%)	11/14 (78.57%)

Таблица 9. Тютюнопушене поне в последната година сред групата контроли



Фигура 14. Процент на пушещи сред различните групи

#### 4.2.3. Консервативно лечение с назални стероиди преди операцията

Пациентите от ХРС групата бяха разпитани и за опитано консервативно лечение с назални стероиди преди операцията. Близо две трети от пациентите от групата с ХРС бяха опитали такава (Таблица 10; Фигура 15), но ефектът е бил незадоволителен като сила или трайност.

Назални стероиди ХРС	Опитана терапия	Неопитана терапия
Общо	41/66 (62.12%)	25/66 (37.87%)

Таблица 10. Предоперативна терапия с назални стероиди



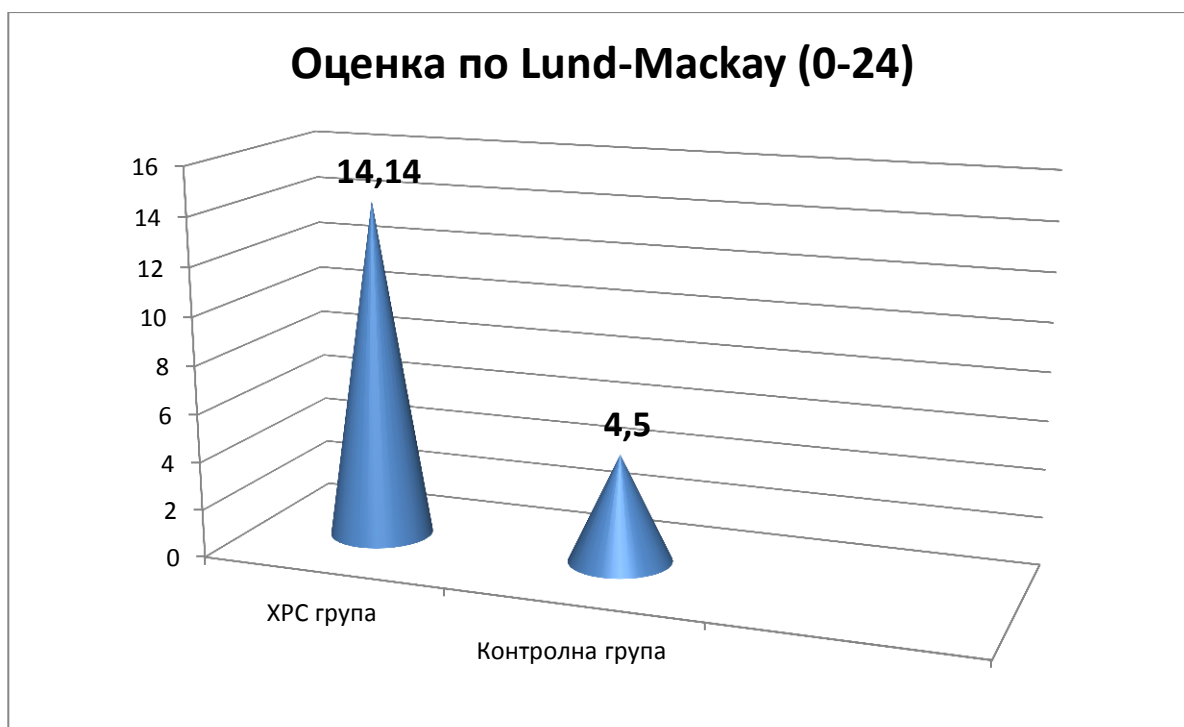
Фигура 15. Процент сред пациентите с ХРС, провеждали в миналото терапия с назални стероиди

#### 4.2.4. Оценка на компютър-томографската находка по скалата Lund-Mackay.

Наличните компютърни томографии на пациентите от ХРС групата и контролната група бяха обстойно разгледани и оценени по Lund-Mackay скалата<sup>44</sup> (Таблица 11; Фигура 16). Средната оценка на пациентите от ХРС групата е 13,83 (диапазон 5-22, общо 19 оценени КТ), а на пациентите от контролната група - 4,5 (диапазон 2-7, общо 2 КТ).

	Оценка по Lund-Mackay (максимална оценка 24)
ХРС група	14,14
Контролна група	4,5

Таблица 11. Средна оценка по Lund-Mackay при пациентите с ХРС и при контролите



Фигура 16. Средна оценка по Lund-Mackay, сравнение на пациенти с ХРС и контроли

Въпреки осезаемо по-високата средна оценка при пациентите с ХРС спрямо тази при контролите броят на пациентите и в двете групи е относително малък, което затрудни осъществяването на задоволителен статистически анализ (4.3.1.7., 4.3.2.1.7., 4.3.2.2.7).

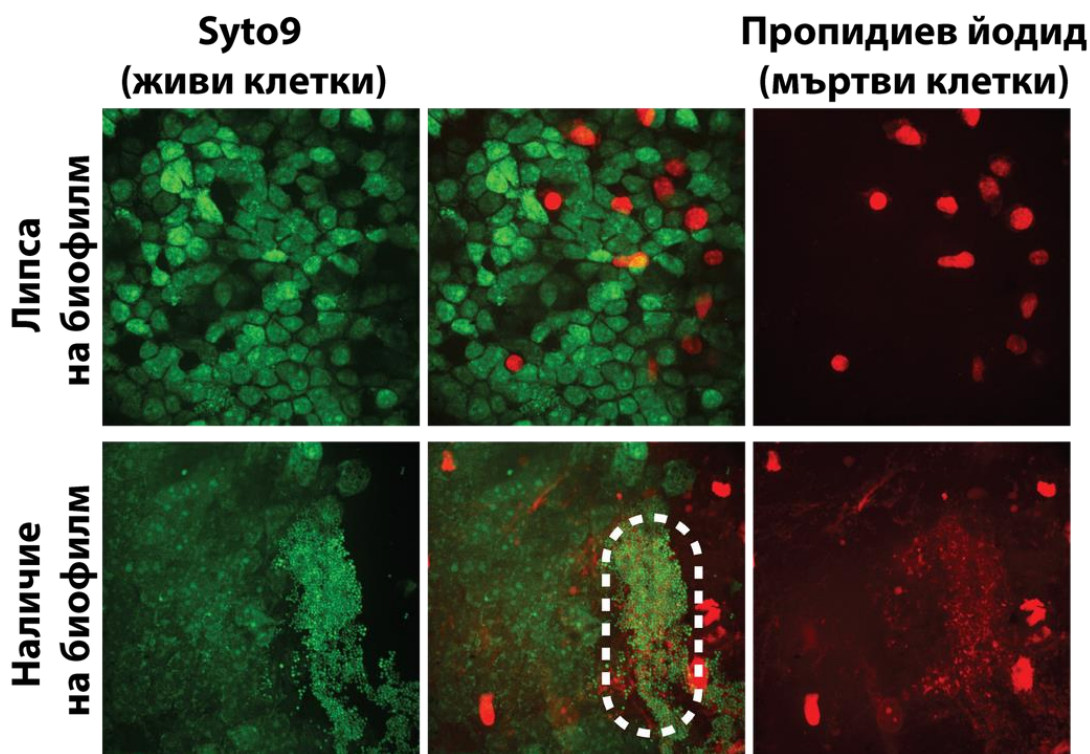
### 4.3. Статистически анализ

Статистическите анализи бяха проведени от проф. Т. Кундуржиев (Факултет по обществено здраве към МУ-София) със SPSS 20.0 за Windows като бяха подбрани най-подходящите тестове съобразно анализираните данни.

#### 4.3.1. Наличие на бактериален биофилм – анализ на данните

##### 4.3.1.1. Анализ на различията между пациенти с ХРС и контроли

За да бъдат оценени за наличие на бактериален биофилм пробите на пациентите и от двете групи бяха боядисани с багрилото BacLight™ LIVE/DEAD™. Единият компонент на последното – Syto9 (обагрещ в зелено) оцветява единствено живи клетки, а вторият компонент – пропидиев йодид (обагрещ в червено) навлиза единствено в клетки с нарушена клетъчна мембрана, тоест в мъртви клетки и оцветява единствено тях. Тъй като описаните свойства на багрилото важат както за прокариотни, така и за еукариотни клетки, успешно бе наблюдавана и лигавицата, а не само бактериалните клетки. Бактериалните клетки, както и формирането на биофилм структура бяха определяни по критериите, описани вече в точка 4.2.2. Изследването на пробите се осъществи с описания в точка 4.2.2.1. SDCM като всички проби бяха изследвани в дълбочина и бяха съставени и запазени компилационни послойни образи (z-stacks) за всяка една от пробите.



Фигура 17. Препарати с наличие и с липса на биофилм; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“<sup>39</sup>

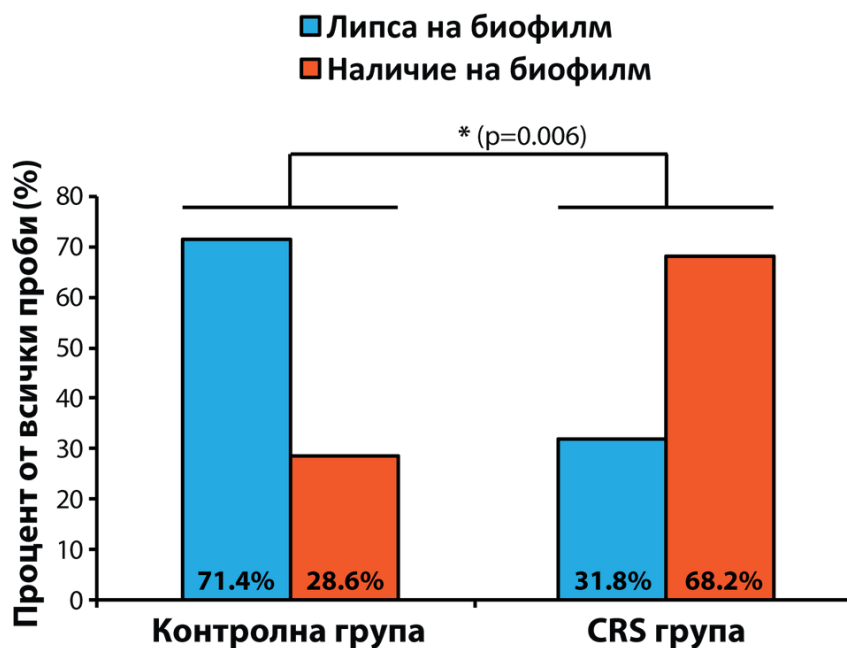
При разглеждане на пробите на пациентите от групата с ХРС бактериална биофилм структура се откри в пробите на 45 от 66-мата пациенти (45/66 или 68,2%), които бяха означени като биофилм-позитивни, докато в пробите на останалите 21 пациенти (21/66 или 31,8%) такава не се откри и те бяха означени като биофилм-негативни (Фигура 17).

Сред контролите биофилм структура се установи при пробите на само 4 от 14 пациенти (4/14 или 28,6%), докато пробите на останалите 10 пациенти от контролната група не показаха присъствие на биофилм (10/14 или 71,4%).

За да се определи дали има статистически значима разлика между двете групи се проведе статистически анализ на данните като се използва тест Chi-square (Таб. 12).

Биофилм		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС		
Не	N	10	21	31	0,006
	%	71,4%	31,8%	38,8%	
Да	N	4	45	49	
	%	28,6%	68,2%	61,3%	
Общо	N	14	66	80	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 12. Chi-Square test за разлика в наличието на биофилм между пациенти с ХРС и контроли; Установи се статистически значимо различие между двете групи ( $p < 0,05$ )



Фигура 18. Сравнение на наличието на биофилм между пациенти с ХРС и контроли; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“<sup>39</sup>

Установи се разлика между двете групи с висока статистическа значимост ( $p=0,006$ ). Резултатът (Фигура 18) подсилва хипотезата, че има асоциация между бактериалните биофилми и хроничния риносинусит и че е силно вероятен принос на ББФ в патогенезата на ХРС.

Що се касае до различията между двата субтипа пациенти в ХРС групата – тези с полипи, CRSwNP и тези без полипи – CRSsNP то данните показаха минимална разлика между тях. Сред пациентите с CRSwNP биофилм имаха 33 от общо 48 (68,75%), а сред тези с CRSsNP с биофилм бяха 12 от общо 18 (66,67%). Направи се и субанализ за установяване на статистически значима разлика в наличието на биофилм между тези две подгрупи и контролите.

За установяване на статистически значима разлика между пациентите с ХРС с полипи и контролите се направи статистически анализ с Chi-square тест (Таб. 13).

Наличие на биофилм		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС с полипоза		
Не	N	10	15	25	0,007
	%	71,4%	31,3%	40,3%	
Да	N	4	33	37	
	%	28,6%	68,8%	59,7%	
Общо	N	14	48	62	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 13. Chi-square test за разлика в наличието на биофилм между пациенти с ХРС с полипи и контроли; Установи се статистически значима разлика ( $p<0,05$ )

За установяване на статистически значима разлика между пациентите с ХРС без полипи и контролите се направи статистически анализ като за целта бе избран друг тест – Fisher's exact test (Таб. 14) във връзка с по-малкия брой на пациентите в групата без полипоза.

Наличие на биофилм		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС без полипи		
Не	N	10	6	16	0,033
	%	71,4%	33,3%	50,0%	
Да	N	4	12	16	
	%	28,6%	66,7%	50,0%	
Общо	N	14	18	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 14. Fisher's exact test за разлика в наличието на биофилм между пациенти с ХРС без полипи и контроли; Установи се статистически значима разлика ( $p<0,05$ )

От получените резултати можем да направим заключението, че присъствието на бактериален биофилм е значим фактор за развитие на хроничен риносинусит без значени от субтипа на последния – CRSwNP или CRSsNP.

#### 4.3.1.2. Взаимовръзка между наличие на биофилм и възраст

За откриване на значима взаимовръзка между наличие на биофилм и възраст се направи статистически анализ с Mann-Whitney Test, както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 15).

Група	Показател	Наличие на биофилм	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	Възраст	Не	21	50,43	52,00	16,38	21,00	73,00	0,131
		Да	45	45,76	43,00	15,72	19,00	85,00	
Контроли	Възраст	Не	10	34,10	31,00	16,00	18,00	74,00	n/a
		Да	4	29,25	29,00	7,37	21,00	38,00	

Таблица 15. Mann-Whitney Test за взаимовръзка между наличие на биофилм и възраст на пациентите; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ). При контролите броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

На база на получените резултати може да се заключи, че възрастта не е съществен фактор за развитие на бактериален биофилм при пациентите с ХРС.

#### 4.3.1.3. Взаимовръзка между наличие на биофилм и пол

За откриване на значима взаимовръзка между наличие на биофилм и пол на пациентите се направи статистически анализ като за групата на пациенти с ХРС се използва Chi-square test (Таб. 16), а за пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 17).

Група	Пол		Наличие на биофилм		Общо	p
			Не	Да		
ХРС	Мъже	N	12	32	44	0,262
		%	57,1%	71,1%	66,7%	
	Жени	N	9	13	22	
		%	42,9%	28,9%	33,3%	
	Общо	N	21	45	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 16. Chi-square test за взаимовръзка между наличие на биофилм и пол при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ).

Група	Пол		Наличие на биофилм		Общо	p
			Не	Да		
Контроли	Мъже	N	7	3	10	1,000
		%	70,0%	75,0%	71,4%	
	Жени	N	3	1	4	
		%	30,0%	25,0%	28,6%	
	Общо	N	10	4	14	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 17. Fisher`s exact test за взаимовръзка между наличие на биофилм и пол при контролите; Статистическа значима взаимовръзка не се установи при пациентите контроли ( $p>0,05$ ).

От получените резултати може да се заключи, че полът не е съществен рисков фактор за колонизация с бактериален биофилм нито при пациентите с ХРС, нито при контролите.

#### 4.3.1.4. Взаимовръзка между наличие на биофилм и субективна симптоматика по SNOT22

За откриване на значима взаимовръзка между наличие на биофилм и оценката на субективната симптоматика по SNOT22 се направи статистически анализ с Mann-Whitney Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 18).

Група	Показател	Наличие на биофилм	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	SNOT22 X/110	Не	21	40,14	43,00	14,22	7,00	65,00	0,934
		Да	45	41,62	42,00	13,90	11,00	74,00	
Контроли	SNOT22 X/110	Не	10	11,30	8,50	7,54	4,00	24,00	n/a
		Да	4	9,75	0,00	19,50	0,00	39,00	

Таблица 18. Mann-Whitney Test за взаимовръзка между наличие на биофилм и оценка по SNOT22; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p>0,05$ ). При контролите броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

От получените резултати може да се заключи, че наличието на биофилм не е съществен фактор за влошаване на субективната симптоматика при пациентите с ХРС.

#### 4.3.1.5. Взаимовръзка между наличие на биофилм и тютюнопушене

За откриване на значима взаимовръзка между наличие на биофилм и тютюнопушене се направи статистически анализ като за пациентите с ХРС се използва Chi-square test (Таб. 19), а за пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 20).

Група	Тютюнопушене		Наличие на биофилм		Общо	p
			Не	Да		
ХРС	Не	N	15	25	40	0,219
		%	71,4%	55,6%	60,6%	
	Да	N	6	20	26	
		%	28,6%	44,4%	39,4%	
	Общо	N	21	45	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 19. Chi-square test за взаимовръзката между наличие на биофилм и тютюнопушене при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ).

Група	Тютюнопушене		Наличие на биофилм		Общо	p
			Не	Да		
Контроли	Не	N	8	3	11	1,000
		%	80,0%	75,0%	78,6%	
	Да	N	2	1	3	
		%	20,0%	25,0%	21,4%	
	Общо	N	10	4	14	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 20. Fisher`s exact test за взаимовръзка между наличие на биофилм и тютюнопушене при контролите; Не се установи статистически значима взаимовръзка ( $p > 0,05$ ).

Противно на резултатите от други проучвания<sup>45,46</sup>, откриващи връзка между тютюнопушене и формиране на бактериални биофилми, нашите резултати не откриха сигнификантна такава връзка нито при пациентите с ХРС, нито при контролите.

#### 4.3.1.6. Взаимовръзка между наличие на биофилм и предходно лечение с назални стероиди

За откриване на значима взаимовръзка между наличие на биофилм и предходно лечение с назални стероиди на пациентите с ХРС се направи статистически анализ с Chi-square test (Таб. 21).

Група	Назални стероиди		Наличие на биофилм		Общо	p
			Не	Да		
ХРС	Не са опитани	N	8	17	25	0,980
		%	38,1%	37,8%	37,9%	
	Опитани	N	13	28	41	
		%	61,9%	62,2%	62,1%	
	Общо	N	21	45	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 21. Chi-square test за взаимовръзка между наличие на биофилм и опитана терапия с назални стероиди; Статистически значима взаимовръзка не се установи ( $p > 0,05$ ).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че предходно лечение с назални стероиди не оказва съществен ефект, както положителен, така и отрицателен, върху капацитета на бактериите да образуват биофилм или поне не и траен такъв.

#### 4.3.1.7. Взаимовръзка между наличие на биофилм и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay

За откриване на значима взаимовръзка между наличие на биофилм и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay при пациентите, които бяха оценени по скалата, се направи статистически анализ с Mann-Whitney Test както при пациентите, така и при контролите (Таб. 22).

Група	Показател	Наличие на биофилм	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	Lund-Mackay X/24	Не	6	12,67	11,00	3,93	9,00	19,00	0,930
		Да	13	13,85	11,00	6,57	5,00	23,00	
Контроли	Lund-Mackay X/24	Не	0						n/a
		Да	2	4,50	4,50	3,54	2,00	7,00	

Таблица 22. Mann-Whitney Test за взаимовръзка между наличие на биофилм и оценка по Lund-Mackay; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ). При контролите броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

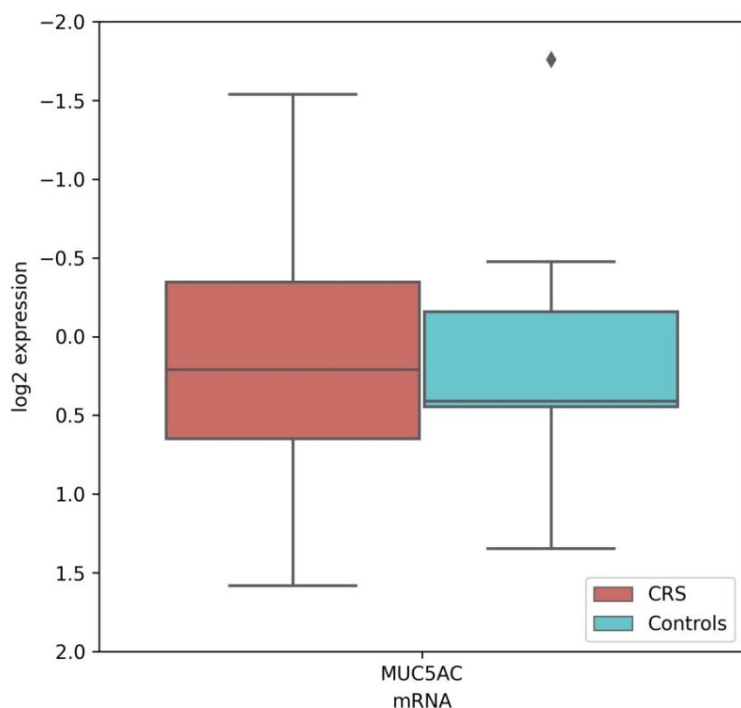
От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между наличието на бактериален биофилм и образно-диагностичната оценка на тежестта на риносинусита по скалата Lund-Mackay у пациентите с ХРС.

### 4.3.2. Муцинова експресия

#### 4.3.2.1. Ниво на експресия на *MUC5AC* – анализ на данните

##### 4.3.2.1.1. Сравнение на ниво на експресия между пациенти с ХРС и контроли

За да се установи дали е налична свръхекспресията на гена за *MUC5AC* при пациентите с ХРС и изобщо какво е нивото му на експресия при пациентите с ХРС и контролите се извърши qRT-PCR на тоталната РНК, изолирана от пробите. Използвахме експресионните нива на house-keeping гена за глицералдехид трифосфат дехидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) като референция. Нивото на експресия на *MUC5AC* (Фигура 19) бе сметнато като релативна количествена (relative quantity, RQ) стойност чрез 2- $\Delta\Delta C_t$  метода.



Фигура 19. Съпоставка на логаритмичните стойности на експресията на *MUC5AC* между пациенти с ХРС и контроли

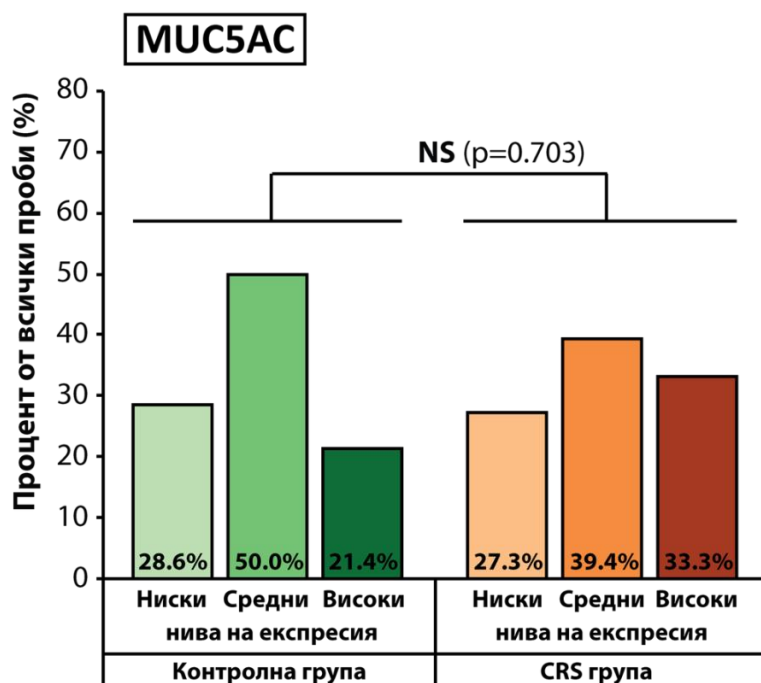
За да може щателно да се оцени експресионният профил на пациентите и същевременно резултатите да бъдат представени по начин, лесен за интерпретиране, подобно на други проучвания по въпроса<sup>21,47</sup>, те бяха разделени в три групи според техните RQ стойности – такива с ниска експресия или субекспресия ( $RQ < 0,5$ ), такива със срединна експресия (RQ стойност в диапазона 0,5-2,0) и такива с висока

експресия или свръхекспресия ( $RQ > 2,0$ ). Установихме, че 4 от 14-те пациенти в контролната група (28,6%) и 18 от 66 пациенти в групата с ХРС (27,3%) имат ниско ниво на експресия на гена. Срединно ниво на експресия имаха 7 от 14 контролни пациенти (50%) и 26 от 66 пациенти с ХРС (39,4%). Свръхекспресия (високо ниво на експресия) бе установено при 3 от 14 пациенти в контролната група (21,4%) докато при пациентите с ХРС 22 от 66 пациенти (33,3%) свръхекспресираха гена.

Направи се статистически анализ за определяне дали различията в експресията между двете групи са значими. Избра се тест Chi-square (Таб. 23).

RQ-MUC5AC		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС		
намалена експресия	N	4	18	22	0,703
	%	28,6%	27,3%	27,5%	
срединна експресия	N	7	26	33	
	%	50,0%	39,4%	41,3%	
повишена експресия	N	3	22	25	
	%	21,4%	33,3%	31,3%	
Общо	N	14	66	80	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 23. Chi-square test за разлика в нивото на експресия на *MUC5AC* между пациенти с ХРС и контроли; Статистически значима разлика между двете групи не се установява ( $p > 0,05$ )



Фигура 20. Сравнение на нивото на експресия на *MUC5AC* между контролната група и групата с ХРС; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“<sup>39</sup>

Въпреки че не се установи статистически значима разлика между двете групи (Фиг 20) е важно да се отбележи, че процентът на пациенти със свръхекспресия в групата с ХРС (33,3%) е осезаемо по-голям от този при пациентите контроли (21,4%). Тези данни оставят място за спекулация, че бъдещи проучвания по темата, включително такива с по-голям брой пациенти в основната и контролната група, е възможно да установят наличие на статистически значима разлика.

Що се касае до различията между двата субтипа пациенти в ХРС групата – тези с полипи, CRSwNP и тези без полипи – CRSsNP, то данните показаха известни разлики конкретно при групите на пациенти със срединна и с висока експресия. Сред пациентите с CRSwNP със срединна експресия бяха 43,8%, а тези с висока – 29,2%. При пациентите с CRSsNP процентите бяха съответно 27,8% и 44,4% т.е. при пациентите с ХРС без полипоза се наблюдаваше по-честа свръхекспресия. Разликата на процента пациенти с ниска експресия между двете групи бе минимален – 27,1% при тези с полипи и 27,8% при тези без. Направен бе и анализ, сравняващ двата субтипа ХРС с пациентите от контролната група.

За установяване на статистически значима разлика по отношение на експресията на *MUC5AC* между пациентите с ХРС с полипи и контролите се направи статистически анализ с Fisher's exact test (Таб. 24).

<i>MUC5AC</i> експресия		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС с полипоза		
ниска	N	4	13	17	0,927
	%	28,6%	27,1%	27,4%	
срединна	N	7	21	28	
	%	50,0%	43,8%	45,2%	
висока	N	3	14	17	
	%	21,4%	29,2%	27,4%	
Общо	N	14	48	62	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 24. Fisher`s exact test за разлика в нивото на експресия на *MUC5AC* между пациенти с ХРС с полипи и контроли; Статистически значима разлика не се открива ( $p>0,05$ ).

За установяване на статистически значима разлика по отношение на експресията на *MUC5AC* между пациентите с ХРС без полипи и контролите се направи статистически анализ с Fisher's exact test (Таб. 25).

<i>MUC5AC</i> експресия		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС без полипи		
ниска	N	4	5	9	0,400
	%	28,6%	27,8%	28,1%	
срединна	N	7	5	12	
	%	50,0%	27,8%	37,5%	
висока	N	3	8	11	
	%	21,4%	44,4%	34,4%	
Общо	N	14	18	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 25. Fisher's exact test за разлика в нивото на експресия на *MUC5AC* между пациенти с ХРС без полипи и контроли; Статистически значима разлика не се открива ( $p > 0,05$ ).

В заключение може да бъде обобщено, че резултатите ни не показват сигнификантна разлика в експресията на *MUC5AC* нито между контролите и пациентите с ХРС като обща група, нито между контролите и пациентите с ХРС с полипи, нито между контролите и пациентите с ХРС без полипи. Пациентите с ХРС без полипи показаха по-високи нива на експресия от тези с полипоза.

#### 4.3.2.1.2. Взаимовръзка между ниво на експресия и възраст

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и възрастта на пациентите се направи статистически анализ с Kruskal-Wallis Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 26).

Група	Показател	RQ- <i>MUC5AC</i>	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	Възраст	намалена експресия	18	51,39	52,00	17,08	26,00	79,00	0,470
		срединна експресия	26	44,62	44,00	16,75	19,00	85,00	
		повишена експресия	22	46,95	45,00	13,94	24,00	74,00	
Контроли	Възраст	намалена експресия	4	33,00	32,00	3,46	30,00	38,00	n/a
		срединна експресия	7	34,29	28,00	19,05	18,00	74,00	
		повишена експресия	3	28,67	26,00	11,24	19,00	41,00	

Таблица 26. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и възраст; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ). При контролите броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и възрастта на пациентите при групата на пациенти с ХРС.

#### 4.3.2.1.3. Взаимовръзка между ниво на експресия и пол

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и пола на пациентите се направи статистически анализ като за групата на пациенти с ХРС се използва Chi-square test (Таб. 27), а за групата на пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 28).

Група	Пол		RQ- <i>MUC5AC</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
ХРС	Жена	N	4	9	9	22	0,460
		%	22,2%	34,6%	40,9%	33,3%	
	Мъж	N	14	17	13	44	
		%	77,8%	65,4%	59,1%	66,7%	
	Общо	N	18	26	22	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 27. Chi-square test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и пол при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ).

Fisher`s exact test

Група	Пол		RQ- <i>MUC5AC</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
Контроли	Жена	N	1	2	1	4	1,000
		%	25,0%	28,6%	33,3%	28,6%	
	Мъж	N	3	5	2	10	
		%	75,0%	71,4%	66,7%	71,4%	
	Общо	N	4	7	3	14	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 28. Fisher`s exact test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и пол при контролите; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите контроли ( $p>0,05$ ).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и пола на пациентите нито при групата с ХРС, нито при контролите.

#### 4.3.2.1.4. Взаимовръзка между ниво на експресия и субективна симптоматика по SNOT22

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и оценката на субективната симптоматика по SNOT22 се направи статистически анализ с Kruskal-Wallis Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 29).

Група	Показател	RQ- <i>MUC5AC</i>	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	SNOT22 X/110	намалена експресия	18	37,17	33,00	15,03	7,00	65,00	0,283
		срединна експресия	26	43,12	45,50	12,32	16,00	65,00	
		повишена експресия	22	42,09	44,50	14,70	11,00	74,00	
Контроли	SNOT22 X/110	намалена експресия	4	6,00	2,00	9,52	0,00	20,00	n/a
		срединна експресия	7	10,57	8,00	8,70	0,00	24,00	
		повишена експресия	3	18,00	11,00	18,52	4,00	39,00	

Таблица 29. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и оценка по SNOT22; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p>0,05$ ). При контролите броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и субективните оплаквания, оценени с въпросника SNOT22, при групата на пациентите с ХРС.

#### 4.3.2.1.5. Взаимовръзка между нивото на експресия и тютюнопушене

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и тютюнопушенето се направи статистически анализ като за групата с ХРС бе избран тест Chi-square (Таб. 30), а за контролите – Fisher's exact test (Таб. 31).

Група	Пушене		RQ- <i>MUC5AC</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
ХРС	Не	N	10	17	13	40	0,814
		%	55,6%	65,4%	59,1%	60,6%	
	Да	N	8	9	9	26	
		%	44,4%	34,6%	40,9%	39,4%	
	Общо	N	18	26	22	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 30. Chi-square test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и тютюнопушене при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ).

Група	Пушене		RQ- <i>MUC5AC</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
Контроли	Не	N	3	6	2	11	1,000
		%	75,0%	85,7%	66,7%	78,6%	
	Да	N	1	1	1	3	
		%	25,0%	14,3%	33,3%	21,4%	
	Общо	N	4	7	3	14	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 31. Fisher's exact test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и тютюнопушене при контролите; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите контроли ( $p > 0,05$ ).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и тютюнопушенето нито при пациентите с ХРС, нито при контролите.

#### 4.3.2.1.6. Взаимовръзка между ниво на експресия и предходно лечение с назални стероиди

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и предходно лечение с назални стероиди при пациентите с ХРС се направи статистически анализ с Chi-square test (Таб. 32).

Група	Назални стероиди		RQ- <i>MUC5AC</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
ХРС	Не са опитани	N	8	9	8	25	0,811
		%	44,4%	34,6%	36,4%	37,9%	
	Опитани	N	10	17	14	41	
		%	55,6%	65,4%	63,6%	62,1%	
	Общо	N	18	26	22	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 32. Chi-square test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и опитано лечение с назални стероиди; Статистически значима взаимовръзка не се установи ( $p > 0,05$ ).

От резултатите от направения анализ може да се заключи, че предходна терапия с назални стероиди няма съществено влияние върху нивото на експресия на гена за *MUC5AC* или, че поне няма такъв траен ефект.

#### 4.3.2.1.7. Взаимовръзка между ниво на експресия и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и оценката по Lund-Mackay при пациентите, които бяха оценени по скалата, се направи статистически анализ с Kruskal-Wallis Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 33).

Група	Показател	RQ- <i>MUC5AC</i>	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	Lund-Mackay X/24	намалена експресия	6	11,67	10,50	5,28	7,00	22,00	n/a
		срединна експресия	10	13,90	12,00	5,24	8,00	23,00	
		повишена експресия	3	15,67	19,00	9,45	5,00	23,00	
Контроли	Lund-Mackay X/24	намалена експресия	1	7,00	7,00		7,00	7,00	n/a
		срединна експресия	0						
		повишена експресия	1	2,00	2,00		2,00	2,00	

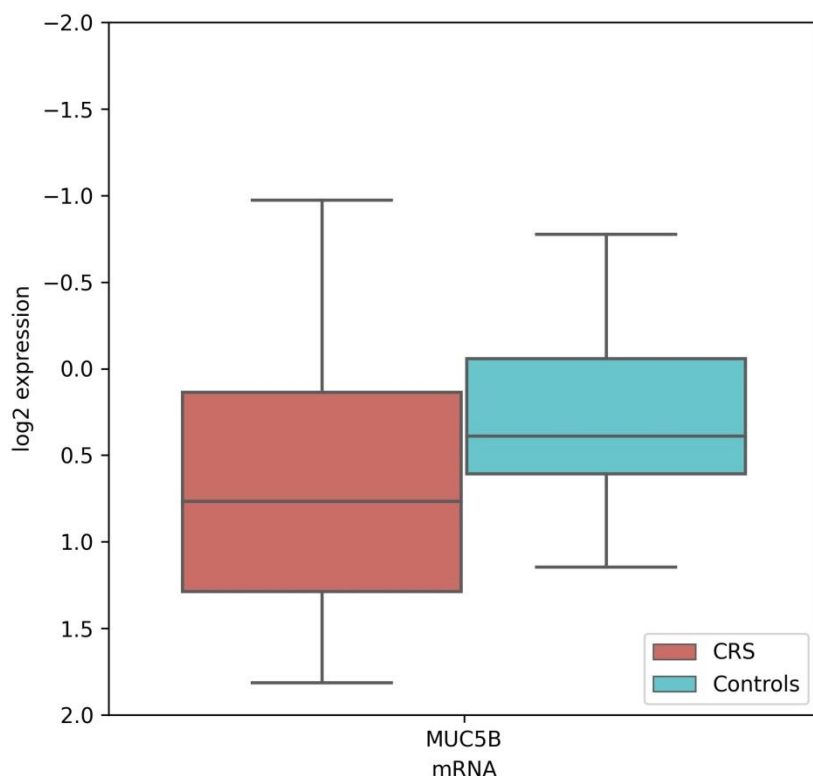
Таблица 33. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и оценка по Lund-Mackay; Както при пациентите с ХРС, така и при контролите, броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

Поради липса на достатъчно данни направеният анализ не позволява формиране на становище за взаимовръзката между нивото на експресия на *MUC5AC* и тежестта на риносинуита, оценена чрез образно-диагностичната скала на Lund-Mackay.

#### 4.3.2.2. Ниво на експресия на *MUC5B* – анализ на данните

##### 4.3.2.2.1. Сравнение на ниво на експресия между пациенти с ХРС и контроли

За да се установи дали е налична свръхекспресията на гена за *MUC5B* при пациентите с ХРС и изобщо какво е нивото му на експресия при пациентите с ХРС и контролите се извърши qRT-PCR на тоталната РНК, изолирана от пробите. Използвахме експресионните нива на house-keeping гена за глицералдехид трифосфат дехидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) като референция. Нивото на експресия на *MUC5B* (Фигура 21) бе сметнато като релативна количествена (relative quantity, RQ) стойност чрез 2- $\Delta\Delta C_t$  метода.



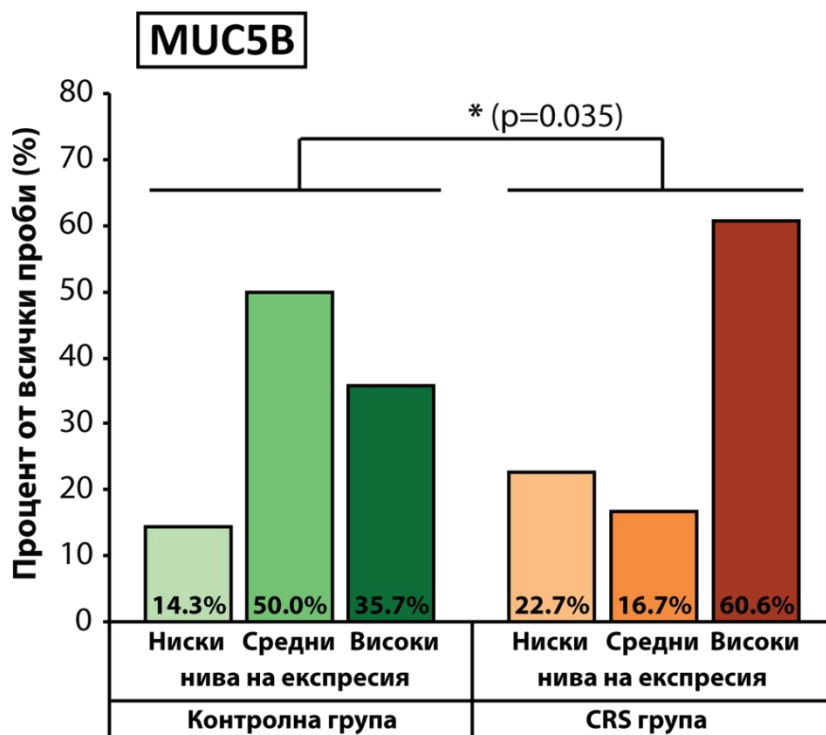
Фигура 21. Съпоставка на логаритмичните стойности на експресията на *MUC5B* между пациенти с ХРС и контроли

За да може щателно да се оцени експресионният профил на пациентите и същевременно резултатите да бъдат представени по начин, лесен за интерпретиране, подобно на други проучвания по въпроса<sup>21,47</sup>, те бяха разделени в три групи според техните RQ стойности – такива с ниска експресия или субекспресия ( $RQ < 0,5$ ), такива със срединна експресия ( $RQ$  стойност в диапазона  $0,5-2,0$ ) и такива с висока експресия или свръхекспресия ( $RQ > 2,0$ ). Установихме, че 2-ма от 14-те пациенти в контролната група (14,3%) и 15 от 66 пациенти в групата с ХРС (22,7%) имат ниско ниво на експресия на гена. Срединно ниво на експресия имаха 7 от 14 контролни пациенти (50%), но само 11 от 66 пациенти с ХРС (16,7%) демонстрираха срединна експресия. Свръхекспресия (високо ниво на експресия) бе установено при 5 от 14 пациенти в контролната група (35,7%) докато при пациентите с ХРС 40 от 66 пациенти (60,6%) свръхекспресираха гена.

Направи се статистически анализ за определяне дали различията в експресията между двете групи са значими. Избра се тест Chi-square (Таб. 34).

RQ- <i>MUC5B</i>		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС		
намалена експресия	N	2	15	17	0,035
	%	14,3%	22,7%	21,3%	
нормална експресия	N	7	11	18	
	%	50,0%	16,7%	22,5%	
повишена експресия	N	5	40	45	
	%	35,7%	60,6%	56,3%	
Общо	N	14	66	80	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 34. Chi-square test за разлика между ниво на експресия на *MUC5B* между пациенти с ХРС и контроли; Установява се статистически значима разлика между двете групи ( $p < 0,05$ ).



Фигура 22. Сравнение на нивото на експресия на *MUC5B* между контролната група и групата с ХРС; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“<sup>39</sup>

Установи се сигнификантна разлика в нивото на експресия между двете групи пациенти (Фигура 22) като процентът на пациенти със повишена експресия на гена за *MUC5B* бе съществено повишен при групата с ХРС спрямо същия процент при контролната група като обратната тенденция може да се види при срединните нива на експресия.

Що се касае до различията между двата субтипа пациенти в ХРС групата – тези с полипи, CRSwNP и тези без полипи – CRSsNP то данните показаха известни разлики, конкретно при групите на пациенти със срединна и с висока експресия. Сред пациентите с CRSwNP със срединна експресия бяха 14,6%, а тези с висока – 62,5%. При пациентите с CRSsNP процентите бяха съответно 22,2% и 55,6% т.е. при пациентите с ХРС с полипоза се наблюдаваше по-честа свръхекспресия спрямо тези без полипоза. Що се отнася до пациентите с ниска експресия то разликите между двете групи бяха минимални – 22,9% при тези с полипи и 22,2% при тези без. Направен бе и анализ, сравняващ тези две подгрупи с пациентите от контролната група.

За установяване на статистически значима разлика по отношение на експресията на *MUC5B* между пациентите с ХРС с полипи и контролите се направи статистически анализ с Fisher's exact test (Таб. 35).

<i>MUC5B</i> експресия		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС с полипоза		
ниска	N	2	11	13	0,028
	%	14,3%	22,9%	21,0%	
срединна	N	7	7	14	
	%	50,0%	14,6%	22,6%	
висока	N	5	30	35	
	%	35,7%	62,5%	56,5%	
Общо	N	14	48	62	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 35. Fisher's exact test за разлика в нивата на експресия на *MUC5B* между пациенти с ХРС с полипоза и контроли; Установи се статистически значима разлика ( $p < 0,05$ )

За установяване на статистически значима разлика по отношение на експресията на *MUC5B* между пациентите с ХРС без полипи и контролите се направи статистически анализ с Fisher's exact test (Таб. 36).

<i>MUC5B</i> експресия		Група		Общо	p
		Контроли	ХРС без полипи		
ниска	N	2	4	6	0,266
	%	14,3%	22,2%	18,8%	
срединна	N	7	4	11	
	%	50,0%	22,2%	34,4%	
висока	N	5	10	15	
	%	35,7%	55,6%	46,9%	
Общо	N	14	18	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 36. Fisher`s exact test за разлика в нивата на експресия на *MUC5B* между пациенти с ХРС без полипи и контроли; Статистически значима разлика не се установи ( $p > 0,05$ )

В заключение статистически значимата разлика (Фиг. 33) между нивата на експресия между пациентите с ХРС и контролите и конкретно силно завишеният процент на пациенти със свръхекспресия сред групата с ХРС, подсилва хипотезата, че свръхекспресията на *MUC5B* е свързана с развитието на хронична патология в областта на носа и синусите. В допълнение резултатите ни показаха, че нивото на експресия и конкретно свръхекспресията на *MUC5B* е в по-голяма и в статистически значима степен свързана с развитието на ХРС при субтипа с полипоза спрямо субтипа без полипи, като при последния значима взаимовръзка не се установи. Фактор за последното вероятно е и по-малкият брой на пациентите в групата без полипоза, тъй като разликата в експресията между тях и контролите е налична и не малка.

#### 4.3.2.2.2. Взаимовръзка между ниво на експресия и възраст

За откриване на значима взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и възрастта на пациентите се направи статистически анализ с Kruskal-Wallis Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 40).

Група	Показател	RQ- <i>MUC5B</i>	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	Възраст	намалена експресия	15	49,47	51,00	19,73	19,00	79,00	0,402
		срединна експресия	11	52,09	46,00	17,23	26,00	85,00	
		повишена експресия	40	45,08	43,00	13,96	21,00	74,00	
Контроли	Възраст	намалена експресия	2	27,50	27,50	9,19	21,00	34,00	n/a
		срединна експресия	7	37,29	32,00	17,81	19,00	74,00	
		повишена експресия	5	28,40	28,00	7,92	18,00	40,00	

Таблица 40. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и възраст на пациентите; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ). При контролите броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и възрастта на пациентите при групата с хроничен риносинусит.

#### 4.3.2.2.3. Взаимовръзка между ниво на експресия и пол

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и пола на пациентите се направи статистически анализ като за групата на пациенти с ХРС се използва Chi-square test (Таб. 38), а за групата на пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 39).

Група	Пол		RQ- <i>MUC5B</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
ХРС	Жена	N	6	3	13	22	0,781
		%	40,0%	27,3%	32,5%	33,3%	
	Мъж	N	9	8	27	44	
		%	60,0%	72,7%	67,5%	66,7%	
	Общо	N	15	11	40	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 38. Chi-square test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и пол при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p > 0,05$ ).

Група	Пол		RQ-MUC5B			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
Контроли	Жена	N	0	2	2	4	1,000
		%	0,0%	28,6%	40,0%	28,6%	
	Мъж	N	2	5	3	10	
		%	100,0%	71,4%	60,0%	71,4%	
	Общо	N	2	7	5	14	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 39. Fisher`s exact test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и пол при контролите; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите контроли ( $p>0,05$ ).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и пола на пациентите нито при групата с ХРС, нито при контролите.

#### 4.3.2.2.4. Взаимовръзка между ниво на експресия и субективна симптоматика по SNOT22

За откриване на значима взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и оценката на субективната симптоматика по SNOT22 се направи статистически анализ с Kruskal Wallis Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 40).

Група	Показател	RQ-MUC5B	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	SNOT22 X/110	намалена експресия	15	38,33	39,00	13,26	14,00	63,00	0,132
		срединна експресия	11	36,00	37,00	11,09	11,00	50,00	
		повишена експресия	40	43,63	46,00	14,53	7,00	74,00	
Контроли	SNOT22 X/110	намалена експресия	2	10,50	10,50	14,85	0,00	21,00	n/a
		срединна експресия	7	9,57	8,00	9,45	0,00	24,00	
		повишена експресия	5	12,80	7,00	14,77	4,00	39,00	

Таблица 40. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и оценка по SNOT22; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p>0,05$ ). При пациентите контроли броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и субективната тежест на оплакванията, оценена с въпросника SNOT22, при пациентите с ХРС.

#### 4.3.2.2.5. Взаимовръзка между ниво на експресия и тютюнопушене

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и тютюнопушенето се направи статистически анализ като за групата с ХРС бе избран тест Chi-square (Таб. 41), а за контролите – Fisher’s exact test (Таб. 42).

Група	Пушене		RQ- <i>MUC5B</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
ХРС	Не	N	9	7	24	40	0,975
		%	60,0%	63,6%	60,0%	60,6%	
	Да	N	6	4	16	26	
		%	40,0%	36,4%	40,0%	39,4%	
	Общо	N	15	11	40	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 41. Chi-square test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и тютюнопушене при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ( $p>0,05$ ).

Група	Пушене		RQ- <i>MUC5B</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
Контроли	Не	N	1	7	3	11	0,115
		%	50,0%	100,0%	60,0%	78,6%	
	Да	N	1	0	2	3	
		%	50,0%	0,0%	40,0%	21,4%	
	Общо	N	2	7	5	14	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 42. Fisher’s exact test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и тютюнопушене при контролите; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите контроли ( $p>0,05$ ).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и тютюнопушенето нито при пациентите с ХРС, нито при контролите.

#### 4.3.2.2.6. Взаимовръзка между ниво на експресия и предходно лечение с назални стероиди

За откриване на значима взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и предходно лечение с назални стероиди при пациентите с ХРС се направи статистически анализ с Chi-square test (Таб. 43).

Група	Назални стероиди		RQ- <i>MUC5B</i>			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
ХРС	Не са опитани	N	5	5	15	25	0,818
		%	33,3%	45,5%	37,5%	37,9%	
	Опитани	N	10	6	25	41	
		%	66,7%	54,5%	62,5%	62,1%	
	Общо	N	15	11	40	66	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 43. Chi-square test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и опитано лечение с назални стероиди; Статистически значима взаимовръзка не се установи ( $p > 0,05$ ).

От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и предходното лечение с назални стероиди при пациентите с ХРС или поне, че последното няма траен ефект.

#### 4.3.2.2.7. Взаимовръзка между ниво на експресия и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay

За откриване на значима взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и оценката по Lund-Mackay при пациентите, които бяха оценени по скалата, се направи статистически анализ с Kruskal-Wallis Test както при пациентите с ХРС, така и при контролите (Таб. 44).

Група	Показател	RQ- <i>MUC5B</i>	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
ХРС	Lund-Mackay X/24	намалена експресия	4	12,25	10,00	6,65	7,00	22,00	n/a
		срединна експресия	4	19,25	20,50	4,50	13,00	23,00	
		повишена експресия	11	11,82	11,00	4,87	5,00	23,00	
Контроли	Lund-Mackay X/24	намалена експресия	0						n/a
		срединна експресия	1	7,00	7,00		7,00	7,00	
		повишена експресия	1	2,00	2,00		2,00	2,00	

Таблица 44. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5B* и оценка по Lund-Mackay; Както при пациентите с ХРС, така и при контролите, броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

Поради липса на достатъчно данни направеният анализ не позволява формиране на становище за взаимовръзката между нивото на експресия на *MUC5B* и тежестта на риносинуита, оценена чрез образно-диагностичната скала на Lund-Mackay.

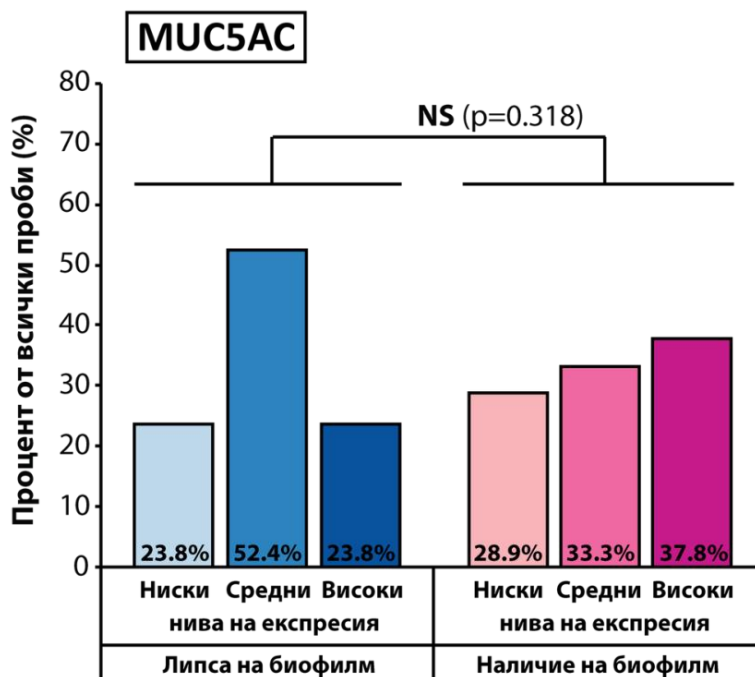
#### 4.3.3. Взаимовръзка между двата фактора при пациентите с ХРС

##### 4.3.3.1. Взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на *MUC5AC*

За установяване на потенциална взаимовръзка между биофилм статуса на пациентите от групата с ХРС и нивото им на експресия на *MUC5AC*, се направи статистически анализ с тест Chi-square (Таб. 45). Резултатите са представени и визуализирани и във Фигура 23.

RQ- <i>MUC5AC</i>		Биофилм		Общо	p
		Не	Да		
намалена експресия	N	5	13	18	0,318
	%	23,8%	28,9%	27,3%	
нормална експресия	N	11	15	26	
	%	52,4%	33,3%	39,4%	
повишена експресия	N	5	17	22	
	%	23,8%	37,8%	33,3%	
Общо	N	21	45	66	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 45. Chi-square test за взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на *MUC5AC* при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка между двата фактора не се установи (p=0,318)

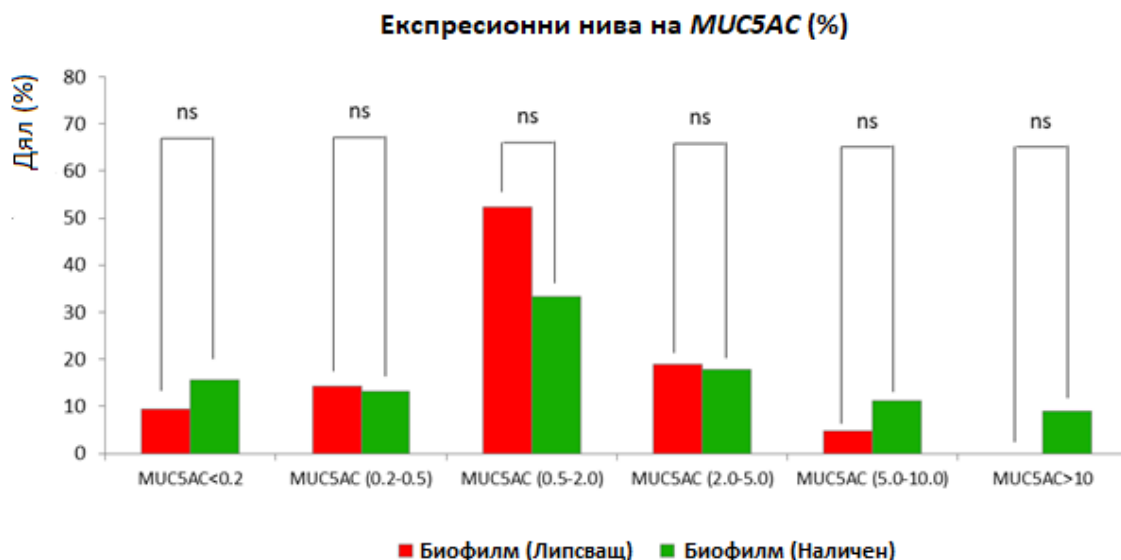


Фигура 23. Анализ на взаимовръзката между наличие на биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* при пациентите с ХРС; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“<sup>39</sup>

В допълнение бе направен и статистически анализ с Chi-square test (Таб. 46) на взаимовръзката между наличие на бактериален биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* като обаче нивата на експресия бяха допълнително разбити на 6 подгрупи: много ниска експресия ( $RQ < 0,2$ ), умерено ниска ( $RQ$  в диапазона  $0,2-0,5$ ), срединна ( $RQ$  в диапазона  $0,5-2,0$ ), умерено завишена ( $RQ$  в диапазона  $2,0-5,0$ ), силно завишена ( $RQ$  в диапазона  $5,0-10,0$ ) и много силно завишена ( $RQ > 10,0$ ). Резултатите са представени и визуализирани във Фигура 24.

<i>MUC5AC</i>		Биофилм		Общо	p
		Не	Да		
<0.2	N	2	7	9	0,623
	%	9,5%	15,6%	13,6%	
0.2-0.5	N	3	6	9	
	%	14,3%	13,3%	13,6%	
0.5-2.0	N	11	15	26	
	%	52,4%	33,3%	39,4%	
2.0-5.0	N	4	8	12	
	%	19,0%	17,8%	18,2%	
5.0-10.0	N	1	5	6	
	%	4,8%	11,1%	9,1%	
>10	N	0	4	4	
	%	0,0%	8,9%	6,1%	
Общо	N	21	45	66	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 46. Chi-square test за взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на *MUC5AC*, разбито в 6 подгрупи; Статистически значима взаимовръзка не се установи ( $p > 0,05$ )



Фигура 24. Взаимовръзка между наличие на бактериален биофилм и експресия на *MUC5AC*, разбита в 6 подгрупи

Отново не се установи статистически значима взаимовръзка между двата фактора ( $p=0,623$ ).

Направен бе и сравнителен анализ на средните стойности RQ на експресията на *MUC5AC* с Mann-Whitney Test (Таб. 47) като обаче отново не се откри статистически значима взаимовръзка.

Показател	Биофилм	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
RQ- <i>MUC5AC</i>	Не	21	1,46	0,72	1,57	0,11	5,21	0,262
	Да	45	3,34	1,55	4,84	0,02	23,75	

Таблица 47. Сравнителен анализ на средните стойности, тест на Mann-Whitney; Не се открива статистически значима взаимовръзка ( $p>0,05$ )

От резултатите от направените анализи може да се заключи, че поне директна взаимовръзка между капацитета за формиране на биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* няма. Възможно е наличие на по-сложна и многофакторна такава, хипотеза, която може да се потвърди или отхвърли с допълнителни бъдещи проучвания.

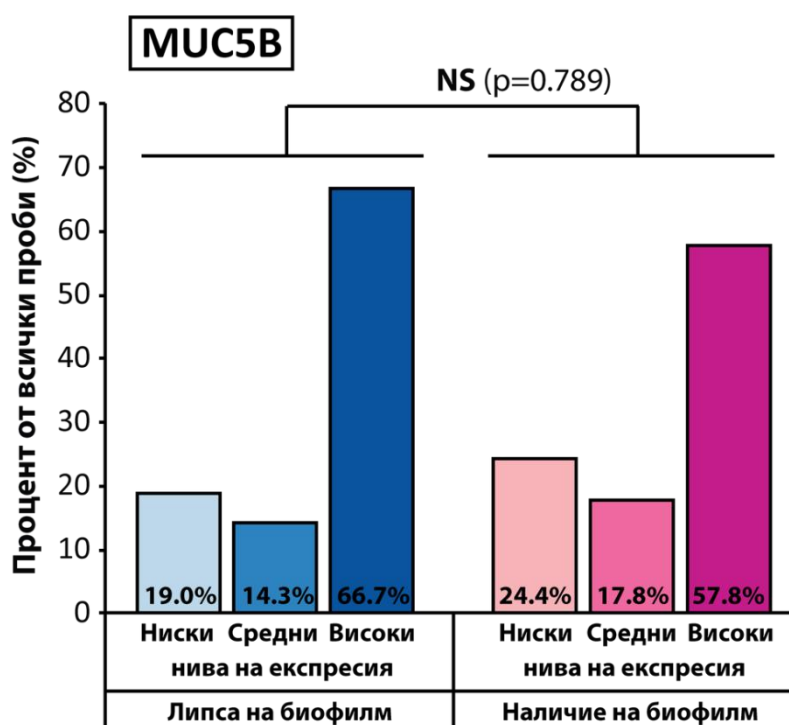
#### 4.3.3.2. Взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на *MUC5B*

За установяване на потенциална взаимовръзка между биофилм статуса на пациентите от групата с ХРС и нивото им на експресия на *MUC5B* се направи ста-

тестически анализ с тест Chi-square (Таб. 48). Резултатите са представени и визуализирани във Фигура 25.

RQ- <i>MUC5B</i>		Биофилм		Общо	p
		Не	Да		
намалена експресия	N	4	11	15	0,789
	%	19,0%	24,4%	22,7%	
нормална експресия	N	3	8	11	
	%	14,3%	17,8%	16,7%	
повишена експресия	N	14	26	40	
	%	66,7%	57,8%	60,6%	
Общо	N	21	45	66	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 48. Chi-square test за взаимовръзка между наличие на биофилм и нива на експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка между двата фактора не се установи ( $p=0,789$ )



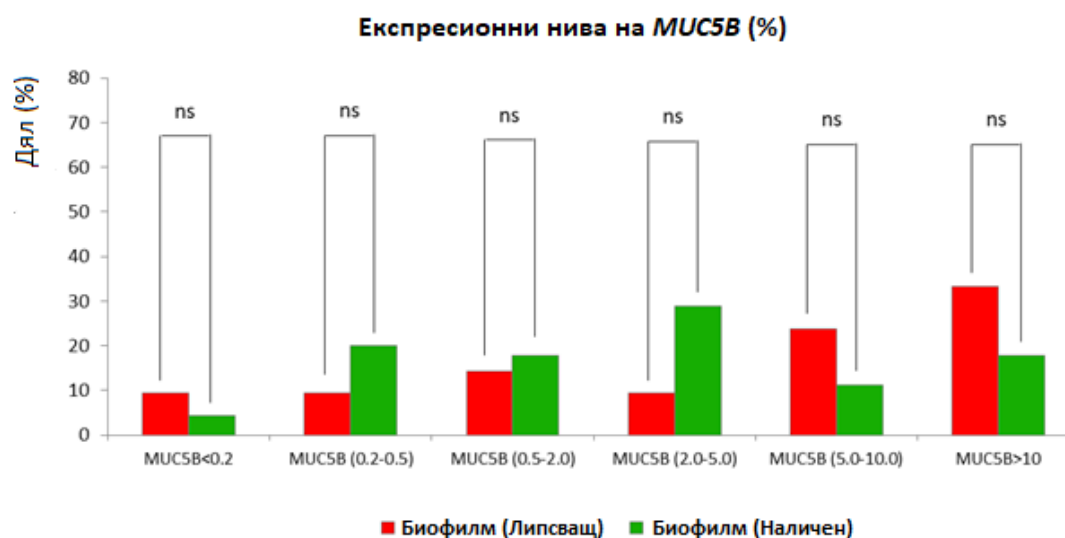
Фигура 25. Анализ на взаимовръзката между наличие на биофилм и нивото на експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“<sup>39</sup>

В допълнение бе направен и статистически анализ с Chi-square test (Таб. 49) на взаимовръзката между наличие на бактериален биофилм и нивото на експресия на *MUC5B* като обаче нивата на експресия бяха допълнително разбити на 6 подгрупи:

много ниска експресия (RQ<0,2), умерено ниска (RQ в диапазона 0,2-0,5), срединна (RQ в диапазона 0,5-2,0), умерено завишена (RQ в диапазона 2,0-5,0), силно завишена (RQ в диапазона 5,0-10,0) и много силно завишена (RQ>10,0) Резултатите са представени и визуализирани във Фигура 26.

<i>MUC5B</i>		Биофилм		Общо	p
		Не	Да		
<0.2	N	2	2	4	0,200
	%	9,5%	4,4%	6,1%	
0.2-0.5	N	2	9	11	
	%	9,5%	20,0%	16,7%	
0.5-2.0	N	3	8	11	
	%	14,3%	17,8%	16,7%	
2.0-5.0	N	2	13	15	
	%	9,5%	28,9%	22,7%	
5.0-10.0	N	5	5	10	
	%	23,8%	11,1%	15,2%	
>10	N	7	8	15	
	%	33,3%	17,8%	22,7%	
Общо	N	21	45	66	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Таблица 49. Chi-square test за взаимовръзка между наличие на бактериален биофилм и експресия на *MUC5B*, разбита в 6 подгрупи; Статистически значима взаимовръзка не се установи ( $p>0,05$ )



Фигура 26. Взаимовръзка между наличие на бактериален биофилм и експресия на *MUC5B*, разбита в 6 подгрупи

Отново не се установи статистически значима взаимовръзка между двата фактора ( $p=0,200$ ).

Направен бе и сравнителен анализ на средните стойности RQ на експресията на *MUC5B* с Mann-Whitney Test (Таб. 50) като обаче отново не се откри статистически значима взаимовръзка.

Показател	Биофилм	N	Mean	Median	SD	Min	Max	p
RQ- <i>MUC5B</i>	Не	21	7,30	5,83	7,43	0,08	26,97	0,360
	Да	45	5,34	2,46	7,31	0,05	31,41	

Таблица 50. Сравнителен анализ на средните стойности, тест на Mann-Whitney; Не се открива статистически значима взаимовръзка ( $p>0,05$ )

От резултатите от направените анализи може да се заключи, че поне директна взаимовръзка между капацитета за формиране на биофилм и нивото на експресия на *MUC5B* няма. Възможно е наличие на по-сложна и многофакторна такава, хипотеза, която може да се потвърди или отхвърли с допълнителни бъдещи проучвания.

## 5. Дискусия

При обзор на публикуваната литература по темата може да се обобщи, че настоящето проучване е първото такова по рода си за България и конкретно по темата за взаимовръзка между бактериалните биофилми и експресията на *MUC5AC* и *MUC5B* – второто в света. Конкретно в български контекст за първи път се доказва биофилм структура в областта на носа и синусите като разработената от нас методология може да се похвали с предимствата, че е относително лесна за изпълнение и напълно повторяема за целите на бъдещи разработки.

Набирането на пациентите за проучването, както и разбира се на самите проби, започна през месец октомври 2019 и продължи до месец юни 2021 включително. В много отношения набирането на по-голям брой проби бе възпрепятствано от няколко вълни на Covid 19, придружени от локдаун и забрана за извършване на планови операции. Анекдотично по същата причина бе възпрепятствано и набирането на по-голям брой контролни пациенти във връзка с ограничаване на дейностите и поведението, генерално водещи до фрактури на носните кости. Въпреки това общият брой пациенти, който успешно бе набран за целите на проучването, а именно – общо 85, е съществен и значително по-голям от бройката пациенти, набрани в множество други чуждестранни проучвания и ни позволи да достигнем до солидни и надеждни резултати.

Самата тематика на настоящето проучване е от голяма важност тъй като хроничният риносинусит е патология с тежки и осезаеми последици, както социални<sup>5,48</sup>, така и икономически<sup>3,49</sup>. Множество фактори биват посочени като допринасящи за развитието на болестта като например експозиция към цигарен дим<sup>50</sup>, независимо дали активна или пасивна, алергия<sup>38,51,52</sup>, бактериални суперантигени<sup>53,54</sup> и особености на локалния климат и географското разположение<sup>2</sup>. В допълнение участие и принос на бактериални биофилми често бива обсъждано като фактор, който води до хронификация на възпалителни заболявания на носната кухина и синусите, като присъствието на такива в патологично променени тъкани на пациенти с ХРС е било откривано многократно<sup>10,14,23,24,31</sup>. Друг често цитиран фактор за хронификация е нарушената регулация на муциновата експресия от лигавицата на носа и синусите<sup>19,20</sup>.

Дали и как тези последни два фактора са свързани един с друг е до голяма степен непозната територия. От *in vitro* проучвания, правени по темата има докладвани данни, че повишено количество на муцини може да стимулира образуването на бактериален биофилм<sup>22</sup>, както и че присъствието на муцини е важен и благоприятстващ фактор за развитието и оцеляването на бактериален биофилм<sup>55,56</sup>. Две изследвания с реални пациенти пък докладват, че *in vivo* има взаимовръзка между качество и структура на муцините<sup>24</sup> или тяхното количество и експресия<sup>23</sup> и наличието на бактериален биофилм при пациенти с хроничен риносинусит. Същевременно има хипотеза и че наличието на бактериален биофилм по лигавицата на дихателните пътища може да стимулира повишена експресия на муцини<sup>25,26</sup> т.е. обратна на описаната по-горе причинно-следствена връзка. Може разбира се да се спекулира, че и двете хипотези са верни, при което може да се говори за порочен кръг.

Съществуват данни обаче и за обратната зависимост – че муцините предпазват лигавицата от колонизация с бактерии и предотвратяват развитието на бактериален биофилм<sup>57-60</sup>, както и че муцини имат отношение и принос към разбиване или дисоциация на формиран се вече биофилм<sup>61</sup>. В такъв контекст може да се спекулира, че повишеното ниво на експресия на някои муцини при хронични заболявания и конкретно при наличие на бактериални биофилми е всъщност не патологична реакция, а такава, целяща премахване на бактериалната колонизация и в този смисъл да е ползотворна реакция на организма срещу биофилма.

Натрупването на допълнителна информация по темата и по-категоричното установяване дали има взаимовръзка между колонизацията на лигавицата на горния дихателен път и експресионния профил на муциновите гени и съответно количеството продуцирани муцини, освен чисто теоретичен принос би могло да има съществени практически приложения. Експресионният профил за муциновите гени в такъв контекст би могъл да има предиктивна стойност за очакван резултат от хирургично лечение и следоперативно възстановяване, както и за установяване при кои пациен-

ти може да се очаква по-лош следоперативен резултат в резултат на настъпваща реколонизация на лигавицата. Установяването на дисрегулация на муциновата експресия би могло да послужи като важна индикация за предпочитане на хирургично лечение, а от своя страна рутинното навлизане на диагностиката за бактериални биофилми би могла да служи дори за интраоперативна преценка за това доколко радикална да е ендоскопската хирургия. Натрупването на данни и информация за това защо някои пациенти имат предиспозиция за формиране на бактериални биофилми по лигавицата на дихателните им пътища и съответно за развитие на хронични възпалителни процеси, ще е ключова стъпка за по-цялостното разбиране на въпроса и с времето – неговото разрешаване.

Изводите до които ние достигнахме в някои отношения потвърждават, а в други противоречат на преобладаващите хипотези.

По отношение на бактериалните биофилми нашите резултати разкриха сигнификантно по-голям дял от пациенти с наличие на биофилм сред групата на пациенти с ХРС в сравнение с пациентите от контролната група (68,2% и 28,6% съответно) (Фигура 30). За отбелязване е, че процентът на пациенти с ХРС, при които установихме бактериален биофилм е в диапазона, съобщаван в предишни проучвания по въпроса макар да трябва да се отбележи, че въпросният процент може да варира в широки граници в зависимост от дизайна на проучването и използвания метод – от 25% до 92%<sup>10</sup> като в едно проучване, конкретно при пациенти с ХРС с полипи е докладвана честота от 97,1%<sup>62</sup>. По отношение на различията между пациентите с ХРС с полипи и тези с ХРС без полипи, то при нас резултатите показаха минимална разлика – положителни на биофилм бяха съответно 68,75% и 66,67%. Подобни близки или относително близки резултати са достигани и в други проучвания, разглеждащи тези две субгрупи поотделно<sup>62-64</sup>. Нашите резултати потвърждават все по-силно застъпената хипотеза, че е възможна причинно-следствена връзка между формирането на бактериален биофилм и хронификацията на един синусит, независимо от типа му, и превръщането му в хроничен риносинусит. В тази връзка рутинната оценка на биофилм статуса на пациентите може в бъдеще да се докаже като важна част от клиничната оценка при ХРС и при други хронични патологии.

Дискусия заслужават и установените взаимоотношения на бактериалните биофилми с другите изследвани фактор – възраст, пол, субективни оплаквания, тютюнопушене, предходно лечение с назални стероиди и образно-диагностична находка и оценка. За нито един от тези фактори ние не установихме сигнификантна взаимовръзка с биофилм статуса на пациентите. По отношение на възрастта и пола тези находки са сходни с други проучвания<sup>29,64</sup>. Относно връзката на субективните оплаквания, оценени с въпросника SNOT и наличието на биофилм има разнопосочни като резултат проучвания – такива установяващи връзка<sup>65</sup> и такива, които не установяват съществена такава<sup>66</sup>. По отношение на тютюнопушенето като фактор за

формирани на биофилми се спекулира, че увреждането на мукоцилиарния клирънс и микрочастиците от дима, даващи залавно място за бактериите са причините, водещи до повишено колонизиране от биофилми. Има и немалко проучвания, установяващи статистически значима връзка между наличие на биофилм и тютюнопушене<sup>45,46,67</sup>. Нашите резултати обаче не показаха такава (Таб. 22, Таб. 23). Въпреки това всички пациенти пушачи бяха насърчени да се откажат от навика си. Може обаче да се отбележи, че 20 от 26 (76,92%) пушачи имаха биофилм, докато при непушачите процентът на пациенти с биофилм е по-малък – 25 от 40 или 62,5%. Тази разлика ни кара да мислим, че в бъдещи проучвания с например по-големи пациентски кохорти, е възможно да се установи статистическа значимост. Лечението с назални стероиди преди операцията е било проучвано и в други трудове като при един от тях не се установява сигнификантна взаимовръзка между него и наличието на биофилм<sup>31</sup> докато при друго такава се установява<sup>64</sup>, но в него се касае за употреба на стероиди в месеца преди операцията. Ние не установихме зависимост между двете (Таб. 24), като обаче е важно да се каже, че макар лечението с назални стероиди при нас да не бе конкретизирано, при мнозинството от пациенти не се касаеше за такова в седмиците, предхождащи операцията и това лечение като цяло не бе стандартизирано. Въпросът остава отворен и натрупването на данни в бъдеще ще е от значение за установяване на отговора. Зависимост не се установи и между наличието на биофилм и оценката по Lund-Mаскау при пациентите с ХРС, но извадката е действително твърде малка и за по-щателен и солиден анализ има нужда от по-голям брой пациенти. В литературата има проучвания, които не установяват зависимост между двата фактора<sup>68</sup>, но по-голям брой са тези, установяващи такава<sup>69,70</sup>. В заключение ние не установихме значима връзка на наличието на биофилм с друг фактор освен със самата диагноза ХРС, като тези данни добавят към световната база данни по този все още напълно отворен въпрос.

По отношение на нивата на експресия на гените за *MUC5AC* и *MUC5B* нашите резултати не са толкова еднозначни колкото наблюденията ни за бактериалните биофилми. За да можем щателно да проучим възможната взаимовръзка между експресията на *MUC5AC* и *MUC5B* и хроничния риносинусит ние разделихме резултатите на пациентите и за двата гена в три групи съобразно околичествяващия показател RQ – такива с ниска, такива с средина и такива с висока експресия. Въпреки че не установихме съществена разлика между пациентите с ХРС и контролите по отношение на експресията на *MUC5AC* ( $p=0,703$ ) е важно да се отбележи, че установихме по-висок процент на проби с висока експресия или свръхекспресия и по-нисък процент на проби със средина експресия сред пациентите с ХРС в сравнение с контролите (Фигура 32). В допълнение анализирани бяха поотделно двете субгрупи на пациенти с ХРС – тези с назална полипоза (CRS<sub>swNP</sub>) и тези без назална полипоза (CRS<sub>ssNP</sub>). Статистически значима разлика в нивата на експресия спрямо контролите не се установи за нито една от тези две групи (Таб 27, Таб. 28)

като за отбелязване е, че по-близко до статистически значима разлика е подгрупата на пациенти с CRSsNP ( $p=0,400$  срещу  $p=0,927$  при пациентите с CRSwNP) като пациентите без полипи демонстрират и по-висок процент на повишена експресия (34,4%) в сравнение с тези с полипоза (27,4%). Увеличаването на броя пациенти в бъдещи проучвания по въпроса би могло да подсили всяко едно от гореописаните наблюдения и да установи статистически значима разлика или обратното – да потвърди липсата на такава.

Същевременно що се касае до резултатите по отношение на *MUC5B* то ние установихме статистически значима разлика ( $p=0,035$ ) между пациентите с ХРС и контролите като при първите процентът на пациенти с висока или свръхекспресия на гена е сигнификантно завишен спрямо контролите, а процентът на пациенти със срединна експресия е сигнификантно по-малък (Таб. 37, Фигура 34). Тези резултати са допълнителен аргумент за хипотезата, че свръхекспресията на *MUC5B* е фактор за развитието на хроничен риносинусит или обратното – че *MUC5B* може да служи като протективен фактор и увеличената му продукция всъщност да е „положителна“ реакция на лигавицата<sup>60</sup>. Любопитно наблюдение е, че при разбиване на пациентите с ХРС на подгрупи – такива с полипоза и такива без, анализите (Таб. 38 и Таб. 39) показаха, че при първите има статистически значима разлика в нивата на експресия спрямо контролите ( $p=0,028$ ), докато при вторите такава няма ( $p=0,266$ ). Редно е обаче да се отбележи, че разликите в нивата на експресия между самите две групи бяха относително малки – 22,9% срещу 22,2% пациенти с ниска експресия, 14,6% срещу 22,2% със срединна и 62,5% срещу 55,6% с висока експресия съответно. Съответно разликата в статистическата значимост при сравнението с контролните пациенти вероятно до голяма степен се дължи просто на по-малкият брой пациенти в групата без полипи – 18 (48 при тези с полипи), което не предразполага към статистически значими резултати и по-обстойни коментари.

Друг детайл, който заслужава коментар, е относително голямото разнообразие на нивата на експресия на анализиранияте гени при контролната група или иначе казано – същественият процент на проби с ниска или субекспресия – 28,6% за *MUC5AC* и 14,3% за *MUC5B*, както и процентът на проби с висока или свръхекспресия – 21,4% за *MUC5AC* и 35,7% за *MUC5B*, вероятно се дължи на различни фактори. Установено е, че нивата на експресия и на двата гена могат да се променят при астма<sup>17,26,71</sup> или кистична фиброза<sup>26,72</sup> (муковисцидоза), по време на и след определени инфекции<sup>73-75</sup>, както и поради тютюнопушене<sup>25,76</sup>. По отношение на последното обаче нашите данни не показаха съществена взаимовръзка между нивото на експресия и пушенето. В допълнение е напълно възможно относително широкият диапазон на нивата на експресия да се дължи на индивидуални особености и експресията на муцините като цяло да е силно вариабилна в човешката популация. Потвърждаването или оборването на последната хипотеза може да бъде разкрито с

обстойни бъдещи проучвания и би имало отношение и към начина на структуриране на бъдещи проучвания, касаещи конкретно ХРС.

По-детайлна литературна справка конкретно по въпроса за муциновата експресия и връзката ѝ с ХРС показва сходно наличие на разнообразни резултати. В обзорна статия<sup>21</sup> разглеждаща ролята на *MUC5AC* в развитието на ХРС са цитирани 20 статии по темата, от които в 13 се съобщава за сигнификантно повишена експресия<sup>19,20,23,32,35,37,77-83</sup>, в 4 не се съобщава за сигнификантна разлика между пациенти с ХРС и контроли<sup>84-87</sup> и в 3 статии се докладва намалена експресия на *MUC5AC* в пациентите с ХРС<sup>18,88,89</sup>. По отношение на *MUC5B* в същия обзор се цитират 14 статии, от които 9 докладват увеличена експресия при пациентите с ХРС<sup>18-20,23,37,79,85,90,91</sup>, в 4 не се установява сигнификантна разлика между пациентите с ХРС и контролите<sup>86,87,92,93</sup> и в една се рапортува намалена експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС в сравнение с контролната група<sup>88</sup>. Редно е да се отбележи, че в цитираните проучвания има многообразие от дизайни и методология<sup>21</sup>. Темата допълнително се усложнява от факта, че до момента дискутирани са само два от муцините. Други секреторни муцини като *MUC2*, *MUC6*, *MUC7*, *MUC8*, макар и по-малко изучавани, е възможно също да допринасят за развитие и хронификация на риносинуситите. По отношение на първият от изброените муцини – *MUC2*, наблюдаваните в обзора<sup>21</sup> данни са отново нееднозначни – 3 от разгледаните проучвания установяват повишена експресия в сравнение със здрави контроли<sup>90,94,95</sup>, а друго 1 установява намалена такава<sup>78</sup>. За *MUC6*, който основно се експресира в гастроинтестиналния тракт е докладвано едно проучване, разглеждащо нивата му при болести на синусите и е установена не увеличена, а намалена експресия при антрохоанални полипи<sup>18</sup>. *MUC7* и *MUC8* са муцини, които основно се експресират в тъканите на белите дробове; по отношение на приноса им за хронична патология на носа и синусите за *MUC7* се докладват две проучвания, установяващи увеличена експресия<sup>79,96</sup> и едно, в което не се установява такава<sup>93</sup>, а за *MUC8* – 5, при които се установява увеличена експресия на муцина при пациентите с ХРС спрямо контроли<sup>79,88,89,94,97</sup> и едно, при което се установява намалена такава<sup>18</sup>.

От всичко изложено до тук става видно, че взаимовръзката между нивото на експресия на муцините и ХРС далеч не е праволинейно и за категорична причинно-следствена връзка е трудно да се говори. В този контекст нашите резултати са важен принос към световната информация по темата и ще бъдат полезни за разглеждане за всички бъдещи изследователи.

Коментар и дискусия е редно да се направи и по отношение на взаимоотношенията на нивото на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B* с останалите документирани фактори – възраст, пол, субективна симптоматика, тютюнопушене, употреба на назални стероиди и образно-диагностична находка. Нашите резултати не откриха сигнификантна взаимовръзка между нивото на експресия на нито един от двата муцина и

който и да е от посочените фактори като това в много отношения потвърждава данни от световната литература, докато в други им противоречи. По отношение на факторът възраст има множество проучвания, които не установяват взаимоотношение между нея и експресията и количеството на *MUC5AC* и *MUC5B*<sup>98-102</sup>, както и някои, които установяват известна зависимост<sup>103,104</sup>, но всички цитирани не са с пациенти с риносинуит и релевантността им към нашите резултати е малка. Полът е фактор, за който данните като цяло са, че няма отношение към експресията на муцините<sup>98-100,102</sup>, което съвпада и с нашите резултати, но отново трябва да се отбележи, че цитираните проучвания не са върху пациенти с риносинуит. Взаимовръзката на субективните оплаквания на пациентите, които ние оценихме с въпросника SNOT22, с нивото на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B*, учудващо се оказва тема, по която не могат да бъдат намерени статии, в които да се осъществява статистически анализ. В контраст, за тютюнопушенето като фактор, който води до промяна в експресията на муцините, има немалко данни, като любопитното е, че преимуществено се докладва повишаване на експресията на *MUC5AC* в следствие на цигарен дим<sup>25,47,76,105,106</sup>, докато за *MUC5B* не се установява такъв ефект<sup>47,106</sup>. Нашите резултати не доказаха взаимовръзка на нито един от двата муцина с фактора тютюнопушене, като в допълнение конкретно свръхекспресията сред пушачите както сред пациентите с ХРС, така и сред контролите бе осезаемо по-голяма като процент за *MUC5B* (61,5% и 66,6% съответно) отколкото за *MUC5AC* (34,6% и 33,3% съответно), което наемква обратното на данните от цитираните трудове. Друг фактор, който е бил проучван от други автори е ефектът на лечението с топикални стероиди върху експресията на муцини. Има данни, че такова лечение намалява експресията на *MUC5AC*<sup>21,71,88</sup> и на *MUC5B*<sup>88</sup>; при нашите пациенти обаче такава взаимовръзка не се установи като обаче е важно отново да се подчертае, че употребата на стероиди при тях не е била скорошна или стандартизирана по какъвто и да е начин. Последният фактор, който оценявахме при нашите пациенти – образно-диагностичната находка и оценка по Lund-Mackay и отношението ѝ към експресията на муциновите гени е тема, по която не открихме проведени анализи в литературата, въпреки че в предходни проучвания за муцини пациентите са били оценявани по тази скала<sup>19,23</sup>. Броят пациенти, оценени по тази скала, с които проведохме този анализ (Таб 36, Таб 47), е, за съжаление, недостатъчен и изводи не могат да бъдат правени.

В заключение единствената положителна взаимовръзка, която установихме беше повишеното ниво на експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС и при подгрупата на пациенти с ХРС с назална полипоза. Това, както и липсата на други зависимости що се касае до муциновата експресия, е информация, която е ценна добавка към научната база данни по въпроса като разбира се бъдещи проучвания и особено такива с по-голям брой пациенти биха могли да затвърдят или да оспорят откритото.

За да бъдат комбинирани данните от двата клона на проучването ни и за да установим евентуално наличие на връзка между тях ние проведохме анализ за установяване на взаимовръзка между наличието на биофилм и нивото на експресия на муциновите гени в кохортата ни от пациенти с ХРС (Фиг. 35, Фиг. 37). Не установихме статистически сигнификантна такава нито за *MUC5AC* ( $p=0,318$ ), нито за *MUC5B* ( $p=0,789$ ), въпреки че се наблюдаваше по-висок процент на пациенти със свръхекспресия на *MUC5AC* сред пациентите имащи и бактериален биофилм (Фиг. 35). Тези наблюдения са аргумент в полза на хипотезата, че ако има взаимовръзка между наличието на бактериален биофилм и нивото на експресия на муциновите гени, то тя не е праволинейна и е вероятно значително по-многофакторна.

Друга находка, която може да бъде коментирана, е броят на позитивни за бактериален биофилм пациенти, които същевременно имат и свръхекспресия на всеки един от двата изследвани гена. Само 17 от 45 пациенти (37,8%), при които се установи наличие на биофилм имат същевременно и свръхекспресия на гена за *MUC5AC*, докато процентът на биофилм-позитивни пациенти със свръхекспресия на *MUC5B* е по-голям – 26 от 45 (57,8%). Тези относително ниски проценти (под 50% и малко над 50% съответно) в комбинация с относително високият процент на пациенти със свръхекспресия, които имат същевременно и бактериален биофилм – 17 от 22 (77,27%) за *MUC5AC* и 26 от 40 (65%) за *MUC5B*, въпреки липсата на статистически сигнификантна връзка, могат да ни накарат да спекулираме, че ако между двата фактора има връзка, то тя е, че свръхекспресията на кой да е от двата муцинови гена е рисков фактор за образуването на бактериален биофилм. Обратната хипотеза – че колонизацията на лигавицата с бактериален биофилм води до повишаване на експресията на муциновите гени, въпреки че е обсъждана в предишни проучвания по въпроса<sup>25,26</sup>, изглежда по-малко вероятна поне според получените резултати.

В този контекст е интересно сравнението на резултатите от настоящето проучване с тези на проучване по същата тема на Mao et al. От 2015<sup>23</sup>, в което се достига до различаващи се резултати и заключения. По-конкретно в него се докладва, че повишените нива на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B* са асоциирани с формиране на бактериални биофилми при пациенти с ХРС. Различията в достигнатите резултати в двете проучвания може да се дължат на различната методология, пациентските групи и т.н.. На първо време може да се обсъди мястото на биопсията - *processus uncinatus* в нашето проучване и по-големият набор от места за биопсия, които са избрани от Mao et al – *processus uncinatus*, лигавица от предните и задните етмоидални синуси, както и лигавица от максиларен синус. Ние бихме изложили хипотезата, че избирането на единствено място за биопсията е преференциално, тъй като осигурява повтораемост на резултатите, а и в допълнение е зона, която може да бъде биопсирана при контролна група за разлика от лигавицата на самите синуси. По отношение на последното допълнителна разлика между двете проучвания е наличието на контролна група в нашия случай (макар и само от 14 души) и

липсата на такава в проучването от 2015. Различава се съществено и общия брой на пациенти с ХРС, които са били набрани – докато Мао et al публикуват резултати за група от 24 пациенти, то нашата група на пациенти с хроничен риносинуит наброява ефективно 66 (след изключването на 5 от началните 71 души) и поради това има по-голяма представителност. Като трета ключова разлика могат да бъдат посочени различните методи за установяване на бактериален биофилм – в нашия случай SDCM с багрилото BacLight Live/Dead™ поради надеждността му наред с другите му качества<sup>10,41</sup>, а в статията на другия екип се цитира употреба на SEM. Процентът на позитивни за биофилм проби при двете проучвания се различава осезаемо – 68,2% при нас срещу 54,17% за проучването на Мао като обаче и двете са в посочените по-горе широки граници от 25%-92%<sup>10</sup>, които са били установявани в различни трудове. Разликата в случая може и е вероятно да се дължи освен на релативно по-голямата чувствителност на SDCM с BacLight Live/Dead™, така и на разлики от избраното място за биопсия, което вече бе коментирано. Четвърта разлика е методът за установяване на количеството на муцините в пробите – ние използваме qRT-PCR за да оценим самата експресия на гените за *MUC5AC* и *MUC5B* докато въпреки че Мао et al докладват резултатите за експресия те всъщност я определят индиректно, използвайки имунохистохимия, за да оценят присъствието на самите муцини.

Допълнително изследване, което е интересно да се коментира в контекста на взаимовръзката между бактериален биофилм и муцините, секретирани от лигавицата в носа и синусите е това на Tan et al<sup>24</sup> от 2010. Разликата при него е, че се обсъжда друг муцин – *MUC7* и същевременно не се обсъжда и проучва неговото количество или нивото му на експресия, а аберантна модификация в негов терминален сиалов остатък, която евентуално би стимулирала формиране на бактериален биофилм. Във въпросната статия се докладва сигнификантна взаимовръзка между въпросната модификация и наличието на бактериален биофилм и се дискутира, че създаване на лекарство, което да е конкурентен агонист на модифицирания остатък би могло да предотврати свързването на бактериите към същинските муцини, като вместо това те да се свързват към внесенния лиганд и в следствие да бъдат елиминирани от мукоцилиарния клирънс<sup>24</sup>.

Както е видно от всичко изложено по-горе, темата за бактериалните биофилми в контекста на хроничния риносинуит, както и за факторите, влияещи върху формирането на биофилмите, е просторна и същевременно недостатъчно изучена. Ключов фактор, който може да умножи важността на проучванията по темата, е разработването на надежден и ефективен метод за справяне с такъв тип инфекции. Литературна справка показва, че са правени и все още се правят проучвания във всякакви насоки за откриване на оптимален лечебен план и метод за справяне с казуса. Условно насоките могат да бъдат разделени в три основни групи – антимикробни и

антибиотични препарати, методи за превенция на формирането на биофилм и методи за разбиване на формирани вече биофилми.

Методите за директно антибактериално въздействие и елиминиране на бактериите в биофилма чрез антибиотици са едни от най-класическите. Въпреки високото ниво на резистентност и свойството толерантност биофилмите все пак показват известна чувствителност към третиране с антибактериални средства. Активно се проучват различни антибиотици или начини за доставянето им до колонизираните тъкани, чрез което ефективността на терапията да бъде повишена. Макролидите например са едни от най-често цитираните<sup>11</sup> антибиотици като средство за избор при налична биофилм инфекция, като се спекулира, че те инхибират производството на молекули, нужни за осъществяване на quorum sensing механизма<sup>107,108</sup>. Генерално обаче, макар да се установява краткосрочно подобрене, дългосрочните ефекти се оказват незначителни<sup>109</sup>. Друга опция за третиране на биофилми с антибиотици е локалното им доставяне. Проучвания, изучаващи ефекта на локален (топикален) ципрофлоксацин, ванкомицин и мупироцин са показали незадоволителен ефект<sup>110</sup>. В допълнение към проучванията за антибиотична борба с биофилмите, се разработват и проучват неантибиотични антибактериални методи. Веществото N,N-дихлоро-2,2-диметилуридин (NVC-422) например е синтетичен вариант на вещество, което се отделя при фагоцитоза на микроби и е показало ефективност срещу различни бактериални видове, а и срещу някои вируси<sup>111</sup>. Проучванията с него обаче са твърде малко за по-дефинитивни заключения<sup>11</sup>. Друг често цитиран и проучван продукт с анти-микробно действие е медът от манука (или манука мед). Въпросният е натурален продукт от Нова Зеландия, чиято активна съставка- метилглиоксал – има бактерицидни свойства. Към момента има малко на брой проучвания върху ефективността му, които докладват обнадеждаващи данни<sup>112,113</sup>, но повече и по-задълбочени изследвания са необходими за по-сигурни заключения. Слаби органични киселини като например оцетната киселина и лимонената киселина от столетия се ползват за консервиране на храни и за дезинфекция<sup>114</sup>. Добрият им антибактериален ефект се отдава на наличието на относително хидрофобен органичен остатък в добавка към карбоксилната им група, който им позволява да преминават успешно през бактериалната мембрана и карбоксилната им група да претърпи дисоциация вътреклетъчно, което в крайна сметка води до клетъчна смърт<sup>114</sup>. Пореден препарат, даващ надежди за успешно елиминиране на биофилми, е колоидалното сребро. За него е докладвано намаляване на биомасата на ББФ с до 99,8% при приложението му при пациенти с ХРС<sup>115</sup>, което дава нелоша опция за лечение на такива пациенти. Друга насока, в която има изследвания са пробиотични препарати, с които се цели подмяна на патогенните щамове с по-бенигни такива. Правени са опити за такова лечение с щамове на *Lactobacillus* както *in vitro*<sup>116</sup>, така и *in vivo* при пациенти с ХРС<sup>117</sup>, като обаче при по-важното проучване *in vivo* ефектът не е бил съществен и задоволителен. Поредна насока за бактерицидно въздействие върху

формирали се биофилми, която е под активно проучване, е използването на фотодинамична терапия. В проучване с модел на синуси и биофилм фотодинамичната терапия се е показала като ефективна за намаляване на размера на биофилма<sup>118</sup> и същевременно друго проучване по темата на същия екип е показало, че такъв тип терапия е безопасен за мукозата и клетките ѝ<sup>119</sup>. Тази терапевтична опция е обаче все още в експериментална фаза и рутинно клинично приложение не се среща. Спекулира се също така и с използване на вируси – бактериофаги като начин за ерадикация на бактерии, формирали биофилм<sup>114</sup>.

Втора главна насока за противодействие на биофилмите е недопускане на формирането им на първо време. В това отношение ключово е потискането на quorum sensing механизма. Изследвани са множество молекули, които биха могли да помогнат за осъществяване на целта, като например инхибитори на ацил-хомосерин лактон (AHL), важна молекула в quorum sensing механизма при *P. aeruginosa*<sup>120</sup>, активатори или заместващи молекули при генетични дефекти на ключовия за потискане на AHL рецептор T2R38<sup>120</sup>, макролиди и конкретно азитромицин, който има in vitro свойството да потиска AHL<sup>108</sup>, както и разграждащите AHL ензими параоксонази<sup>121</sup>. Всички тези молекули и подходи обаче са все още са генерално във фаза на in vitro изпитвания и приложението им в рутинната клинична практика не изглежда близо<sup>11</sup>.

Третата главна насока за противодействие на биофилмите е разбиването на съществуващите и образували се вече такива. Механичното разбиване на биофилми с промивки с физиологичен разтвор не се е оказало особено ефективно, въпреки че предвид цената му и другите му ползи, остава незаменима част от комплексното лечение на ХРС<sup>122</sup>. Активно се проучва ефективността на повърхностно-действащи вещества или сърфактанти за разбиване на биофилми. Относително известна е опцията за добавяне на промивки с 1% разтвор на бебешки шампоан<sup>123–125</sup> при пациенти с ХРС. Установено е, че in vitro шампоанът успешно разбива биофилм, както и че при 46,6% от пациентите, ползващи такива промивки се подобрява средната SNOT22 оценка. Същевременно ефектът от метода не винаги се е показвал като достатъчно отчетлив и задоволителен като дава и голям процент нежелани реакции като алергия, парене в носа и главоболие<sup>126,127</sup>. Опити са правени и с специфично разработени за целта сърфактанти като например лимонена киселина/цвитерйонен сърфактант (citric acid/Zwitterionic surfactant, CAZS), както и с препаратът SinuSurf. И в двата случая въпреки докладван отличен ефект in vitro<sup>128,129</sup> е имало данни за токсични реакции<sup>128</sup> и увреждане на ресничестия епител и съответно – на мукоцилиарния клирънс<sup>130</sup>, поради което препаратите не се ползват в клиничната практика<sup>11</sup>. Освен методи за механично и химично разбиване на биофилми са правени проучвания и с ензими, целящи разграждане на елементи на матрикса. Такива ензимни препарати са например Dispersin-B<sup>131</sup>, който разгражда поли-N-ацетилглюкозамин – полизахарин, произвеждан от *S. aureus*, както и ензи-

мът NucB<sup>132</sup> – нуклеаза, разграждаща извънклетъчното ДНК на ББФ. И двете съединения са показали обещаващи резултати *in vitro*<sup>131,132</sup>, но е нужно по-обстойно тестване, вкл. такова върху пациенти, за да се прилагат рутинно в клиничната практика<sup>11</sup>. От по-стандартно използваните в клиничната практика муколитици, има данни, че N-ацетилцистеинът има добър ефект за разбиване на бактериални биофилми<sup>115</sup> и бива препоръчан като адювантно лечение при ХРС<sup>115</sup>.

В заключение лечението на бактериалните биофилми, включително в контекста на хроничния риносинусит е обширна тема, в която както непрестанно се подлагат на изследване различни познати методи и молекули, така и активно се разработват и тестват нови такива. Предвид че към момента не е открит единичен надежден и високоефективен метод проучванията по въпроса вероятно ще продължат и в следващите години и десетилетия. Откриването на такъв метод радикално би променило подхода ни към пациентите с хроничен риносинусит, включително би наложило изисквания за рутинно тестване на пациентите с тази патология за наличие на биофилм. В този контекст важни измерения ще придобият въпроси като бързина, надеждност и лесно приложение на метода. Тук може да бъде споменато и разработването на относително бърз тест за бактериален биофилм или по-конкретно за съставно вещество (екзополизахарид) от матрикса на биофилми на *S. aureus*<sup>115</sup>. Описаният в проучването от 2013 тест се извършва с взимане на назален секрет и съответно има огромното предимство да е неинвазивен като същевременно се докладва впечатляваща чувствителност при съпоставка с резултатите от микроскопия с FISH – от 13те проби, при които се установява ББФ с FISH, 12 са положителни и при теста за екзополизахарида като няма случаи на позитивни проби при последния, които да са негативни за ББФ с FISH. Въпреки отличните резултати от цитираното проучване все пак има нужда от по-обстойно тестване на методът при по-голяма кохорта от пациенти<sup>15</sup>. Въпреки последната забележка достъпът до такъв или друг подобен тест би позволил рутинно тестване на пациенти за ББФ извън контекста на оперативно лечение и инвазивно взимане на биопсия. Минус, който трябва обаче да се отбележи е, че въпросният тест е видово-специфичен и касае само биофилми образувани от *S. aureus* или поне имащи участие на този бактерия. Такъв е неминуемият недостатък (наред с други като нужда от обработка и време за изследване) и на микроскопията с FISH. Същевременно в зависимост от това дали хипотетичния бъдещ лечебен метод ще е също видово-специфичен или не, този недостатък може да бъде предимство. Ако въпросният бъдещ метод за ерадикация на биофилми обаче не се окаже видово-специфичен, то от наличните към днешна дата методи за доказване на биофилм най-лесно приложим, бърз и надежден е методът за конфокална микроскопия с невидово-специфично багрило<sup>10</sup> или иначе казано – методът избран от нас. В такъв контекст алгоритъмът за вземане на проби, съхраняването им, обработката им и разглеждането им със SDCM, който успешно бе разработен за целите на проучването ни, може да получи огромно приложение в бъдещето.

## 6. Заключение

В заключение – макар хроничния риносинусит да е добре позната и изучавана с десетилетия патология, факторите, които допринасят за развитието ѝ, както и оптималните лечебни методи, са все още предмет на проучване, уточняване и дискусия. Благодарение на развитието на научно-базираната медицина разбиранията ни за ефективното лекарствено лечение на болестта са в непрестанна еволюция като непрестанно се проучват и нови медикаменти. Хирургичното лечение и конкретно широкото навлизане на функционалната ендоскопска синус хирургия е сигурен и изключително ефективен лечебен метод при пациенти, при които консервативното лечение не се е оказало задоволително.

Бактериалните биофилми са феномен, за който медицината вече е натрупала солидни данни, че играе ключова роля в развитието на хронични инфекции и конкретно на хроничен риносинусит. Проучват се факторите, влияещи върху развитието на биофилми, включително и особеностите на лигавиците или тъканите, които биха могли да улесняват или възпрепятстват колонизацията. Такъв потенциален фактор са гликопротеините муцини, които са основен компонент на мукуса на ГДП.

Разработването на ефективен и надежден метод за борба с биофилм инфекциите би бил огромен пробив и би превърнал доказването на биофилм при ХРС и определянето на факторите, влияещи върху формирането му, от диагностично направление с основно предиктивна стойност, в такова, което би било основна част от диагностиката на хроничен риносинусит и би служило за насочване на лечението му.

## 7. Изводи

За изпълнение на поставените задачи в проучването бяха крайно включени 80 пациенти, от които 66 пациенти с хроничен риносинусит и 14 контроли с остра травматична патология в областта на носа. Бяха снети подробна анамнеза и статус, симптоматиката бе оценена с въпросника SNOT22, наличните образно-диагностични изследвания бяха оценени по скалата на Lund-Mackay.

Интраоперативно от всеки пациент бяха взети 2 тъканни проби, едната от които бе изследвана за наличие на бактериален биофилм в Института по Молекулярна биология към БАН, а чрез втората се определи нивото на експресия на муциновите гени *MUC5AC* и *MUC5B* в Центъра по Молекулярна медицина към МУ-София.

Извлечените данни бяха обработени и бе направен щателен статистически анализ на всички възможни взаимодействия между различните фактори. Достигнати бяха следните изводи:

1. Установи се статистически значима *разлика* в наличието на бактериален биофилм между пациентите с ХРС и контролите без хронична патология на носа и синусите.

2. При анализ на двете субгрупи на пациенти с ХРС се откри статистически значима *разлика* в наличието на биофилм между пациентите с ХРС и контролите както при субгрупата на пациентите с ХРС с назална полипоза, така и при пациентите с ХРС без полипи.
3. Не се установи статистически значима *разлика* в нивата на експресия на *MUC5AC* между пациентите с ХРС и контролите без хронична патология на носа и синусите.
4. При анализ на двете субгрупи на пациенти с ХРС не се откри статистически значима *разлика* в нивата на експресия на *MUC5AC* нито между пациентите с ХРС с полипоза и контролите, нито между пациентите с ХРС без полипи и контролите.
5. Установи се статистически значима *разлика* в нивата на експресия на *MUC5B* между пациентите с ХРС и контролите без хронична патология на носа и синусите.
6. Установи се статистически значима *разлика* в нивата на експресия на *MUC5B* между субгрупата на пациентите с ХРС с полипоза и контролите, но не се установи такава *разлика* между субгрупата на пациентите с ХРС без полипоза и контролите.
7. При пациентите с ХРС не се установи статистически значима *зависимост* между наличието на биофилм и факторите възраст, субективни оплаквания, предходното лечение с назални стероиди и тежест на риносинусита според образно-диагностичната скала на Lund-Mackay.
8. При пациентите с ХРС не се установи статистически значима *зависимост* между нивата на експресия нито на *MUC5AC*, нито на *MUC5B* и факторите възраст, субективни оплаквания и предходно лечение с назални стероиди.
9. Както при пациентите с ХРС, така и при контролите, не се установи статистически значима *зависимост* нито между наличието на биофилм, нито между нивата на експресия на *MUC5AC* или на *MUC5B* и факторите пол и тютюнопушене.
10. Не се установи статистически значима *взаимовръзка* между наличието на бактериален биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* при пациентите с ХРС.
11. Не се установи статистически значима *взаимовръзка* между наличието на бактериален биофилм и нивото на експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС.

Планът за наблюдение на пациентите, взимащ предвид получените резултати, включва по-стриктно наблюдение на пациентите с наличен биофилм и очакване на по-лоши следоперативни резултати при тях. Тъй като при направените анализи не се установиха зависимости на наличието на биофилм или на нивата на муцинова експресия с клинични, поведенчески или терапевтични фактори, към момента не може да се предложи съответна модификация на стратегията за наблюдение на пациентите.

## 8. Приноси

1. За първи път в България се създаде алгоритъм за изследване на тъканни проби от пациенти с риносинусит за наличие на бактериален биофилм; ефективно и с възможност за повторяемост се изпълняваха стъпки за взимане на проба, съхранение и трансфер, оцветяване с BacLight Live/Dead™, наблюдение с конфокален микроскоп и протокол за оценка на получените образи за наличието на бактериален биофилм. Създадоха се работни контакти с Българска Академия на Науките, които могат да послужат за бъдещи проучвания и пресъздаване на настоящето.
2. За първи път в страната се прави анализ на взаимовръзката между наличието на бактериални биофилми и фактори като възраст, пол, субективни оплаквания, тютюнопушене, предходна употреба на назални стероиди и находка от образна диагностика при пациенти с хроничен риносинусит
3. За първи път в страната се анализира експресията на *MUC5AC* и *MUC5B*. Създадоха се лесно повторяеми протоколи за взимане на тъканни проби, съхранението им, обработката им и количественото окачествяване на нивото на експресия на въпросните муцини.
4. С взетите проби се създаде се биобанка в Центъра по молекулярна медицина, където те ще се съхраняват, което и ще позволи използването им в бъдещи проучвания по темата.
5. За първи път в страната се разгледа взаимовръзката между нивото на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B* и фактори като възраст, пол, субективни оплаквания на пациентите, тютюнопушене, предходна употреба на назални стероиди и находка от образна диагностика при пациенти с хроничен риносинусит.
6. За първи път в страната и за втори път в света се направи анализ на взаимовръзката между наличието на бактериален биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B* при пациенти с ХРС като за първи път се направи с използваните методи.

## 9. Списък със съкращения

Съкращения на български език

АР – Алергичен ринит

БАН – Българска академия на науките

ББФ – Бактериален биофилм

ГЕРБ – Гастроезофагеална рефлуксна болест

ГДП – Горен дихателен път/Горни дихателни пътища

ДДП – Долен дихателен път/Долни дихателни пътища

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

ЕСХ – Ендоскопска синус хирургия

ИСУЛ – Институт за следдипломно усъвършенстване на лекари

ИХХ – Имунохистохимия

КЕНИМУС – Комисия по етика на научните изследвания в Медицински Университет София

КТ – Компютърна томография

РНК – Рибонуклеинова киселина

СЕМ – Сканираща електронна микроскопия

ТЕМ – Трансмисионна електронна микроскопия

ФЕСХ – Функционална ендоскопска синус хирургия

ХОББ – Хронична обструктивна белодробна болест

ХРС – Хроничен риносинусит

ЦНС – Централна нервна система

ЧМН – Черепно-мозъчен нерв

ЯМР – Ядреномагнитна томография

Съкращения на английски език

AFS – Allergic fungal sinusitis, Алергичен гъбичен/фунгален синуит

AFSR – Allergic fungal rhinosinusitis, Алергичен гъбичен/фунгален риносинуит

CRS – Chronic rhinosinusitis, Хроничен риносинуит

CRS<sub>s</sub>NP – Chronic rhinosinusitis without nasal polyps, Хроничен риносинуит без назални полипи

CRS<sub>w</sub>NP – Chronic rhinosinusitis with nasal polyps, Хроничен риносинуит с назални полипи

CSLM – Confocal scanning laser microscopy, Конфокална сканираща лазерна микроскопия

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

EPOS – European paper on rhinosinusitis and nasal polyps, Европейски консенсус за риносинуити и носна полипоза

EPS – Extracellular polymeric substance, Извънклетъчна полимерна субстанция

ESS – Endoscopic sinus surgery, Ендоскопска синус хирургия

FESS – Functional endoscopic sinus surgery, Функционална ендоскопска синус хирургия

ICH - Immunohistochemistry, Имунохистохимия

Ig – Immunoglobulin, Имуноглобулин

IL – Interleukin, Интерлевкин

MUC – Mucin, Муцин

*MUC* – Mucin, Ген за съответния муцин

PCR – Polymerase chain reaction, Полимеразна верижна реакция

PPI - Proton pump inhibitors, Инхибитори на протонната помпа

SDCM – Spinning disk confocal microscopy, Конфокална микроскопия с въртящи се дискове

SEM – Scanning electron microscopy, Сканираща електронна микроскопия

SNOT22 – Sinu-nasal Outcome Test (22 въпроса), Въпросник за симптоми от носа и синусите

TEM – Transmission electron microscopy, Трансмисионна електронна микроскопия

RT-qPCR – Real Time/Reverse-Transcription quantitative PCR, Количествена PCR в реално време, Обратно-транскрипционна количествена PCR

RQ – Relative quantification, Релативно околичествяване

## 10. Библиография

1. Halawi, A. M., Smith, S. S. & Chandra, R. K. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and cost. *Allergy Asthma Proc.* **34**, 328–334 (2013).
2. Hastan, D. *et al.* Chronic rhinosinusitis in Europe - An underestimated disease. A GA 2LEN study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **66**, 1216–1223 (2011).
3. Rudmik, L. Economics of Chronic Rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **17**, (2017).
4. officialdata.org. <https://www.officialdata.org/>.
5. Rudmik, L. & Smith, T. L. Quality of life in patients with chronic rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **11**, 247–252 (2011).
6. Brandsted, R. & Sindwani, R. Impact of depression on disease-specific symptoms and quality of life in patients with chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* **21**, 50–54 (2007).
7. Lalwani, A. K. *Current Diagnosis & Treatment in Otolaryngology - Head & Neck Surgery.* (McGrawHill, 2012).
8. Steinke, J. W. & Borish, L. Chronic rhinosinusitis phenotypes. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **117**, 234–240 (2016).
9. Min, J. Y. & Tan, B. K. Risk factors for chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **15**, 1–13 (2015).
10. Foreman, A., Boase, S., Psaltis, A. & Wormald, P. J. Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **12**, 127–135 (2012).
11. Fastenberg, J. H., Hsueh, W. D., Mustafa, A., Akbar, N. A. & Abuzeid, W. M. Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. *World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* **2**, 219–229 (2016).
12. Sanderson, A. R., Leid, J. G. & Hunsaker, D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **116**, 1121–1126 (2006).
13. Głowacki, R. *et al.* The influence of bacterial biofilm on the clinical outcome of chronic rhinosinusitis: A prospective, double-blind, scanning electron microscopy study. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* **271**, 1015–1021 (2014).
14. Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J. & Ramadan, H. H. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **115**, 578–582 (2005).
15. Ramakrishnan, Y., Shields, R. C., ElBadawey, M. R. & Wilson, J. A. Biofilms in chronic rhinosinusitis: What is new and where next? *J. Laryngol. Otol.* **129**, 744–751 (2015).
16. Rose, M. C., Nickola, T. J. & Voynow, J. A. Airway mucus obstruction: Mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 533–537 (2001).

17. Ordoñez, C. L. *et al.* Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 517–523 (2001).
18. Martínez-Antón, A. *et al.* Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 448–457 (2006).
19. Kim, D. H. *et al.* Up-regulation of MUC5AC and MUC5B mucin genes in chronic rhinosinusitis. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **130**, 747–752 (2004).
20. Guo, Q. D. & Chun, Q. Z. The expression of MUC5AC and MUC5B mucin genes in the mucosa of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Am. J. Rhinol.* **21**, 359–366 (2007).
21. Kato, K., Song, B. H., Howe, C. L. & Chang, E. H. A Comprehensive Systematic Review of the Association Between Airway Mucins and Chronic Rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **33**, 433–448 (2019).
22. Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K. & Parsek, M. R. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* **59**, 142–151 (2006).
23. Mao, Y. J., Chen, H. H., Wang, B., Liu, X. & Xiong, G. Y. Increased expression of MUC5AC and MUC5B promoting bacterial biofilm formation in chronic rhinosinusitis patients. *Auris Nasus Larynx* **42**, 294–298 (2015).
24. Tan, L. *et al.* Aberrant mucin glycoprotein patterns of chronic rhinosinusitis patients with bacterial biofilms. *Am. J. Rhinol. Allergy* **24**, 319–324 (2010).
25. Basbaum, C., Li, D., Gensch, E., Gallup, M. & Lemjabbar, H. Mechanisms by which Gram-positive bacteria and tobacco smoke stimulate mucin induction through the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Novartis Found. Symp.* **248**, 171–180 (2002).
26. Rose, M. C. & Voynow, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* **86**, 245–278 (2006).
27. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar, S. Diagnostic Criteria for Rhinosinusitis. *Clin. Pract. Guidel. Am. Acad. Otolaryngol. Neck Surg.* **12** (2015).
28. Georgalas, C., Videler, W., Freling, N. & Fokkens, W. Global Osteitis Scoring Scale and chronic rhinosinusitis: A marker of revision surgery. *Clin. Otolaryngol.* **35**, 455–461 (2010).
29. You, H. *et al.* Factors affecting bacterial biofilm expression in chronic rhinosinusitis and the influences on prognosis. *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.* **32**, 583–590 (2011).
30. Bezerra, T. F. P., De Melo Padua, F. G., Gebrim, E. M. M. S., Saldiva, P. H. N. & Voegels, R. L. Biofilms in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **144**, 612–616 (2011).
31. Li, H. *et al.* Relationship between bacterial biofilm and clinical features of patients with chronic rhinosinusitis. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* **269**, 155–163 (2012).
32. Du, J. *et al.* Distinct expression of NK2 homeobox 1 (NKX2-1) and goblet cell hyperplasia in nasal polyps with different endotypes. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **7**, 690–698 (2017).
33. Mundra, R. K., Gupta, Y., Sinha, R. & Gupta, A. CT Scan Study of Influence of Septal Angle Deviation on Lateral Nasal Wall in Patients of Chronic Rhinosinusitis. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **66**, 187–190 (2014).
34. Stern, S. *et al.* Bacteriology of the middle meatus in chronic rhinosinusitis with and without polyposis. *Orl* **78**, 223–231 (2016).

35. Seshadri, S. *et al.* Increased expression of the epithelial anion transporter pendrin/SLC26A4 in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1548-1558.e7 (2015).
36. Ou, J. *et al.* Association of intracellular Staphylococcus aureus with prognosis in chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **6**, 792–799 (2016).
37. Luo, Q. *et al.* Expression and regulation of transcription factor FoxA2 in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **7**, 458–466 (2015).
38. W.J. Fokkens, V.J. Lund, C. Hopkins, P.W. Hellings, R. Kern, S. R. International Rhinology Journal European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Epos 2020* **1**, 7–8 (2020).
39. Popov, G. *et al.* Analysis of Bacterial Biofilm Formation and MUC5AC and MUC5B Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients. (2023).
40. Psaltis, A. J., Ha, K. R., Beule, A. G., Tan, L. W. & Wormald, P. J. Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **117**, 1302–1306 (2007).
41. Foreman, A., Singhal, D., Psaltis, A. J. & Wormald, P. J. Targeted imaging modality selection for bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **120**, 427–431 (2010).
42. Fornazieri, M. A. *et al.* Fratura de Ossos Nasais : Uma Análise Epidemiológica Fracture of Nasal Bones : An Epidemiologic Analysis. *Management* 498–501 (2008).
43. Национален статистически институт. <https://nsi.bg/bg/content/3368/начин-на-живот>.
44. Hopkins, C., Browne, J. P., Slack, R., Lund, V. & Brown, P. The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: How is it used and what does it predict? *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **137**, 555–561 (2007).
45. Goldstein-Daruech, N. *et al.* Tobacco smoke mediated induction of sinonasal microbial biofilms. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
46. Hutcherson, J. A., Scott, D. A. & Bagaitkar, J. Scratching the surface - Tobacco-induced bacterial biofilms. *Tob. Induc. Dis.* **13**, 1–6 (2015).
47. Radicioni, G. *et al.* Airway mucin MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort. *Lancet Respir. Med.* **9**, 1241–1254 (2021).
48. Yim, M. T. & Orlandi, R. R. Evolving Rhinology: Understanding the Burden of Chronic Rhinosinusitis Today, Tomorrow, and Beyond. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **20**, 3–7 (2020).
49. Smith, K. A., Orlandi, R. R. & Rudmik, L. Cost of adult chronic rhinosinusitis: A systematic review. *Laryngoscope* **125**, 1547–1556 (2015).
50. Reh, D. D., Higgins, T. S. & Smith, T. L. Impact of tobacco smoke on chronic rhinosinusitis: A review of the literature. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2**, 362–369 (2012).
51. Marcus, S., DelGaudio, J. M., Roland, L. T. & Wise, S. K. Chronic Rhinosinusitis: Does Allergy Play a Role? *Med. Sci.* **7**, 30 (2019).
52. Marcus, S., Roland, L. T., DelGaudio, J. M. & Wise, S. K. The relationship between allergy and chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* **4**, 13–17 (2019).
53. Ou, J. *et al.* Staphylococcus aureus superantigens are associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **271**, 2729–2736 (2014).

54. Conley, D. B. *et al.* Superantigens and chronic rhinosinusitis: Skewing of T-cell receptor V $\beta$ -distributions in polyp-derived CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Am. J. Rhinol.* **20**, 534–539 (2006).
55. Bollinger, R. R. *et al.* Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: Role of type 1 pili. *Mol. Immunol.* **43**, 378–387 (2006).
56. Mothey, D., Buttaro, B. A. & Piggot, P. J. Mucin can enhance growth, biofilm formation, and survival of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **350**, 161–167 (2014).
57. Caldara, M. *et al.* Mucin biopolymers prevent bacterial aggregation by retaining cells in the free-swimming state. *Curr. Biol.* **22**, 2325–2330 (2012).
58. Frenkel, E. S. & Ribbeck, K. Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 332–338 (2015).
59. Haley, C. L., Kruczek, C., Qaisar, U., Colmer-Hamood, J. A. & Hamood, A. N. Mucin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by significantly enhancing twitching motility. *Can. J. Microbiol.* **60**, 155–166 (2014).
60. Roy, M. G. *et al.* Muc5b is required for airway defence. *Nature* **505**, 412–416 (2014).
61. Co, J. Y. *et al.* Mucins trigger dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *npj Biofilms Microbiomes* **4**, 1–8 (2018).
62. Danielsen, K. A. *et al.* Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis; distribution and prevalence. *Acta Otolaryngol.* **36**, 109–112 (2015).
63. Wang, X., Du, J. & Zhao, C. Bacterial biofilms are associated with inflammatory cells infiltration and the innate immunity in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps. *Inflammation* **37**, 871–879 (2014).
64. Zhang, Z. *et al.* Clinical factors associated with bacterial biofilm formation in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **144**, 457–462 (2011).
65. Zhang, Z. *et al.* Biofilm-forming bacteria and quality of life improvement after sinus surgery. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **5**, 643–649 (2015).
66. Singhal, D., Psaltis, A. J., Foreman, A. & Wormald, P. J. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am. J. Rhinol. Allergy* **24**, 169–174 (2010).
67. Elwany, S., Gamea, M. A. & Talaat, I. Passive smoking induces nasal biofilms in children. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **146**, 110755 (2021).
68. Chen, H. H. *et al.* Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis and their relationship with inflammation severity. *Auris Nasus Larynx* **39**, 169–174 (2012).
69. Singhal, D., Foreman, A., Bardy, J. J. & Wormald, P. J. *Staphylococcus aureus* biofilms: Nemesis of endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* **121**, 1578–1583 (2011).
70. Psaltis, A. J., Weitzel, E. K., Ha, K. R. & Wormald, P. J. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am. J. Rhinol.* **22**, 1–6 (2008).
71. Groneberg, D. A. *et al.* Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma. *Histopathology* **40**, 367–373 (2002).
72. Kreda, S. M., Davis, C. W. & Rose, M. C. CFTR, Mucins, and Mucus Obstruction in Cystic Fibrosis. (2012).
73. Adamek, M. *et al.* Viral infections in common carp lead to a disturbance of mucin expression in mucosal tissues. *Fish Shellfish Immunol.* **71**, 353–358 (2017).
74. Chatterjee, M., van Putten, J. P. M. & Strijbis, K. Defensive properties of mucin

glycoproteins during respiratory infections-relevance for sars-cov-2. *MBio* **11**, 1–12 (2020).

75. Janyt, B. & Gallup, M. Mucin gene expression in rat airways following infection and irritation. **181**, 1–8 (1991).
76. Cortijo, J. *et al.* Acridinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur. Respir. J.* **37**, 244–254 (2011).
77. Bai, J. *et al.* Enhanced expression of SAM-pointed domain-containing Ets-like factor in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope* **125**, E97–E103 (2015).
78. Ali, M. S., Hutton, D. A., Wilson, J. A. & Pearson, J. P. Major secretory mucin expression in chronic sinusitis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **133**, 423–428 (2005).
79. Jung, H. H., Lee, J. H., Kim, Y. T., Lee, S. D. & Park, J. H. Expression of Mucin Genes in Chronic Ethmoiditis. *Am. J. Rhinol.* **14**, 163–170 (2000).
80. Xia, W. *et al.* Interleukin-17A promotes MUC5AC expression and goblet cell hyperplasia in nasal polyps via the act1-mediated pathway. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
81. Luo, Q. *et al.* Human neutrophil elastase induces MUC5AC overexpression in chronic rhinosinusitis through tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Acta Otolaryngol.* **136**, 641–648 (2016).
82. Kim, H. K. *et al.* Increased expression of hCLCA1 in chronic rhinosinusitis and its contribution to produce MUC5AC. *Laryngoscope* **126**, E347–E355 (2016).
83. Berger, G., Kogan, T., Ophir, D., Skutelsky, E. & Pitaro, K. Glycoconjugate expression of sinus mucosa in chronic rhinosinusitis: A lectin histochemical study. *Am. J. Rhinol.* **22**, 349–355 (2008).
84. Peña, M. T., Aujla, P. K., Patel, K. M., Zalzal, G. H. & Rose, M. C. Immunohistochemical analyses of MUC5AC mucin expression in sinus mucosa of children with sinusitis and controls. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **114**, 958–965 (2005).
85. Viswanathan, H., Brownlee, I. A., Pearson, J. P. & Carrie, S. MUC5B secretion is up-regulated in sinusitis compared with controls. *Am. J. Rhinol.* **20**, 554–557 (2006).
86. Wu, X. *et al.* Histologic characteristics and mucin immunohistochemistry of cystic fibrosis sinus mucosa. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **137**, 383–389 (2011).
87. Saieg, A., Brown, K. J., Pena, M. T., Rose, M. C. & Preciado, D. Proteomic analysis of pediatric sinonasal secretions shows increased MUC5B mucin in CRS. *Pediatr. Res.* **77**, 356–362 (2015).
88. Martínez-Antón, A. *et al.* Corticosteroid therapy increases membrane-tethered while decreases secreted mucin expression in nasal polyps. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **63**, 1368–1376 (2008).
89. Seong, J. K. *et al.* Upregulation of MUC8 and downregulation of MUC5AC by inflammatory mediators in human nasal polyps and cultured nasal epithelium. *Acta Otolaryngol.* **122**, 401–407 (2002).
90. Xue-Kun, H., Yuan, L., Jin, Y., Peng, L. & Hong, L. Expression of MUC2 and MUC5B in ethmoid sinus mucosa of patients with chronic rhinosinusitis. *Sci. Res. Essays* **5**, 1690–1696 (2010).
91. Lässer C., O’Neil S., Sihlbom C, Hansson S, Lundbäck B., L. J. The proteome of nasal exosomes in healthy, asthmatic and chronic rhinosinusitis subjects: a quantitative proteomics approach. *Eur J Allergy Clin Immunol.* 2012;67590.

92. Al Badaai, Y., DiFalco, M. R., Tewfik, M. A. & Samaha, M. Quantitative proteomics of nasal mucus in chronic sinusitis with nasal polyposis. *J. Otolaryngol. - head neck Surg. = Le J. d'oto-rhino-laryngologie Chir. cervico-faciale* **38**, 381–389 (2009).
93. Peña, M. T. *et al.* Localization and expression of MUC5B and MUC7 mucins in pediatric sinus mucosa. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **116**, 389–397 (2007).
94. Kim, S. S. *et al.* Levels of intracellular protein and messenger RNA of mucin and lysozyme in normal human nasal and polyp epithelium. *Laryngoscope* **110**, 276 (2000).
95. Sakakura, Y. MUC2 Mucin Gene Expression in the Nose and Maxillary Sinus. **16**, 391–395 (1995).
96. Lässer, C. *et al.* Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *J. Transl. Med.* **14**, 1–14 (2016).
97. Ali, M. S., Wilson, J. A. & Pearson, J. P. Mixed nasal mucus as a model for sinus mucin gene expression studies. *Laryngoscope* **112**, 326–331 (2002).
98. Kirkham, S. *et al.* MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 1033–1039 (2008).
99. Boonla, C. *et al.* Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* **98**, 1438–1443 (2003).
100. Pinto-de-Sousa, J., Reis, C. A., David, L., Pimenta, A. & Cardoso-de-Oliveira, M. MUC5B expression in gastric carcinoma: Relationship with clinico-pathological parameters and with expression of mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6. *Virchows Arch.* **444**, 224–230 (2004).
101. Davies, J. R., Svitacheva, N., Lannefors, L., Kornfält, R. & Carlstedt, I. Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochem. J.* **344**, 321–330 (1999).
102. Aust, M. R., Madsen, C. S., Jennings, A. & Kasperbauer, J. L. Mucin mRNA expression in normal and vasomotor inferior turbinates. *Am. J. Rhinol.* **11**, 293–302 (1997).
103. Duah, V. *et al.* Younger patients with COME are more likely to have mucoid middle ear fluid containing mucin MUC5B. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **90**, 133–137 (2016).
104. Paulsen, F., Langer, G., Hoffmann, W. & Berry, M. Human lacrimal gland mucins. *Cell Tissue Res.* **316**, 167–177 (2004).
105. Di, Y. P., Zhao, J. & Harper, R. Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1. *J. Biol. Chem.* **287**, 27948–27958 (2012).
106. Borchers, M. T., Carty, M. P. & Leikauf, G. D. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **276**, 549–555 (1999).
107. Wallwork, B., Coman, W., Mackay-Sim, A., Greiff, L. & Cervin, A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **116**, 189–193 (2006).
108. Tateda, K. *et al.* Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1930–1933 (2001).
109. Pynnonen, M. A., Venkatraman, G. & Davis, G. E. Macrolide therapy for chronic rhinosinusitis: A meta-analysis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg. (United States)* **148**, 366–373 (2013).

110. Ha, K. R., Psaltis, A. J., Butcher, A. R., Wormald, P. J. & Tan, L. W. In vitro activity of mupirocin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and its potential implications in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **118**, 535–540 (2008).
111. Singhal, D. *et al.* Efficacy of NVC-422 against *Staphylococcus aureus* biofilms in a sheep biofilm model of sinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2**, 309–315 (2012).
112. Paramasivan, S. *et al.* Methylglyoxal-augmented manuka honey as a topical anti-*Staphylococcus aureus* biofilm agent: Safety and efficacy in an in vivo model. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **4**, 187–195 (2014).
113. Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R. & Chan, F. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **141**, 114–118 (2009).
114. Hughes, G. & Webber, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 2237–2246 (2017).
115. Dinicola, S., De Grazia, S., Carlomagno, G. & Pintucci, J. P. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **18**, 2942–2948 (2014).
116. Varma, P., Nisha, N., Dinesh, K. R., Kumar, A. V. & Biswas, R. Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 137–143 (2011).
117. Mukerji, S. S. *et al.* Probiotics as adjunctive treatment for chronic rhinosinusitis: A randomized controlled trial. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **140**, 202–208 (2009).
118. Biel, M. A., Pedigo, L., Gibbs, A. & Loebel, N. Photodynamic therapy of antibiotic-resistant biofilms in a maxillary sinus model. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 468–473 (2013).
119. Biel, M. A., Jones, J. W., Pedigo, L., Gibbs, A. & Loebel, N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy on human ciliated respiratory mucosa. *Laryngoscope* **122**, 2628–2631 (2012).
120. Davies, D. G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (80-. )*. **280**, 295–298 (1998).
121. Camps, J., Pujol, I., Ballester, F., Joven, J. & Simó, J. M. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: Their relationship with quorum-sensing signals in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1325–1331 (2011).
122. Kilty, S. J. & Desrosiers, M. Y. The role of bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **8**, 227–233 (2008).
123. Belfield, K. *et al.* Evaluation of combinations of putative anti-biofilm agents and antibiotics to eradicate biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2531–2538 (2017).
124. Rosen, P. L., Palmer, J. N., O'Malley, B. W. & Cohen, N. A. Surfactants in the management of rhinopathologies. *Am. J. Rhinol. Allergy* **27**, 177–180 (2013).
125. Chiu, A. G. *et al.* Baby shampoo nasal irrigations for the symptomatic post-functional endoscopic sinus surgery patient. *Am. J. Rhinol.* **22**, 34–37 (2008).
126. Isaacs, S., Fakhri, S., Luong, A., Whited, C. & Citardi, M. J. The effect of dilute baby shampoo on nasal mucociliary clearance in healthy subjects. *Am. J. Rhinol. Allergy* **25**, 27–29 (2011).

127. Farag, A. A. *et al.* Single-blind randomized controlled trial of surfactant vs hypertonic saline irrigation following endoscopic endonasal surgery. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 276–280 (2013).
128. Kofonow, J. M. & Adappa, N. D. In vitro antimicrobial activity of sinusurf™. *Orl* **74**, 179–184 (2012).
129. Desrosiers, M., Myntti, M. & James, G. Methods for removing bacterial biofilms: In vitro study using clinical chronic rhinosinusitis specimens. *Am. J. Rhinol.* **21**, 527–532 (2007).
130. Tamashiro, E. *et al.* In vivo effects of citric acid/zwitterionic surfactant cleansing solution on rabbit sinus mucosa. *Am. J. Rhinol. Allergy* **23**, 597–601 (2009).
131. Donelli, G. *et al.* Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2733–2740 (2007).
132. Shields, R. C. *et al.* Efficacy of a Marine Bacterial Nuclease against Biofilm Forming Microorganisms Isolated from Chronic Rhinosinusitis. *PLoS One* **8**, (2013).

## **11. Публикации, участия в конгреси и в проекти, свързани с дисертационния труд**

### **11.1. Публикации, свързани с дисертационния труд**

1. „Бактериалните биофилми участват в патогенезата на хроничните инфекции“; автори: Г. Попов, Р. Гергова, Д. Попова; публикувано в списание „МД“, Брой 6 (126), Година XVIII, Декември 2021, стр. 72-76, ISSN 1312-4471;
2. „Бактериални биофилми и свързана с тях патология в оториноларингологията“; автори: Г. Попов, Р. Гергова, Д. Попова; публикувано в списание „МД“, Брой 1 (127), Година XIX, Февруари 2022, стр. 92-96, ISSN 1312-4471;
3. “Analysis of Bacterial Biofilm Formation and MUC5AC and MUC5B Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“; автори: G. Popov, R. Aleksandrov, V. Petkova, R. Kaneva, R. Gergova, T. Kundurzhiev, D. Popova; публикувано в “Journal of Clinical Medicine” (ISSN 2077-0383, IF 4.964, CiteScore 4.4), J. Clin. Med. 2023, 12(5), 1808; <https://doi.org/10.3390/jcm12051808>; Published: 23 February 2023; collected in Volume 12, Issue 5;
4. „Ендоскопска орбитална декомпресия при пациент с метастаза в орбитата.“; автори: Попов Т. М., Рангачев Ю., Конов Д., Попов Г., Ценев И.; публикувано в списание „ОтоРиноЛарингология“, брой 12, 37–42 (2016), ISSN 1312-6997;
5. „Остър и хроничен риносинуит в детската възраст: анализ на съвременните терапевтични подходи“; автори: К. Чилингиров, Г. Попов; публикувано в списание „InSpiro“, Брой 2 (70), Година 16, Април 2023, стр. 18-22, ISSN 1313-4329;

## **11.2. Участия в научни конгреси**

1. Участие на Научна конференция „Съвременни концепции в лечението на ушите, носа и гърлото” на Асоциация на лекарите по оториноларингология „Проф. д-р Стоян Белинов – ИСУЛ”, 19-21 октомври, 2018 с устна презентация на тема „Бактериални биофилми; взаимоотношение с муцини и муцинови гени“;
2. Участие с устна презентация на тема „Бактериални биофилми“ в IX Пролетна научна конференция по оториноларингология (ОРЛ), 20-21 март, 2021, с организатор Асоциация на лекарите по оториноларингология „Проф. д-р Стоян Белинов – ИСУЛ”;

## **11.3. Участие в проекти, свързани с дисертационния труд**

1. План-сметка за учебна година 2018/2019, вх. №3942/29.06.2018 г.; План-сметка за необходимите средства за научноизследователската дейност на докторанта – чл. 51, т. 6, Медицински Факултет, Медицински Университет – София;
2. План-сметка за учебна година 2019/2020, вх. №3040/29.05.2019 г.; План-сметка за необходимите средства за научноизследователската дейност на докторанта – чл. 51, т. 6, Медицински Факултет, Медицински Университет – София;
3. „Млад Изследовател 2020“; Медицински Университет – София; № Д-79/24.06.2020 г., ПРОЕКТ вх. №8370/20.11.2019 г; “Взаимовръзка между експресията на муциновите гени и капацитета за формиране на бактериални биофилми в областта на ушите, носа и гърлото“ (Водещ изследовател);