

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

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност: Оториноларингология

Научен ръководител:

Проф. д-р Диана Попова, дмн

Рецензенти:

Доц. д-р Тодор Попов, дм

Проф. д-р Валентин Стоянов, дмн

СОФИЯ, 2023

Благодарности и думи от автора на труда

Преди да насоча вниманието на уважаемите читатели към долуизложения труд, бих искал първо да изкажа своите благодарности към хората, без които осъществяването на този проект не би било възможно. На първо място бих искал да благодаря на семейството си за даденото ми възпитание и за образованието, което благодарение на тях имам. Благодаря на моя брат д-р Петър Попов за осигуряване на така необходимото разсейване и смях в някои от най-трудните ми моменти. Благодаря на майка ми – Адриана Попова, за това, че е вляла в мен неинатлива кръв и затова, че ме научи на подреденост (надявам се правописните ми и пунктуационни грешки да са малко). Разбира се, благодаря и на баща ми – доц. д-р Кирил Попов, за амбицията и за примера, който ми дава, както и за историите за членове на катедрата и немедицинските им и вътреасансърни дейности, с които ме е захранвал от малък.

Не съвсем по темата за семейството, но пък знае ли човек, бих искал да благодаря и на моята приятелка Диана Савцова за любовта и подкрепата ѝ.

Бих искал да благодаря на членовете на Катедрата и Клиниката по ушни, носни и гърлени болести в УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ начело с научния ми ръководител – проф. Диана Попова. Без нейната помощ и напътствия настоящият труд би бил невъзможен. Също невъзможен би бил без помощта на доц. Ю. Рангачев, доц. Т. Попов, д-р С. Йорданов, д-р Ю. Хаджиев, д-р В. Добриянова и д-р С. Димитров. Благодарение на златните им души и ръце нито аз, нито котките останахме гладни.

Настоящият труд включва елементи и от други биологични специалности и в това отношение съм длъжен да спомена късмета си, който ме срещна със страхотните специалисти и също така вече близки приятели – доктор Вероника Петкова от Центъра по Молекулярна медицина и доктор Радослав Александров от Института по Молекулярна биология към БАН, но също така и от НПМГ. Оказа се, че и двамата, също като мен, си падат по геополитика и тенис, което макар да не е точно политика и футбол, е предпоставка за здрава дружба.

Неоценима бе и помощта, отзивчивостта и постоянството във вдигането на телефона на проф. Р. Кънева, проф. Р. Гергова и проф. Т. Кундуржиев, като особено бих изтъкнал последното, като фактор, ключов за всеки научен труд.

Държа да благодаря и на хората, които помагаша да съм в крепко здраве, докато работех по проучването и които търпеливо слушаха мрънкане – д-р Г. Желев, доц. П. Пенчев, д-р Г. Върбанов, д-р Р. Симеонов, д-р О. Златарски, д-р Г. Димитров, м.с. М. Наумова и д-р Радислав Наков, за когото, вярвам, че би искал да бъде помнен с усмивка.

На последно място по ред, но очевидно не на последно място по важност, бих желал да спомена бандата (вълци) от Националната природо-математическа гимназия „Акад. Л. Чакалов“ за огъня, който взаимно поддържа в сърцата си, като особено много бих искал да благодаря на доктор Петър Марков, който никога не кани на гости, но пък иначе е ОК.

Съдържание

1. Увод.....	6
2. Литературен обзор.....	7
2.1. Анатомо-физиологични данни.....	7
2.2. Хроничен риносинусит.....	12
2.2.1. Патофизиология.....	14
2.2.2. Фактори.....	15
2.2.2.1. Външни фактори.....	15
2.2.2.1.1. Гъбична инфекция.....	15
2.2.2.1.2. Вирусни инфекции.....	16
2.2.2.1.3. Бактерии и бактериални биофилми.....	16
2.2.2.1.4. Алергени.....	17
2.2.2.1.5. Токсини и иританти.....	17
2.2.2.2. Фактори от страна на пациента.....	18
2.2.2.2.1. Анатомични вариации и особености.....	18
2.2.2.2.2. Придружаващи болести и състояния.....	19
2.2.3. Клиника.....	20
2.2.4. Диагноза, диференциална диагноза и видове хроничен риносинусит... ..	21
2.2.4.1. Поставяне на диагноза.....	21
2.2.4.2. Диференциална диагноза.....	21
2.2.4.3. Видове ХРС и класификация.....	22
2.2.5. Лечение.....	23
2.2.5.1. Консервативно лечение.....	23
2.2.5.1.1. Антибиотично лечение.....	23
2.2.5.1.1.1. Перорални антибактериални средства.....	24
2.2.5.1.1.2. Интравенозни антибактериални средства.....	24
2.2.5.1.1.3. Топикални антибактериални средства.....	24
2.2.5.1.2. Антимикотично/антифунгално лечение.....	25
2.2.5.1.3. Кортикостероиди.....	25
2.2.5.1.3.1. Топикални/назални кортикостероиди.....	25
2.2.5.1.3.2. Орални кортикостероиди.....	26
2.2.5.1.4. Антихистамини.....	26
2.2.5.1.5. Промивки с физиологичен разтвор.....	27
2.2.5.1.6. Левкотриенови антагонисти.....	27
2.2.5.1.7. Моноклонални антитела.....	28
2.2.5.1.7.1. Анти-IgE антитела.....	28
2.2.5.1.7.2. Анти-IL5 антитела.....	29
2.2.5.1.7.3. Анти-IL4/IL13 антитела.....	29
2.2.5.1.8. Инхибитори на протонната помпа.....	29
2.2.5.1.9. Други.....	30
2.2.5.2. Оперативно лечение.....	30
2.2.5.2.1. Исторически преглед и развитие на оперативните техники..	30
2.2.5.2.2. Ендоскопска синус хирургия.....	31
2.2.5.2.3. Аденоидектомия.....	34
2.3. Бактериални биофилми.....	34
2.3.1. Същност, свойства и участие в хронични възпалителни процеси.....	34
2.3.1.1. Същност.....	34
2.3.1.2. Роля на биофилмите в хроничните инфекции.....	34

2.3.1.3. Превключване към биофилм – фази на формиране.....	35
2.3.1.4. Quorum sensing механизъм и комуникация между клетките.....	36
2.3.1.5. Свойства на матрикса.....	37
2.3.1.6. Резистентност и толерантност.....	37
2.3.1.7. Разлика във фенотипа и генотипа на бактериите в рамките на биофилма	38
2.3.2. Бактериални биофилми като фактор за развитие на ХРС.....	39
2.4. Муцини.....	40
2.5. Методи за и оценка на ХРС.....	40
2.5.1. Анамнеза и стандартизирани въпросници.....	40
2.5.2. Физикални методи и ендоскопия.....	42
2.5.3. Образна диагностика.....	43
2.6. Методи за определяне на бактериално присъствие.....	46
2.6.1. Стандартно културелно изследване.....	46
2.6.2. Установяване на ендотоксин.....	47
2.6.3. Генетични методи – полимеразна верижна реакция, PCR.....	47
2.6.4. Доказване на бактериална биофилм структура.....	47
2.6.4.1. Сканираща електронна микроскопия, SEM.....	47
2.6.4.2. Трансмисионна електронна микроскопия, TEM.....	50
2.6.4.3. Конфокална микроскопия.....	50
2.6.4.3.1. CSLM.....	51
2.6.4.3.2. SDCM.....	51
2.7. Методи за изследване на протеини.....	51
2.7.1. ELISA.....	51
2.7.2. Имунохистохимия, ИНС.....	52
2.7.3. Изследване на експресия на ген на протеин.....	52
3. Цели и задачи.....	52
3.1. Цел.....	52
3.2. Задачи.....	53
4. Материали и методи.....	53
4.1. Пациенти и набиране на биологичен материал.....	53
4.2. Методи.....	54
4.2.1. Клинични методи.....	54
4.2.2. Установяване на наличие на бактериален биофилм.....	55
4.2.2.1. Конфокална микроскопия с въртящи се дискове, SDCM.....	55
4.2.2.2. Критерии за наличие на биофилм.....	59
4.2.3. Определяне на нивото на експресия на <i>MUC5AC</i> и <i>MUC5B</i>	61
4.2.3.1. Изолиране на РНК от тъкан.....	62
4.2.3.2. Определяне на концентрацията и качеството на изолираните РНК.....	63
4.2.3.3. Провеждане на обратна транскрипция за синтез на кДНК.....	63
4.2.3.4. Провеждане на RT-qPCR.....	64
4.2.3.5. Експресионен анализ на <i>MUC</i> -гените между пациенти и контроли.....	65
5. Резултати.....	67
5.1. Демографски анализ.....	67
5.2. Дескриптивен анализ.....	70
5.2.1. Субективна симптоматика, SNOT22.....	70
5.2.2. Тютюнопушене.....	71
5.2.3. Консервативно лечение с назални стероиди.....	73
5.2.4. Оценка на КТ находка по Lund-Mackay.....	73

5.3. Статистически анализ.....	74
5.3.1. Наличие на бактериален биофилм.....	75
5.3.1.1. Анализ на различията между пациенти с ХРС и контроли.....	75
5.3.1.2. Взаимовръзка между наличие на биофилм и възраст	78
5.3.1.3. Взаимовръзка между наличие на биофилм и пол.....	78
5.3.1.4. Взаимовръзка между наличие на биофилм и субективна симптоматика по SNOT22.....	79
5.3.1.5. Взаимовръзка между наличие на биофилм и тютюнопушене.....	79
5.3.1.6. Взаимовръзка между наличие на биофилм и предходно лечение с назални стероиди.....	80
5.3.1.7. Взаимовръзка между наличие на биофилм и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay.....	81
5.3.2. Муцинова експресия.....	81
5.3.2.1. Ниво на експресия на <i>MUC5AC</i>	81
5.3.2.1.1. Сравнение на ниво на експресия между пациенти с ХРС и контроли	81
5.3.2.1.2. Взаимовръзка между ниво на експресия и възраст.....	85
5.3.2.1.3. Взаимовръзка между ниво на експресия и пол.....	85
5.3.2.1.4. Взаимовръзка между ниво на експресия и субективна симптоматика по SNOT22.....	86
5.3.2.1.5. Взаимовръзка между ниво на експресия и тютюнопушене... ..	87
5.3.2.1.6. Взаимовръзка между наличие на биофилм и предходно лечение с назални стероиди.....	88
5.3.2.1.7. Взаимовръзка между ниво на експресия и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay.....	89
5.3.2.2. Ниво на експресия на <i>MUC5B</i>	89
5.3.2.2.1. Сравнение на ниво на експресия между пациенти с ХРС и контроли.....	89
5.3.2.2.2. Взаимовръзка между ниво на експресия и възраст.....	93
5.3.2.2.3. Взаимовръзка между ниво на експресия и пол.....	94
5.3.2.2.4. Взаимовръзка между ниво на експресия и субективна симптоматика по SNOT22.....	95
5.3.2.2.5. Взаимовръзка между ниво на експресия и тютюнопушене... ..	96
5.3.2.2.6. Взаимовръзка между ниво на експресия и предходно лечение с назални стероиди.....	96
5.3.2.2.7. Взаимовръзка между ниво на експресия и образно-диагностична оценка по Lund-Mackay.....	97
5.3.3. Взаимовръзка между двата фактора при пациентите с ХРС.....	98
5.3.3.1. Взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на <i>MUC5AC</i>	98
5.3.3.2. Взаимовръзка между наличие на биофилм и ниво на експресия на <i>MUC5B</i>	100
6. Дискусия.....	103
7. Заключение.....	114
8. Изводи.....	114
9. Приноси.....	116
10. Списък със съкращения.....	117
11. Библиография.....	119

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 ХРС¹, а в Европа средният процент е 10,9%, като има не малки разлики в честотата между различните държави. Най-малка честота - 6,9%, се докладва в Бранденбург, Германия, а най-голяма – 27,1%, в Португалия², като генерално честотата е по-голяма в по-южните държави². Само в САЩ към 2017 г. директните икономически последици от болестта се изчисляват на 10 до 13 милиарда долара годишно³ (отговарящо на 12 до 16 милиарда долара през 2023 г.⁴), а индиректните – на 20 милиарда долара³ (отговарящо на 24 милиарда долара през 2023 г.⁴).

Хроничният риносинуит води до значително понижено качество на живот и често влошава придружаващи заболявания⁵. За отбелязване е, че до 25% от пациентите с диагнозата имат придружаваща депресия⁶.

ХРС е многофакторно заболяване⁷, 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 стигат до заключение, че бактериални биофилми играят роля в патогенезата на ХРС⁸⁻¹³ 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 се 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 патологии¹⁴⁻¹⁶, включително и на хроничен риносинуит¹⁷⁻¹⁹, като в това отношение муцините MUC5AC и MUC5B са най-често изучаваните¹⁹.

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 биофилм²⁰⁻²², така и обратното – че бактериалното присъствие води до повишен синтез и отделяне на муцини в лигавиците на горните дихателни пътища (ГДП)^{23,24}.

В настоящето проучване бе изследвано наличието на бактериален биофилм при пациенти с ХРС, нивото им на експресия на MUC5AC и MUC5B, 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. Литературен обзор

2.1. Анатомо-физиологични данни

Носните кухини и параназалните синуси са началната част на горния дихателен път, където се осъществява първият контакт на вдишания въздух с организма. Анатомичният строеж и функциите на тези органи са съответно свързани и пригодени за целта. В строежа на носните кухини и синусите взимат участие чифтните максиларна, фронтална, лакримална, назална и палатинална кост, както и нечифтните ралник (*vomere*), етмоидална кост и сфеноидална кост. Важна структурна роля за изграждане на назалния септум играе и септалния хрущял^{25,26}.

Носните кухини (носна кухина, носни половици) са разделени на лява и дясна от назалния септум - като твърдото небце служи за под на носните половици, нагоре граничат с базата на черепа, а латерално от тях се отварят повечето параназални синуси^{25,26}. Напред носните половици се продължават във *vestibulum nasi*, като граница е *limen nasi internus*, а назад чрез хоаните комуникират с назофаринкса. Ключова структурна и функционална роля за носните половици играят трите чифта носни конхи – *conchae nasales*: горна (*concha nasalis superior*), средна (*concha nasalis media*) и долна (*concha nasalis inferior*). При някои индивиди се среща и непостоянната *concha nasalis suprema*, разположена над горната конха. Носните конхи обособяват в съответната носна половици медиално стоящия от тях общ носов ход - *meatus nasi communis*, като същевременно всяка загражда под себе си едноименен носен ход, съответно – *meatus nasi superior, medius et inferior*. Над горната носна конха се ограничава пространство, наречено *recessus sphenoidal*, а горната повърхност на носните половици се заема от *regio olfactoria* – обонятелна зона, постлана от специфичния обонятелен епител, която е с площ от 2,5 до 5 см²^{25,26} във всяка от двете носни половици. Епителът, покриващ обонятелната зона и наричан още Шнайдеров или Шнайдерова мембрана²⁷, е различен от респираторния, покриващ останалата част от носните половици. Цветът е характерен жълто-кафяв и се дължи на пигмента в обонятелните сетивни клетки²⁶. Епителът се състои от три типа клетки – сетивни, които представляват и първи неврон от обонятелния анализатор, опорни – имащи опорна и трофична функция, и базални, които имат функцията да заместват отпадащи и мъртви сетивни клетки, като сами се превръщат в такива²⁷. В обонятелната зона се намират и специфичните Бауманови (*Bowman*) жлези, отделящи специфичен серозен секрет, служещ за разтворител на мирисните вещества²⁶.

Параназалните синуси са разширения, свързани със съответната назална половина и помещаващи се в едноименните кости. Те биват фронтален, етмоидални клетки (синуси), максиларен и сфеноидален (Фигура 1).



Фигура 1. Видове параназални синуси и разположението им

Етмоидалните клетки - *cellulae ethmoidales* (още наричани етмоидални синуси, решетъчни синуси) - са кухини, разположени в лабиринта на етмоидалната кост (*labyrinthus ethmoidalis*). Те са формирани още при раждането и нарастват най-интензивно до 5-годишна възраст. Решетъчните клетки могат да бъдат различен брой – варират от 5 до 20 и имат обем от 2 до 3 см³, най-голямата от които е *bulla ethmoidalis*²⁶. Етмоидалните клетки понякога се описват като предни, средни (*bulla ethmoidalis*) и задни, но по-често се класифицират просто като предни (включващи предни и средни клетки от предходната класификация) – разположени отпред и отдолу на ламината на средната конха и отварящи се в среден носов ход, и задни – такива, разположени назад и нагоре от ламината и отварящи се в горния носов ход. При етмоидалните клетки може да има голяма вариация – от наличната в до 98,5% от хората клетка *agger nasi*²⁸ – най-предно разположената от предната група, до по-непостоянните като честота клетка на Haller или инфраорбитална клетка²⁸, както и принадлежащата към задната група клетки клетка на Onodi или сфеноетмоидална клетка²⁸, и различни други вариации. Чести вариации, които имат голямо отношение и към клиниката, са вариациите по брой и разположение фронтуетмоидални клетки, които могат в различна степен да попречат на дренажа на фронталния синус. За последните са възникнали класификации (напр. по Kuhn и модифициран Kuhn по Wormald), които се съблюдават при оценка на преоперативните данни от образната находка и интраоперативно²⁸. Важна особеност на

етмоидалните клетки е, че латералната стена на голяма част от тях – lamina papyracea е същевременно медиална стена на очницата и отварянето на клетките по време на операция налага внимание въпросната lamina да не бъде увредена, което би довело до орбитални усложнения^{28,29}. Любопитна опция е частичното и контролирано отстраняване на lamina papyracea с цел орбитална декомпресия при пациенти с болест на Basedow (още болест на Graves) и екзофталам³⁰, или при пациенти с метастази в орбитата³¹.

Максиларните синуси са най-големите по обем и заемат вътрешността на едноименната кост от всяка страна. Те са налични и при раждането и нарастват по обем с растежа на лицевия череп и особено с израстването на постоянните зъби, тъй като зародишите им се съдържат в синуса и намаляват обема му преди появата си²⁶. Крайните си размери синусът достига около 20-годишна възраст²⁶, когато обемът му може да достигне до около 20 cm³. Характерно само за максиларния синус е съседството с корените на премоларите и моларите на горната челюст, което може да е предпоставка за възникване на патология – одонтогенен синусит, напр. при дълбоки кариозни процеси в зъбите, попадане на чуждо тяло при оперативна намеса върху тях и т.н. Друга специфична особеност е разположението на остиума в горната част на медиалната стена на синуса, което чисто гравитационно възпрепятства дренажа му. Максиларният синус и стените му граничат с ключови анатомични области и съответно синусът дава възможност за преминаване на инфекции или за оперативен достъп към или от тези зони. Предната стена на синуса се простира от margo infraorbitalis на очницата до алвеоларния израстък на челюстта²⁶. Тук се намира и вдлъбнатина, наречена fossa canina, под която костта е най-тънка, а в горния ѝ край се отваря foramen infraorbitale, от който излизат едноименните артерия, вена и нерв (V2)²⁶, кръвоснабдяващи и инервиращи сетивно лицето в тази област. Задно-външната стена на синуса е по-дебела, съответства на tuber maxillae и разграничава синуса от fossa pterygopalatina. Горната стена на синуса е и долна стена на очницата, като по горната ѝ, очнична повърхност инфраорбиталният съдово-нервен сноп върви в sulcus infraorbitalis, в последствие преминава в продължението на въпросния sulcus - canalis infraorbitalis, и накрая излиза през вече споменатия отвор foramen infraorbitale²⁶. Горната стена на синуса е зона, чийто пробив при оперативни намеси може да доведе до пролапс на очничното съдържимо и на съответните усложнения. Дъното на максиларния синус образува recessus alveolaris, като най-дълбоката зона на синуса е в областта на първия кътник²⁶. Тук са възможни описаните вече усложнения при зъбни инфекции или оперативни намеси. Медиалната стена на синуса е и същевременно латерална стена на носната кухина и го разделя от долния и средния носов ход. Към предната ѝ част заляга слъзният канал – ductus nasolacrimalis, а към горнозадната ѝ част се разполага естественият отвор на синуса – apertura sinus maxillaris. Достъп до нея има през носната кухина чрез среден носов ход, hiatus semilunaris и infundibulum^{26,28}. Естественият отвор е елипсовиден, а наличните понякога аксесорни отвори са кръгловати и са налични при около 10% от пациентите²⁸. Въпросните аксесорни отвори се намират в зоната на фонтанелите - две зони на медиалната стена, в които кост липсва и са покрити само с мукозата от страната на носната кухина и от

страната на синуса²⁸. Първата фонтанела - fontanella anterior – се намира пред processus uncinatus, а втората или задна – fontanella posterior – е зад него²⁸. Важно е да се спомене, че естественото движение и трептене на ресничките на епитела в синуса е само по посока на естествения отвор и отварянето на синуса в зоните на аксесорните отвори не води до „функционална“ операция²⁸.

Фронталният синус – sinus frontalis, започва развитието си най-късно в сравнение с останалите синуси – към 10-12-годишна възраст и го продължава до 20-26-годишна. Фронталният синус е синусът с най-големи вариации в обема (средно е около 4-7 см³) и формата, като може да има и значителни разлики между левия и десния такъв. Двата са разделени един от друг с преграда – septum sinuum frontaliu, която обаче рядко е разположена съвсем срединно и често в нея има отвор, позволяващ комуникация между двата челни синуса. Формата му най-често е на тристенна пирамида с основа, обърната към носната кухина. Фронталният синус се дренира най-често през recessus frontalis в среден носов ход или по-рядко (в около 14% от случаите) – през infundibulum^{27,28}.

Сфеноидалният синус (sinus sphenoidalis, клиновиден синус) се помещава в тялото на едноименната кост и е най-задно разположеният синус. Отворът му се разполага над хоаните и се отваря в recessus sphenothmoidalis, обемът му варира от 0,5 до 3 см³. Синусът се разделя на две от тънка пластина – septum sinuum sphenoidalium, която обикновено не е разположена напълно срединно. Развитието на сфеноидалния синус започва към 3-годишна възраст и той може да достигне крайния си размер чак към 20-годишна възраст²⁶. Сфеноидалният синус е в близост до структури от ключова важност – a. carotis interna, n. opticus, sinus cavernosus и черепно-мозъчните нерви, преминаващи през sinus cavernosus (n. abducens) и в стената му (n. oculomotorius, n. trochlearis, n. ophthalmicus, n. maxillaris).

Физиологията на носната кухина и параназалните синуси е неразривно свързана с основните им функции. Основните функции на носните кухини са дихателна, обонятелна, защитна и резонаторна. Дихателната функция, освен самото провеждане на въздуха към назофаринкса чрез хоаните, включва и затопляне и овлажняване на вдишания въздух. Ключова роля за това има богато кръвоснабдената лигавица на носните половици, както и специализираните структури, наподобяващи кавернозните тела в пениса (анастомози между артериоли и вени), позволяващи бързо кръвонапълване, включително се описва тъй наречената „септална конха“ – зона на септума, също съдържаща подобни венозни синуси³². Наличието на последните в носната кухина има отношение и към т.нар. назален цикъл – редуваща се конгестия на едната носна половина, случваща се едновременно с деконгестия на другата, които в следствие се разменят, обикновено на 4-8 часа. За затоплянето и овлажняването на въздуха важна роля играе самата анатомия на носните половици и присъствието на конхите, които съществено

увеличават площта на контакт на въздуха с лигавицата. Допълнителна особеност е преминаването на вдишания въздух основно през средния носов ход, което създава предпоставки за турболентно движение, усилващо допълнително контакта с лигавицата. Издишваният въздух пък основно преминава през долния носов ход, където движението е по-ламинарно и намалява топлообмена с лигавицата²⁶. Защитната функция на носните кухини се обуславя от механичното пречистване на вдишания въздух от прахови частици, бактерии и т.н. и имунната функция на лигавицата. За механичното пречистване основна роля играе мукусът, покриващ лигавицата, както и мукоцилиарният клирънс. Мукусният слой е образуван от две фази – по-гъста гел фаза, разположена по-повърхностно и контактуваща с външната среда и улавяща повечето по-големи частици и бактерии от въздуха, и по-течна зол фаза, разположена над самите клетки на лигавицата, и в която трептят ресничките. Мукусът се произвежда от чашковидните клетки на лигавица и от субмукозни жлези. Самият епител на носните кухини, който по продължение обхваща и синусите, е еднореден ресничест епител, който обаче често бива описван като „привидно многослоен“ ресничест поради характерния му вид при наблюдение на негов хистологичен препарат. Посоката на трептене на ресничките във всички синуси е по посока на отвора им към носната кухина, а в последната е по посока на назофаринкса. Защитната функция на носната лигавица се изпълнява и от клетките на имунитета, пръснати из нея – лимфоцити, неутрофили, мастоцити, макрофаги и т.н., от антитела – основно IgA (секреторно антитяло), IgM и IgG, реагиращи към специфични антигени, от неспецифични протективни фактори – лизозим, интерферон, протеазни инхибитори, система на комплемента и т.н. По този начин лигавицата на носната кухина може да реагира както с първичен или неспецифичен отговор на патогените от средата, така и с вторичен или придобит.

Обонятелната функция се изпълнява от обонятелния епител, до който чрез дифузия достигат вдишаните мирисни вещества. Попаднали в обонятелната зона те се разтварят в секрета на Баумановите жлези и така достигат до сетивните обонятелни клетки. Роля за възприемането на химичния дразнител и преобразуването му в невронен сигнал имат рецепторите, свързани с G-протеин, който при свързване с одорант превръща аденозин трифосфат в цикличен аденозин трифосфат (сАМР). Последният се свързва в последствие с натриево-калциеви канали, които, отваряйки се в по-голям брой, деполяризират сетивната клетка и водят до генериране на акционен потенциал²⁸. Сигналят се предава от по централния израстък (аксонът) на сетивната клетка по *fila olfactoria* – снопове от аксони на сетивните олфакторни клетки – през *lamina cribrosa* на етмоидалната кост и навлизат в *bulbus olfactorius*, където се намира вторият неврон²⁶. От него обонятелната информация се предава до първичните обонятелни центрове – *trigonum olfactorium*, *area olfactoria* и *septum pellucidum* и в последствие – до амониевия рог на хипокампа²⁶.

В допълнение към описаната олфакторна зона и функция - при хората може да бъде открит в предно-долната част на септума в малка ямка или вдлъбнатина тъй нареченият орган на Jacobson или *organ vomeronasale*. При множество бозайници от него излиза нерв, който свързва сетивните клетки на органа с ЦНС и има роля при възприетието на феромони и половото поведение²⁸. При хората в някои индивиди и фетуси може да се

открие свързваният с аналогична функция n. terminalis (ЧМН 0 или „нулев“ черепно-мозъчен нерв)²⁸. Биопсии от зоната на вомероназалния орган откриват хистология, подобна на тази на олфакторната зона. Въпреки провеждането на множество изследвания за установяване на функция на органа при хората или на негова връзка с ЦНС при човека, такива до момента не са установени и въпросът остава отворен²⁸.

Резонаторната функция на носната кухина се изпълнява чрез модификацията на тембъра на гласа, която е силно специфична при всеки индивид. В допълнение в повечето човешки езици има напълно „назални“ звуци („н“, „м“), при които вследствие на затваряне на орофаринкса от устната кухина въздухът се пренасочва към назофаринкса и впоследствие – към носната кухина³³. При запушване на носа гласът се променя по специфичен начин – той става гънлив или още „носов“ глас – rhinolalia clausa, докато при анатомичен или функционален дефицит на мекото небце може да се получи rhinolalia aperta²⁶.

Функцията на синусите е значително по-неясна. Намаляване теглото на черепа, резонаторна функция и топлинна изолация на черепната кухина са сред най-класическите хипотези^{25,34}, често цитирана и проучвана е и имунната функция, обусловена от производство на NO (азотен оксид)^{35,36}. Обсъждана функция е и предоставянето на „буферна зона“ при травми в областта на главата, както и спомагателна функция при пречистване и овлажняване на вдишания въздух³⁴. Интересна нова хипотеза е, че синусите всъщност нямат истинска функция, а са продукт на еволюционното предно-задно скъсяване на носните кухини на по-ранните примати и придобиването на по-плоско лице; при този процес се спекулира, че наличният „обем“ е намерил пространство за себе си, вдавайки се в околните кости и формирайки синуси³⁷.

2.2. Хроничен риносинуит

Хроничният риносинуит генерално се дефинира като симптоматично възпаление на назалните кухини и параназалните синуси с по-голяма давност. Терминът „риносинуит“ се ползва с преимущество пред „синуит“ поради почти винаги присъстващото възпаление и на лигавицата на носната кухина. Различен като патогенеза и съответно като наименование е одонтогенният синуит (sinusitis odontogenica), при който възпалението често остава ограничено само в синуса.

Така даденото генерално определение за хроничен риносинуит поради своята непълнота и липса на конкретика се измества в резултат на по-скорошни усилия за по-точна дефиниция на хроничен риносинуит и на синуит изобщо. В това отношение едно от най-значимите събития е становището на Rhinosinusitis Task Force (1997)³⁸, в което се налагат по-конкретни критерии. Обобщени са например „главни фактори“ и „малки фактори“, като за поставяне на диагноза и съответно за дефиниране на състоянието като „синуит“ е нужна определена комбинация от фактори. Ключов момент е въвеждането и на времеви изисквания и дефинирането на острия риносинуит като възпаление на носа и синусите за по-малко от 4 седмици, на подострия риносинуит – като

възпаление, траещо между 4 и 12 седмици и на хроничния – като възпаление, траещо повече от 12 седмици^{38,39}. Конкретно за ХРС освен времевия критерий е нужно наличието на комбинация от поне два „големи“ фактора или един „голям“ и два „малки“ фактора:

„Големи“ фактори:

- Лицева болка или чувство за напрежение
- Чувство за пълнота в лицето
- Назална обструкция/запушване
- Назална секреция (независимо от цвета или мястото на стичане – напред, назад или и двете)
- Хипосмия или аносмия
- Наличие на пурулентен секрет в носната кухина
- Температура (при остър риносинусит)

„Малки“ фактори:

- Главоболие
- Температура (при хроничен риносинусит)
- Халитоза
- Чувство за умора
- Болка в зъбите
- Кашлица
- Болка или чувство за налягане или пълнота в ушите

В последващите десетилетия тези определения претърпяват различни модификации като една от най-често използваните е тази на American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery⁴⁰. Конкретно за ХРС критериите са следните⁴⁰:

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

И

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

В контраст с критериите за поставяне на диагноза ХРС критериите за диагностициране на остър риносинусит (ОРС) са следните⁴⁰:

- до 4 седмици от пурулентен назален секрет (стичащ се напред през ноздрите, назад към назофаринкса или и двете), придружен от назална обструкция или чувство за тежест/болка над синусите или и двете

Диагнозата рекурентен остър риносинусит пък се поставя при наличие на четири или повече епизода на остър риносинусит в рамките на една година, с давност на всеки епизод повече от 7-10 дни и пълно оздравяване и липса на симптоми между епизодите^{40,41}

За отбелязване е осъзнаването на нуждата от обективно установени белези за поставянето на диагнозата „ХРС“, а не само на докладвани субективни симптоми от пациента. Множество проучвания по темата за ХРС, изследващи болестта и различните влияещи върху нея фактори, понякога разчитат на въпросници и следователно тежестта на изводите им е по-малка, въпреки относително доброто им ниво на надеждност^{2,42}.

2.2.1. Патофизиология

За патогенезата на заболяването ключов е затрудненият дренаж на засегнатите синуси, причинен от отока на мукозата около отвора на синуса към носната кухина. Затрудненият дренаж пък води до застои на мукус, създаващ предпоставка за бактериален растеж (Фигура 2). Получава се своеобразен порочен кръг (circulus vitiosus). Честите възпаления в един момент довеждат до ремоделиране на околните костни структури, често водещо до допълнително стесняване на отворите на синусите и допълнително затруднение на дренажа им⁴¹.



Фиг. 2. Патогенеза на риносинуит

Особеност на патогенезата на хроничния риносинуит в детската възраст обаче е по-малката роля на остиомеаталната обструкция и по-голямото значение на аденоидната хипертрофия^{43,44}. Ефектът на последната се дължи както на механичното блокиране на дренажа на секретите от носните половици и синусите към назофаринкса, така и на предоставяне на резервоар за реинфекция на носната кухина^{43,44} (разгледано по-подробно в 2.3.2.).

2.2.2. Фактори

Фактори, които влияят върху развитието на ХРС, са бактериални биофилми, чести остри инфекции, остейт, алергии, суперантигени на *S.aureus* (фактор за развитие на полипи), гъбични инфекции и индивидуални фактори (анатомични особености, особености на имунитета, придружаващи заболявания – автоимунни болести, муковисцидоза, синдром на Картагенер) и чести инфекции. Най-общо могат да бъдат класифицирани като външни фактори и фактори, свързани с пациента

2.2.2.1. Външни фактори

2.2.2.1.1. Гъбична инфекция

Често при пациенти с ХРС се открива наличие на гъбички в носните кухини и синусите и поради това е била формулирана хипотеза за гъбична етиология при ХРС. Въпросната хипотеза предполага повишен възпалителен отговор към често преносимата по въздуха

гъбичка *Alternaria* и че именно това е водещата причина за развитие на ХРС с полипи и ХРС без полипоза^{28,45,46}, като е проучено, че *in vitro* *Alternaria* води до освобождаване на цитокини, миграция и дегранулация на еозинофили²⁸. Допълнителни проучвания обаче, включително такива с периферна кръв⁴⁷ и такива с ХРС на лечение на пациенти с интраназален Амфотерацин В⁴⁸, до голяма степен са отхвърлили хипотезата за водеща роля на гъбичките в ХРС^{49,50}. Въпреки това не може да се отхвърли спомагателната роля на гъбичната инфекция или колонизация при развитието на ХРС²⁸, които обаче имат водеща роля при трите вида гъбичен риносинусит – гъбична топка (fungal ball), алергичен фунгален риносинусит (Allergic fungal rhinosinusitis, AFRS) и инвазивен фунгален/гъбичен риносинусит²⁹.

2.2.2.1.2. Вирусни инфекции

Данните, че вирусни инфекции стоят в основата на ХРС, са незадоволителни⁵¹, но е възможно чести вирусни инфекции да водят до предиспозиция за развитие на ХРС в по-късна възраст. Последната хипотеза частично е подкрепена от данни, че честите вирусни инфекции в ранна детска възраст са свързани с последващо развитие на астма⁵². Допълнително вирусните инфекции имат роля за екзацербации на ХРС и способността им да нарушават епителната бариера на горните дихателни пътища не позволява пълното им отхвърляне като спомагателен фактор за развитие на ХРС²⁸.

2.2.2.1.3. Бактерии и бактериални биофилми

Освен значението им при острия риносинусит ролята на бактериите в ХРС е утвърдена и призната, но конкретните начини, по които бактериите влияят на състоянието, са по-малко ясни. Носът и синусите доказано не са стерилни зони, като е установена разлика в микробиома между здрави пациенти и такива с ХРС⁵³. От всички бактериални видове *Staphylococcus aureus* е най-често изолираният и проучван и вероятно има роля в хронификацията на синусита^{54,55}.

Все по-категорични са данните за участието на бактериални биофилми в патогенезата на ХРС^{8,9,13}. Установено е участие на множество бактериални видове като *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *S.aureus* и *P. aeruginosa* като биофилми⁵⁶, като участието на последните два се свързват с по-лоша прогноза⁵⁷. Особеностите на бактериалните биофилми и участието им в ХРС ще бъдат разгледани допълнително в точка 2.3.1 и 2.3.2 съответно.

Допълнителна роля, която бактериите вероятно имат за развитието на ХРС, е участието на *S. aureus* и негови токсини, играещи ролята на суперантиген, за развитието на ХРС с назални полипи⁵⁸. Установено е обаче и че при голяма част от пациентите с полипи няма данни за алергичен свръхотговор и към момента се счита, че *S. aureus* и негови суперантигени играят роля за модифициране на болестта⁵⁹.

2.2.2.1.4. Алергени

Усилено изучавана е ролята на алергените и на алергичния ринит (АР) при развитието на ХРС, като много проучвания демонстрират повишена честота на атопия и алергичен ринит при пациентите с ХРС спрямо популацията²⁸. Нелекуваният алергичен ринит, навярно чрез увеличен оток на лигавицата, затрудняване на дренажа и вентилацията на синусите и задръжка на секрет, води до влошаване на симптомите на ХРС⁶⁰. Установено е също, че липсата на лечение на алергичен ринит води до влошени следоперативни резултати при пациенти с ХРС²⁸. Клетъчните и хуморалните механизми при развитието на алергия и алергичен ринит до голяма степен се припокриват с механизмите на развитие на ХРС, като скорошни проучвания са доказали, че при натоварване на пациенти с АР с алерген и проследяване на последващите промени, включително отока на лигавицата с компютърна томография, се установява, че те обхващат и синусите^{61,62}. Има съответно огромно припокриване в клиниката и презентацията на двете болести, включително когато става дума за критериите за поставяне на диагноза⁴⁰. Въпреки всичко „приносът“ на АР към ХРС е относително малък и методи като избягване на алергена, алерген-специфично лечение и имунотерапия намаляват някои от симптомите при ХРС, но не обръщат хода на болестта^{28,63}. Като цяло, с изключение на патологии като алергичен гъбичен риносинусит и потенциалния принос на суперантигени на *S. aureus*, алергичният ринит се смята за фактор, насложен и усложняващ ХРС, който в различна, но генерално умерена степен, влияе на възпалението при ХРС²⁸.

2.2.2.1.5. Токсини и иританти

Ролята на различни токсини и иританти от околната среда, както и такива, често срещани при различни професии, е отдавна дискутирана, без да се стигне до категорични изводи, говорещи за ясна връзка между тях и ХРС. В голямо метапроучване⁶⁴, обединяващо редица по-малки, се анализира ролята на разнообразни дразнителни, сред които пушек, хромалдехид, хром, никел, арсеник, оцветители и дори излющена кожа или пърхот от прасета. Категорични и надеждни изводи обаче не са установени и влиянието на различните професии върху развитието на ХРС остава отворена тема⁶⁴. Токсини, които са добре проучени и имат роля за развитието на ХРС, се отделят обаче при тютюнопушенето. Цигареният дим уврежда епителната бариера на носната кухина и синусите чрез производство на активни радикали на азот и кислород, уврежда мукоцилиарния клирънс, води до повишен риск за формиране на биофилми и опосредства инфламаторен цитокинен отговор^{28,65,66}. Допълнително е установено, че пушенето значително влошава следоперативните резултати и прогноза при пациенти с ХРС, преминали ендоскопско лечение⁶⁷.

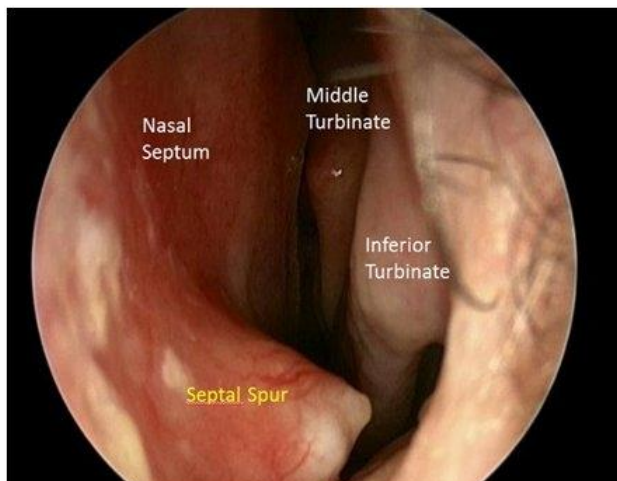
2.2.2.2. Фактори от страна на пациента

2.2.2.2.1. Анатомични вариации и особености

Анатомичните вариации включват структури като *concha bullosa*, *agger nasi* клетка, инфраорбитална клетка (на Haller), сфеноетмоидална клетка (на Onodi) и така наречената парадоксална средна конха²⁸.

Една от най-често срещаните вариации при повечето проучвания е *agger nasi* клетката, описана и в точка 2.1. Според едно от проучванията⁶⁸, разглеждащи честотата на отделните вариации, тя се среща при 64% от хората (процентът варира широко и е докладвано наличието и в до 98,5% от хората²⁸) и се установява статистически значима взаимовръзка между двустранното наличие на такава клетка и симптома затруднено носно дишане. Няма обаче категорично установена причинно-следствена връзка между наличието на такава клетка и развитието на ХРС.

Друга често срещана вариация е девиация на септума (Фигура 3), каквато (в зависимост от нивото на изкривяване, което ползваме за поставяне на такава диагноза) може да се среща в над 50% от популацията^{69,70}, вкл. до 76,4%^{71,72}, но често се определя на около 20%^{68,73}. Макар да съществува хипотеза за взаимовръзка между наличие на девиация на септума и развитие на ХРС⁶⁹, категорична такава не е доказана и наблюдаваната честота на септална девиация при пациенти с ХРС често е сходна с тази в общата популация⁷².



Фигура 3. Девиация на назалния септум; Фигурата е адаптирана от Stanford Medicine; Otolaryngology – Head & Neck Surgery⁷⁴; <https://med.stanford.edu/>

Concha bullosa (Фигура 4) наричаме средна конха, която съдържа аерирана клетка. Такава структура се визуализира като разширена зона на средната конха, която може да предизвиква обструкция на остиомеаталния комплекс. При липса на анамнестични данни за риносинусит обаче случайното откриване на такава средна конха при ендо-

скопия или при образно изследване (напр. КТ) не налага последващи мерки^{28,68}. Повечето пациенти с анатомични вариации остават асимптоматични. При проучване, включващо разглеждане на 172 компютърни томографии, булозна конха е била открита в 28% от пациентите, имащи история за риносинусит и в 26% от пациентите, нямащи такава⁶⁸. В друг труд честотата ѝ се определя на до 88%⁷¹. Пневматизиран *processus uncinatus* е друга анатомична вариация, която е дори още по-рядка, но може да допринесе за обструкция на остиомеаталния комплекс. Пневматизирани долна и горна конха се срещат, макар и рядко, но нямат ясно клинично значение²⁸.



Фигура 4. Двустранна *concha bullosa*; Фигурата е адаптирана от „The incidence of *concha bullosa*, unusual anatomic variation and its relationship to nasal septal deviation: A retrospective radiologic study“⁷⁵

Други анатомични вариации като инфраорбитална клетка, сфеноетмоидална клетка, фронтална междусинусова клетка и т.н., както и разгледаните до момента, нямат доказано отношение към развитието на ХРС, но се смята, че е възможно да допринасят за прогресията на болестта⁷².

2.2.2.2.2. Придружаващи болести и състояния

В допълнение към външните фактори има множество състояния и придружаващи болести, които могат да доведат до развитие на ХРС. Сред тях са автоимунни болести като грануломатоза на Вегенер и синдром на Чърг-Щраус (Churg-Strauss syndrome), състояния като аспиринова непоносимост и астма (Триада на Samter – астма, назални

полипи, аспиринова непоносимост), и болести като муковисцидоза (кистична фиброза) или първична цилиарна дискинезия²⁹. Последните две са особено чести при развитие на полипоза в детска възраст и откриването на такава следва да води до изследване за тези болести⁷⁶.

Придружаваща болест, чиято роля за развитие на ХРС е често проучвана и чиято честота сама по себе си налага отбелязване, е гастроезофагеалната-рефлуксна болест (ГЕРБ). Това състояние е често в развитите държави, засяга между 18,1%-27,8% от популацията в Северна Америка⁷⁷ и 8,8%-25,9% в Европа⁷⁷ и се счита за една от „болестите на цивилизацията“. Въпреки че често бива посочена за рисков фактор при пациенти с ХРС, връзката между двете заболявания все още не е напълно изяснена^{78,79}. Изводите от голямо скорошно метапроучване по темата, а именно – че има данни за потенциална патологична роля на ГЕРБ в патогенезата на ХРС⁸⁰, са пореден аргумент за патогенетичната връзка между двете. Установено е съществено повишено присъствие на *H. pylori* и киселинност по лигавицата на пациенти с ХРС в сравнение с контроли без болестта⁸⁰. Допълнително е била изказана хипотезата, че преглъщане на постназален секрет може да води до повишена киселинност и риск от рефлукс т.е. връзката е двупосочна⁸⁰.

2.2.3. Клиника

Симптомите на ХРС могат варират като сила и застъпеност, най-честите от тях са назалната обструкция, чувство за тежест или болка в главата, секреция от носа (включително постназална секреция) и хипосмия. Други такива са: честа нужда да се издухва носа, кихане, кашлица или подкашляне, гъст носен секрет, заглъхване на ушите или болка в тях, замайване, понижено обоняние (хипосмия или аносмия), понижен вкус (хипогевсия или агевсия), трудно заспиване, чести нощни събуждания, лошо напиване, умора след сън, генерално чувство за умора, намалена продуктивност и концентрация, повишена нервност, минорно настроение, болка в областта на зъбите, лош дъх, хипоназален или „носов“ говор и други. Повечето от описаните са залегнали във въпросници за оценка на субективната тежест на заболяването като например въпросникът Sino-nasal Outcome Test 22 – SNOT22⁸¹.

По отношение на чувството за тежест или болка в лицевата зона има приблизително съответствие между зоната, в която се усеща болката, и засегнатия синус. Фронталният синусит се усеща като болка, разположена от glabella от съответната страна към и под веждата и нагоре към съответната половина на челото (зависи и от нивото на пневматизация на синуса). Възпаление в етмоидалните клетки се усеща генерално като тежест или болка между и зад очите и латерално от пирамидата на външния нос. Възпалението в максиларния синус се усеща генерално като болка под ипсилатералното око и в областта на fossa canina. Сфеноидалният синусит се усеща като дълбока болка обикновено зад очите⁸¹, но локализацията на усещането за болка може силно да варира – окципитално, на темето при vertex и дори до болка в ушите⁸². Други „класически“ прояви на болката от синусит са, че е обикновено по-силна сутрешно време⁸³ и

че се засилва при навеждане на главата надолу⁸³, както и при промени на налягането, независимо дали става дума за външно атмосферно или при кашляне и кихане²⁵. Болката най-често се описва като пулсираща, тъпа и тежка с трайност от минути до часове^{25,83}.

2.2.4. Диагноза, диференциална диагноза и видове хроничен риносинусит

2.2.4.1. Поставяне на диагноза

Критериите за поставяне на диагнозата са, както и става дума в точка 2.2., различни и често еволюиращи, като се предпочита наличието на обективни такива. Понастоящем по-общоприети са цитираните критерии на American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery⁴⁰:

1) 12 седмици или повече от два и 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

И

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

Допълнителни методи, с които се увеличава специфичността на диагнозата, са различните скали, ползващи се за оценка на ендоскопска находка (напр. скалата на Lund-Kenedy – точка 2.5.2) и на тази от образната диагностика (напр. скала на Lund-Mackay – точка 2.5.3).

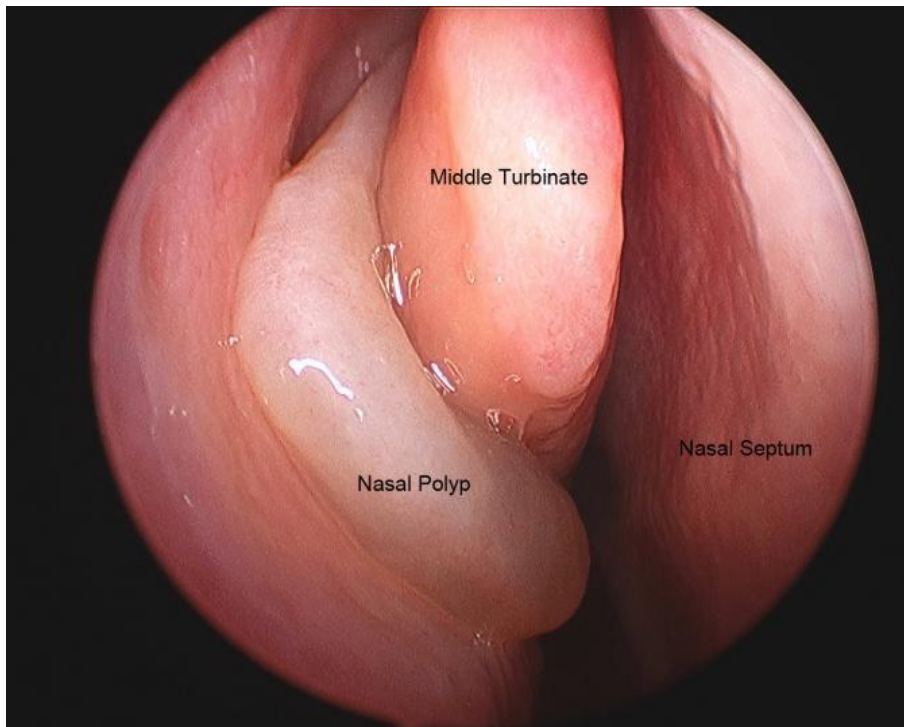
2.2.4.2. Диференциална диагноза

В графата диференциална диагноза при ХРС могат да попаднат изключително много патологии. Болката при ХРС, когато изобщо е налична, трябва да се разграничи от главоболия, дължащи се на други причини, както от първични главоболия – мигрена със

или без аура, тензионно главоболие, сънно (hypnic) главоболие и клъстерно главоболие^{84,85}, така и от вторични, дължащи се на многобройни причини⁸⁵, като напр. мозъчни тумори или аневризми, менингит, интракраниални хематоми и абсцеси, травми и т.н. Наличието на назална обструкция и ринорея трябва пък да се разграничава от изолиран ринит, независимо от причините – алергичен, инфекциозен, вазомоторен и т.н. Аносмията може да се дължи на обструкция от други причини, невросензорни нарушения, травми⁸⁵ и други. В диференциалната диагноза на хроничния риносинуит с назална полипоза може да бъдат включени инвертен папилом, антрохоанален полип, ангиофибром, енцефалоцеле, малигнени заболявания като плоскоклетъчен карцином, лимфоми, олфакторен естезионевробластом, рабдомиосарком⁸⁵.

2.2.4.3. Видове ХРС и класификация

Хроничният риносинуит се класифицира най-често като ХРС без назална полипоза (chronic rhinosinusitis without nasal polyps - CRSsNP)⁴¹, ХРС с назална полипоза (chronic rhinosinusitis with nasal polyps – CRSwNP)⁴¹ (Фигура 5) и алергичен гъбичен риносинуит (allergic fungal rhinosinusitis, AFS)⁴¹. Последната класификация е една от по-утвърдените и за първи път е въведена през 2004 г. от Американската академия по Отоларингология - Хирургия на глава и шия (American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery) и други асоциирани организации⁸⁶. Определение изисква единствено последният изброен подвид – алергичният гъбичен риносинуит. Въпросният се характеризира с наличието на алергичен „муцин“ – гъст мукус с еозинофили и гъбични хифи. Критериите за диагностициране на AFS са въведени от Bent и Kuhn⁸⁷: Тип I свръхчувствителност към гъбички, назални полипи, характерна образно-диагностична находка, еозинофилен мукус без инвазия на гъбички към подлежащите тъкани и изолиране на гъбички. Особено характерно за него е ремоделирането на костните стени на засегнатите синуси и разширяването на последните²⁹.



Фигура 5. Назален полип, изхождащ от среден носов ход; Изображението е адаптирано от European Forum for Research and Education in Allergy and Airway Diseases (euforea.eu)⁸⁸

Освен посочената класификация на хроничния риносинуит съществуват и по-нови класификации, които разделят ХРС на база на други белези; такава например е тази, разглеждаща ХРС като еозинофилен, неоеозинофилен и смесен⁸⁹, първичен и вторичен ХРС⁷² и други.

2.2.5. Лечение

Лечението на ХРС обикновено се свежда до медикаментозна терапия и хирургично лечение, като до второто се прибъгва при недостатъчно повлияване на симптомите на пациентите, т.е. при провал на консервативното лечение. Въпреки напредъка на ефективността на лекарственото лечение, дължащ се както на въвеждането на нови медикаменти, така и на по-добро знание как да се ползват вече наличните, до оперативно лечение по повод ХРС в САЩ всяка година прибъгват над 250 000 пациенти²⁸.

2.2.5.1. Консервативно лечение

2.2.5.1.1. Антибиотично лечение

Бактериите винаги са били смятани за основен компонент в патофизиологията на ХРС като вярването, че ХРС е персистираща или рецидивираща инфекция е било подкрепено от силното присъствие на патогенни бактерии в синуназални култури^{28,90}.

Понастоящем по-силно е застъпена хипотезата за преимущество на възпалителния спрямо инфекциозния процес в ХРС, но ролята на бактериите при екзацербации и хронификация със сигурност не е отречена. В скорошно проучване сред лекари, членове на American Rhinological Society, над 90% от тях смятат антибактериалното лечение за основен компонент на лечението на ХРС, като особено се акцентира на такова лечение преди решение за оперативно лечение⁹⁰. Начините на приложение на антибиотиците могат да се разделят на перорални, интравенозни и топикални.

2.2.5.1.1.1. Перорални антибактериални средства

Антибиотиците, класически използвани при лечение на ХРС, могат условно да се разделят в две групи – макролидни и немакролидни. Макролидните антибиотици са особено застъпени при лечението на ХРС, както и на други хронични патологии - като например астма и муковисцидоза, поради наличието освен на антибактериални, така и на добре известните им антиинфламаторни свойства²⁸. От немакролидните антибиотици най-често се използват пеницилини, цефалоспорини и флуорхинолони, както и други, като ефектът им върху ХРС се отдава на антибактериалните им свойства.

Големи различия се срещат в препоръчителния срок на антибактериално лечение, като повечето препоръки класифицират пероралното лечение като краткосрочно с курсове от по 3-4 седмици или по-малко и на дългосрочно с курсове с продължителност до и надхвърляща 3 месеца^{72,91}. Като цяло обаче, независимо от вида на използвания антибиотик и продължителността на курса, резултатите от проучванията на ефективността на антибиотичното лечение върху ХРС не са еднозначни и повечето не съобщават големи или трайни промени в различните показатели на болестта, включително в качеството на живот на пациентите²⁸.

2.2.5.1.1.2. Интравенозни антибактериални средства

Има относително малък брой проучвания, разглеждащи приложението на венозни антибиотици при ХРС и ефекта им, като те обаче не са с оптимален дизайн и твърде голям брой пациенти са показали усложнения⁹²⁻⁹⁴. Поради това, както и поради голямата цена на такъв тип лечение, има препоръки срещу рутинна употреба на интравенозна антибиотична терапия при пациенти с ХРС⁹⁵.

2.2.5.1.1.3. Топикални антибактериални средства

Въпреки привлекателността на доставянето на антибиотичните средства директно до възпалената лигавица при риносинусит през годините има относително малко натрупани солидни доказателства за ефективността на това лечение²⁸. Правени са множество проучвания, вкл. с различни методи за приложение – иригация/капки, небулизирани

антибиотици или със спрейове, като при повечето, които са били плацебо-контролирани, не се е доказала съществена разлика между пациентите с плацебо и тези с реална антибиотична терапия^{28,72,95}. Въпреки това има известна еволюция в разбиранята и препоръките на EPOS от 2012 г. срещу рутинната употреба на топикални антибактериални средства⁹⁵. В изданието на EPOS от 2020 г. това е променено на по-либералното „безопасно за употреба“, въпреки че отново се постановява, че няма съществена разлика на това лечение спрямо плацебо⁷². За отбелязване е, че се докладват малко по-добри резултати при използването на мупироцин спрямо други антибиотици⁷². Много от експериментите с топикална терапия понастоящем са насочени към справянето с бактериалните биофилми, когато такива са налични, и особено акцентират върху опити с небулизирани антибиотици⁹⁶.

2.2.5.1.2. Антимикотично/Антифунгално лечение

Ролята на гъбичките при развитието на ХРС е отдавна дебатирана, но с изключение на изцяло гъбичните типове риносинусит (описани в точка 2.2.2.1.1) дефинитивна такава при негъбичните не е установена²⁸. Правени са множество клинични проучвания, вкл. такива с добър дизайн и плацебо контролирани, както с топикални средства (Амфотерацин В), така и със системни антимикотици, но дори и при тези проучвания, установяващи подобрене в симптомите на пациентите, има необосновано голям процент странични реакции на по-дългосрочна такава терапия⁹⁵. С оглед на това - поне що се касае до препоръките на EPOS, няма изменение и има препоръка срещу рутинно използване на антимикотични средства при пациенти с ХРС^{72,95}.

2.2.5.1.3. Кортикостероиди

2.2.5.1.3.1. Топикални/назални кортикостероиди

Назалните стероиди (или още „интраназални стероиди“), независимо дали прилагани като иригация, спрей или в небулизирана форма, имат добре известно и категорично доказано полезно действие при пациентите с ХРС. Противовъзпалителните им свойства отлично влияят на предимно инфламаторната патогенеза на ХРС, при която има изразено повишаване на дейността и броя на инфламаторни клетки, цитокини и хемокини^{72,95}. Възможността такива средства да се прилагат локално е от изключително значение за намаляване на иначе сериозните странични ефекти, които са налични при системно стероидно приложение. Топикалните стероиди подобряват симптоматиката на пациентите, намаляват размера на полипите при ХРС с назална полипоза и подобряват прогнозата като цяло, вкл. намаляват честота на рецидиви след хирургично лечение. На база на всичко това топикалните стероиди са силно препоръчани като безопасно и ефективно лечение при ХРС^{72,95}. Дължината на курса на лечение варира силно, като при повечето проучвания са тествани курсове между 4 и 12 седмици. Има

обаче и експерименти с изключително дълги такива, вкл. до 1 година⁷²; не се установява съществена разлика между различните видове стероиди⁷². По отношение на безопасността и страничните ефекти на лечението – установена е малка разлика в честотата на епистаксис, който е бил лекостепенен, като той е по-чест при пациентите с назални стероиди спрямо плацебо групите (в някои от проучванията обаче не се установява разлика). Не се установява потискане на хипоталамо-хипофизно-адреналната ос, увеличаване на вътреочното налягане, екзацербации на астма или увеличаване на случаите на остър риносинусит⁷².

2.2.5.1.3.2. Орални кортикостероиди

Системното приложение на стероиди чрез перорален прием е с добре известен и мощен противовъзпалителен ефект. Същевременно са добре известни и съществените странични ефекти, наблюдавани особено при по-дългосрочна такава терапия. Понастоящем на база на информацията, налична от множество правени проучвания, оралните стероиди се препоръчват в кратки курсове (най-често от по 2 седмици) при пациенти с ХРС с назална полипоза (CRSwNP) в комбинация с назални стероиди или без такива⁷². Такива курсове представляват добър компромис между добро повлияване на симптомите, както и на подобряване на прогнозата при пациенти, вкл. следоперативно, и същевременно приемлива честота и тежест на страничните реакции. Няма щателни проучвания и съответно препоръки за ролята на оралните стероиди при лечението на ХРС без полипи – CRSsNP^{28,72}.

2.2.5.1.4. Антихистамини

Предвид голямото припокриване в симптомите и протичането на ХРС и на алергичен ринит и предполагаемата роля на алергиите в развитието на ХРС (по-обстойно разглеждана в 2.2.2.1.4.) антихистамините (както пероралните, така и назалните/топикалните) често се обсъждат като част от лечението на ХРС. Нужно е да се отбележи, че са правени относително малко стойностни проучвания по въпроса^{28,72}, като за CRSsNP задоволително такава няма⁹⁷. Има едно по-значимо проучване, изучаващо ефекта на антихистамини (цетиризин) върху пациенти с CRSwNP, в което има плацебо група⁹⁸. В него се установява намаляване на честотата на кихане и на ринорея при пациентите на цетиризин спрямо плацебо групата, но силата и качеството на доказателствата са оценени като слаби⁷². Не се е установил ефект върху размера на полипите. Като цяло към момента няма достатъчно категорични данни, които да покажат съществена роля на рутинното приложение на антихистамини при лечението на ХРС⁷².

Тук е важно да се упомене и ролята на антихистамините при лечение конкретно на алергичен ринит (АР) и да се направи съпоставка спрямо други медикаменти (за случаите, при които пациентите с ХРС имат в допълнение и доказан алергичен ринит). Въпреки добре доказаната роля на антихистамините при лечението на АР е известно и

че те имат много малък ефект за деконгестия на оточната лигавица⁹⁹. В допълнение към това при сравнителни изследвания на ефектите на назалните стероиди и антихистамините^{100,101} е установена по-добра ефективност на интраназалните стероиди и съответно те се предпочитат като средство на избор²⁸. Редно е да се допълни и че са правени проучвания, сравняващи ефекта на интраназални стероиди спрямо комбинация от интраназални стероиди и перорален антихистамин при АР^{102,103} и значима разлика в ефективността не е установена. Такава обаче е описана при проучване, сравняващо ефекта на интраназални стероиди и на интраназални стероиди с локален антихистамин (азеластин)¹⁰⁴ при АР, като в този случай комбинираното лечение се е оказало по-ефективно. Въпросните данни е важно да бъдат взимани предвид при избор на терапия на пациенти с ХРС, които същевременно имат и АР.

2.2.5.1.5. Промивки с физиологичен разтвор

Промивките с физиологичен разтвор и солеви разтвори като цяло са се утвърдили като важен и постоянен компонент от дългосрочното лечение на ХРС, както при CRSwNP, така и при CRSsNP²⁸. Това се дължи освен на ниската цена на тази терапия, така и на ползотворните ѝ ефекти, които включват освен чисто механична иригация и промивка на секретите от носните половици, така и подобряване на движението на ресничките на псевдомногослойния епител и по този начин – подобряване на мукоцилиарния клирънс¹⁰⁵. Промивките се препоръчват и при пациенти, преминали оперативно лечение във връзка с ХРС¹⁰⁵. Голям брой проучвания са изследвали ефекта на промивките с физиологичен разтвор върху патологично променени носна кухина и синуси, като известна специфика е липсата на опция за плацебо група предвид липсата на вещество, което да послужи за плацебо. В резултат на това повечето клинични проучвания сравняват ефекта на промивките с група пациенти без промивки. Систематично ревю проучване от 2013¹⁰⁶ разглежда няколко въпроса, свързани с промивките с физиологичен разтвор и достига до следните изводи: няма съществена разлика между изотонични и хипертонични разтвори; промивките с по-голям обем (поне 240 мл) са по-ефективни от промивки с по-малък обем (напр. чрез назални спрейове), ефект има както при пациенти с CRSwNP, така и при такива с CRSsNP, като обаче е по-изразен при първата група^{95,106}. Установено е, че най-ефективната позиция при промивката е с глава, наведена напред и надолу¹⁰⁷ (позиция на Moffit), като обаче експерименти с трупове са показали, че за сфеноидалния синус най-ефективна е позицията с глава нагоре (нос към небето)¹⁰⁸. При промивка с по-малък обем на физиологичен разтвор, включително при употреба на капки/спрейове, препоръчителна е позицията на главата на страни или латерална позиция¹⁰⁷.

2.2.5.1.6. Левкотриенови антагонисти

Левкотриеновите антагонисти включват медикаменти, които инхибират 5-липоксигеназната каскада (зилеутон) и такива, които осъществяват блокада на нивото на

цистеинил левкотриеновия тип 1 рецептор (монтелукаст, зафир-лукаст)²⁸. Предвид добрата им ефикасност при лечението на хронични заболявания на ГДП (алергичен ринит) и на ДДП (астма) теоретично се предполага известен ефект и при пациенти с ХРС. Няма обаче проучвания, изследващи ефекта на левкотриеновите антагонисти при CRSsNP⁷², а малкото такива, изследващи ефекта им при пациенти с CRSwNP са със субоптимален и незадоволителен дизайн⁷². Във връзка с това левкотриеновите антагонисти не се препоръчват при лечение на ХРС, независимо от неговия субтип. В допълнение към това дори при лечение на пациенти с ХРС, имащи и доказан АР, левкотриеновите антагонисти отново не са препоръчани като терапия на избор, предвид по-лошата им ефективност спрямо интраназалните стероиди¹⁰⁹.

2.2.5.1.7. Моноклонални антитела

Терапията с моноклонални тела е един от най-новите начини за лечение на ХРС с назална полипоза и е свързана с големи надежди за трайно консервативно повлияване на този тип патология и избягване на нуждата от оперативно лечение. Терапията с моноклонални тела бива два основни вида – анти-IgE антитела и анти-IL (анти-интерлевкинови) антитела

2.2.5.1.7.1. Анти-IgE антитела

Ключов момент в патофизиологията на CRSwNP е завишената локална продукция на IgE, която вероятно допринася за хроничното възпаление, като непрестанно води до активиране на мастоцитите¹¹⁰. Едно от по-разработените анти-IgE антитела е омализумаб, свързващ се селективно със свободно циркулиращи IgE антитела, което намалява експресията на IgE рецептори по мембраните на мастоцити, базофили и дендритни клетки, намалявайки активацията на последните¹¹¹. Има две по-съществени плацебо-контролирани рандомизирани клинични проучвания, в които е изследвана ефективността на омализумаб, рекомбинантно моноклонално антитяло, в лечението на ХРС^{111,112}. И в двете е установено, че омализумаб намалява симптоматиката спрямо плацебо лечението, което съответно води до повишени показатели за качество на живот, но има разминаване между двете по отношение на наличието на промяна в размера на полипите и КТ находката. Предвид обаче малката бройка на пациентите в двете проучвания (24 и 14), задоволителни и категорични изводи не могат да се направят и са нужни още проучвания с по-голям брой пациенти, за да може лечението с омализумаб да бъде рутинно препоръчвано за лечение на CRSwNP, а към момента това не е така⁷².

2.2.5.1.7.2. Анти-IL5 антитела

Интерлевкин-5 (IL5) е ключов интерлевкин за финалната диференциация на еозинофиците и удължава живота им в тъканите¹¹³. Установено е, че IL5 е повишен в тъканите на назални полипи^{114,115} и поради това се смята, че антитела срещу него биха помогнали за лечение на CRSwNP. Две от по-добре проучените антитела срещу интерлевкин-5 са меполизумаб (mepolizumab) и реслизумаб (reslizumab)⁷² като по-щателно проучени са ефектите на меполизумаб^{116,117}. Последните две цитирани проучвания показват обещаващи резултати на антитялото, включително подобряване на симптоматиката (ринорея, назална обструкция, обоняние), обективно намаляване на размера на назалните полипи и намаляване на процента на пациенти, нуждаещи се от оперативно лечение. Същевременно препаратът не е дал съществени странични ефекти и се е проявил като безопасен. Към момента, въпреки относително малкото количество данни, меполизумаб се препоръчва за лечение на CRSwNP при изпълнени критерии за лечение с антитела (EPOS2020)⁷².

2.2.5.1.7.3. Анти-IL4/IL13 антитела

IL4 и IL13 са мощни медиатори на Тип 2 имунна реакция с различни, но понякога и припокриващи се функции. Двата интерлевкина до голяма степен споделят един и същ рецептор и сигнален път като същевременно и двата участват в производството на IgE, активацията на еозинофиците и производството и секрецията на мукус от страна на лигавицата. Интерлевкин 4 е и от значение за диференциацията на Т-клетките към T2 подтипа. Дупилумаб (dupilumab) е анти-IL4/IL13 антитяло с добре проучено действие и подкожно приложение. Няколко по-големи рандомизирани плацебо-контролирани проучвания са изследвали ефективността на лечението с дупилумаб при пациенти с CRSwNP¹¹⁸⁻¹²⁰. Установено е съществено подобрение в субективни (сила на симптоми, оценка за качество на живот) и обективни (размер на полипи, ендоскопска находка, КТ находка) параметри на пациентите с ХРС с назална полипоза на лечение с препарата, спрямо тези на плацебо-терапия. Във връзка с това и с добрия профил на безопасност на дупилумаб, препаратът е препоръчан за лечение на ХРС с назална полипоза (EPOS2020)⁷² при изпълнени критерии за лечение с моноклонални антитела¹²¹.

2.2.5.1.8. Инхибитори на протонната помпа и средства за борба с рефлуксната болест

Във връзка с написаното в точка 2.2.2.2. за евентуалната връзка на ХРС с ГЕРБ са провеждани много проучвания, целящи да се установи дали лечение на ГЕРБ би довело до подобрение на симптомите на ХРС. Най-често ползваните препарати за целта, а именно – инхибиторите на протонната помпа или PPI (proton pump inhibitors), също са били подлагани на такива изследвания^{122,123}, но към момента консенсусът, включително на EPOS2020 е, че проучванията по въпроса са недостатъчни и рутинно приложение на PPI при пациенти с ХРС не се препоръчва⁷⁸.

2.2.5.1.9. Други

Проучени са множество други терапевтични методи при пациентите с ХРС, но нито един от тях не показва достатъчно надеждни или достатъчно съществени резултати. Броят проучвания върху ефективността им също не е достатъчно голям, та да бъдат рутинно препоръчвани⁷². Сред проучваните лекарства са муко-активни вещества (експекторанти, мукорегулатори, муколитици), пробиотици (перорални и интраназални), билкови препарати, традиционна китайска медицина и акупунктура, локален фуроземид, перорален верапамил, капсаицин, бактериални лизати, хомеопатия, фототерапия и т.н. В процес на разработка и тестване са множество нови терапии⁷², като различни моноклонални антитела, бифазни антитела, бактериофаги и антибиофилм препарати и т.н.

2.2.5.2. Оперативно лечение

2.2.5.2.1. Исторически преглед и развитие на оперативните техники

Познанията за синусите и за лечението им са се развивали през хилядолетията ръка за ръка с общото ниво на медицината в съответния период и съответното място и цивилизация. Едни от най-ранните данни и описания, касаещи синусите, датират от около 1500 години преди новата ера и са от Египет. Отнасяли са се конкретно до техники за мумификация²⁷. Възможно е обаче познанията на древните египтяни да са достигали и до много по-назад в миналото, тъй като Херодот говори за египетския лекар Секхет Енахах, живял през 3500 г. пр.н.е., като го нарича „лекар на носа“. През вековете за болести на носа и синусите, вкл. за полипи, говорят множество лекари, вкл. от Древна Гърция (Хипократ), Рим (Гален), Индия, лекари и учени от арабския свят (10 век от новата ера), Ренесанса (Леонардо да Винчи, Джовани Инграсия)²⁷ и т.н. С нарастване на човешкото познание към 18. век и оставянето на енциклопедизма в миналото, данните за болестите на носа и синусите и съответно развитието на оперативните техники започват да напредват с по-голям темп. Молинети (Molinetti) описва достъп до максиларния синус през предната му стена през 1675 г.¹²⁴. Учудващо рано започват и опитите и наблюденията върху достъпа до максиларния синус през средния носов ход и естествения му отвор (Allouel, Jourdain, Zuckerkandl, Hayek, Onodi, Ostrom)¹²⁴, но поради относително по-голямата трудност за безопасното му достигане (орбитални усложнения, кървене) методът не става универсално използван. Достъпът до максиларния синус през долния носов ход се свързва с имената на Gooch (1770), Lichtwitz, Krause, Mickulicz, като на последния дължим техниката с пункция, троакар и промивка на синуса през долния носов ход, която има и диагностична освен терапевтична стойност¹²⁴. В свой обстоен труд¹²⁵ той описва историческото развитие на синусхирургията към момента (1887), включително предимствата и недостатъците на всеки подход. Оценява, че достъп през среден носов ход е невинаги възможен и препоръчва такъв през долен носов ход поради по-лесния достъп и възможността за повторно

разширяване на създадения отвор и превенция на затварянето му. Огромна стъпка е изобретяването и въвеждането на операцията на максиларния синус, включваща трепанация на предната му стена и същевременно осъществяване на долномеатална антростомия – процедурата е описана и въведена независимо един от друг от George W. Caldwell (1893), който я популяризира в САЩ, и от Henri Luc (1897) във Франция (като малкоизвестен факт е, че има и трети независим откривател, който не става широко известен – британецът Scanes Spicer)^{27,124}. Описаната операция и до ден-днешен носи името на откривателите си – трепанация/операция по Caldwell-Luc, като в първите години на 20. век тя бива развита с различни вариации. Denker например през 1905 г. осъществява и описва още по-радикален подход, включващ резекция на crista pyriformis²⁷ и сваляне на цялата медиална стена на максиларния синус. Sturmman и Canfield (1910 и 1911 съответно) осъществяват същата интервенция, но с трансназален достъп²⁷.

Операциите върху етмоидалните синуси и развитието на техниките за това също датират основно от края на 19. и началото на 20. век. Те се свързват с имената на Riberi, Schaeffer, Killian, Gruenwald, Hajek, Mosher, Hoffmann, Paterson, Jansen и други²⁷. Осъществени и описани са различни подходи, вкл. ендоназален, трансорбитален, екстраназален и трансмаксиларен.

Еволюция претърпяват и разбиранията и техниките за достъп до фронталния синус – ендоназален достъп до него осъществяват Jurasz (1883) и Killian (1894, 1900) като последният открива и естествения отвор на канала и го разширява²⁷. Техниката доразвиват Ingals и Halle (1905 и 1906 съответно). Ogston (1884) се счита за изобретател на екстраназалния достъп до фронталния синус като трепанира предната му стена²⁷. Техниката има своето развитие чрез работата на Kuhnt (1895), Riedel (1898), Killian (1892) и Ritter (1894), Czernyl (1895), Golowin (1897), Hajek (1908) и други²⁷. Две от най-често използваните трепанации, които се използват периодично и до настоящия момент, са трепанацията по Jansen-Ritter, която има и модификации, включващи и комбинация с интраназален ендоскопски достъп¹²⁶, както и трепанацията по Kuhnt-Riedel (често наричана „процедура на Riedel“ в англоезичната литература), която се ползва селективно за пациенти с остеомиелит или невъзможност за задоволителен ендоскопски достъп¹²⁶.

Техниките за достъп до сфеноидалния синус се развиват отново в периода 19.-20. век чрез въвеждане на ендоназален (Hajek 1899, Schaeffer 1885), трансептален, трансмаксиларен (Jansen 1897), екстраназален, трансетмоидален (Killian 1900), трансорален и транскраниален достъп²⁷.

2.2.5.2.2. Ендоскопска синус хирургия

Въпреки по-ранни опити на Hirschman за скопия през алвеолата на 3-ти зъб с цистоскоп през 1901 г.²⁸, истинската революция, довела в следствие до изобретяването и прилагането на съвременната ендоскопска техника, идва с изобретяването от Hopkins на нов вид оптика с телескопия и пренос на светлина, която има предимството и да е „сту-

дена“, т.е. да не затопля оглежданите тъкани^{27,28}. Първите опити за употреба на новите ендоскопи в контекста на ендоназална синус хирургия прави Messerklinger, който публикува своите наблюдения през 1978 г.¹²⁷. В тях той набляга на ролята на остио-меаталния комплекс в патофизиологията на риносинуита и насочва вниманието при хирургично лечение към него²⁸. Ключови за разпространението на техниката пък са ученикът на Messerklinger – Stammberger, който разпространява техниката извън Германия и Австрия и Kennedy, който я въвежда в САЩ през 1985 г.¹²⁸. С по-широкото разпространение на ендоскопите и с нарастващия опит по света първичната синус хирургия вече почти универсално е ендоскопската²⁸. Външните достъпи вече имат значително по-ограничена роля и най-често се ползват за лечение на невъзпалителни болести на синусите²⁸. В допълнение самото разбиране за хирургия при синусит вече се променя с напредване на методите на медицината, базирана на доказателствата и е универсално прието, че към хирургия, вкл. ендоскопска, се преминава при неуспех на медикаментозната терапия.

Съвременната ендоскопска синус хирургия се обуславя от принципа си, а именно, че е функционална. Основният принцип на функционалната ендоназална синус хирургия (ФЕСХ) е да възстанови функцията на параназалните синуси, като възстанови физиологичните модели на вентилация и мукоцилиарен клирънс. Целта ѝ е да премахне необратимо болестно променената лигавица и кост, максимално да запази здравите тъкани и да разшири естествените отвори на синусите^{28,129}. Особен акцент се поставя на остио-меаталния комплекс, тъй като дори минимално възпаление в него може да доведе до нарушение в дренажа и съответно до патология в максиларния синус, предните етмоидални клетки и фронталния синус. Акцент е и споменатото максимално запазване на здрава мукоза, което на практика се трансформира и в препоръката незасегнати синуси да не бъдат отваряни. През 1994 г. е въведена и техниката за минимално-инвазивна синус хирургия¹³⁰, имаща за цел и допълнителна стандартизация на ендоскопските операции. Допълнително в наши дни се употребява и техника за балон-дилатация на синусните отвори (балонна синусотомия)¹³⁰, която може да се използва самостоятелно или комбинирано като хибридна техника със стандартна ФЕСХ²⁸.

Понастоящем двете най-често използвани техники²⁸ при ФЕСХ са тази на Messerklinger¹²⁷ и тази на Wigand¹³¹. При първата от двете дисекцията е с посока отпред-назад като след визуализация се премахва processus uncinatus, за да се открие infundibulum. След това дисекцията продължава с отстраняване на bulla ethmoidalis, откриване на остиума на фронталния синус и идентификация на етмоидалния покрив. Оттам нататък дисекцията продължава в задна/дорзална посока с последователно премахване на оставащите предни етмоидални клетки, задните етмоидални клетки и накрая – отваряне на сфеноидалния синус²⁸. Следва идентификация на остиума на максиларния синус с 30-градусова оптика и неговото разширяване (ако то е нужно)²⁸. Техниката на Wigand се различава с това, че подходът е отзад-напред (дорзо-вентрален) при осъществяване на етмоидектомията. При тази техника се започва с частична резекция на средната конха, което отваря достъп към задните етмоидални клетки и след тяхната дисекция се отваря предната стена на сфеноидалния синус. След идентификацията на основата на

черепа в последния дисекцията се продължава във вентрална посока. Предимство при този метод е ранната идентификация на черепната база²⁸. В практиката обикновено се ползва комбинация от техниките на Messerklinger и Wigand. Особено често се ползва и препоръчва²⁸ следната последователност: визуализация на среден носов ход, медиализация на средна конха, унцинаектомия, максиларна антростомия, предна етмоидектомия, задна етмоидектомия, сфеноидидална синустомия, завършване на етмоидектомията чрез дисекция на базата на черепа в задно-предна посока, фронтална синустомия, евентуални резекция (частична или цялостна) на средна носна конха²⁸. Ключова е непрестанната визуализация на оперираните структури с различни по градус оптични прибори – 0, 30, 45, 90 (Фигура 6) и т.н. Не може да не се спомене и ролята, която има непрекъснатото развитие на технологиите – постепенно широко в практиката навлизат допълнителни устройства, позволяващи прецизна интраоперативна локализация и ориентация на хирурга, като например 3D CT Intraoperative Localization¹³², компютърно-асистирана FESS¹³³, уреди, позволяващи по-лесна обработка на тъканите и т.н.



Фигура 6. Функционална ендоскопска синус-хирургия, визуализация на оперативното поле, Клиника по УНГ болести, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“

2.2.5.2.3. Аденоидектомия

Във връзка със споменатата по-голяма роля на аденоидната вегетация в патогенезата на хроничния риносинусит при децата (2.2.1.) и честата ѝ колонизация с бактериален биофилм, служещ като резервоар за реинфекция на носните кухини (по-подробно описано в 2.3.2.), аденоидектомията се е наложила като първа линия на хирургично лечение при детски ХРС^{44,72,134,135}. Любопитно е, че проучванията, провеждани по въпроса, не откриват съществена връзка между развитието на ХРС и обема на сливицата^{136,137} и съответно размерът на аденоидеата не е индикация или контраиндикация за оперативната намеса. Аденоидектомията има осезаем и видим ефект при менажирането на детския ХРС, като е докладвано подобряване на симптомите при 69,3% от пациентите¹³⁸ и 88% - подобрене на качеството на живот¹³⁹. Ендоскопската синус хирургия също има място в лечението на ХРС в детска възраст, но повече като втора линия на лечение след недостатъчен ефект от аденоидектомия^{72,135}.

2.3. Бактериални биофилми

2.3.1. Същност, свойства и участие в хронични възпалителни процеси

2.3.1.1. Същност

Бактериалният биофилм се дефинира като прикрепена към повърхност съвкупност от бактериални клетки, обвити в произведен от тях екстрацелуларен матрикс^{140,141}. Биофилмът е различен тип поведение или „начин на живот“ за бактериалните клетки в сравнение с това, което считаме за нормална или планктонна форма. Смята се, че е и много по-чест и е всъщност основният *modus vivendi* за бактериите¹⁴⁰, както и че е тяхна основна стратегия за преживяване и персистирание в различните среди – в природата, индустриалната сфера и в многоклетъчния организъм¹⁴²⁻¹⁴⁵. Същевременно е важно да се подчертае, че биофилмът е много повече от сбора на клетките си и характеристиките му свойства са ключови за хронифициране на причиняваните от биофилми инфекции¹⁴¹.

2.3.1.2. Роля на биофилмите в хроничните инфекции

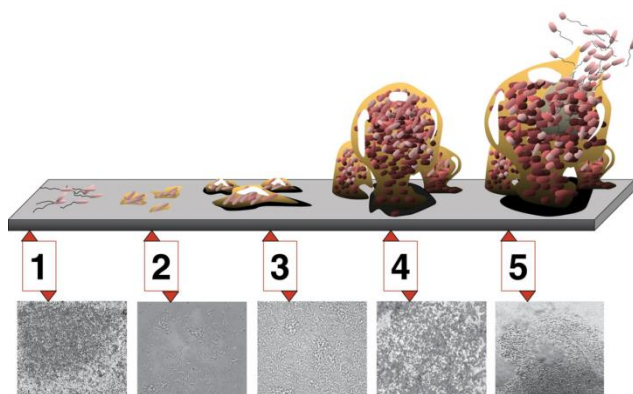
Биофилмите са основен причинител на инфекции при хората¹⁴⁶, включително на вътрешболнични такива, поради способността им да колонизират медицински изделия (абонкати, катетри, импланти и т.н.). Около 95% от инфекциите на уринарния тракт са свързани с уретрален катетър, 80% от пневмониите са асоциирани с механична вентилация и 87% от кръвните инфекции могат да се отдадат на вътресъдови изделия¹⁴⁰. В

частност това се дължи на много лесното образуване на биофилм по синтетичните повърхности на въпросните изделия¹⁴⁷.

Хронични инфекции, които се свързват с биофилм-модел на инфекция, са още периодонтит, пневмония на фона на кистична фиброза (муковисцидоза), хроничен среден отит, хроничен риносинусит и хронични раневи инфекции^{8,140,148}. Противно на острите инфекции, повечето от които са причинени от планктонната (planktonic, free-floating) форма, при хроничните такива тя се открива само транзиентно и в малки количества. Като следствие – тъй като хроничните инфекции са фундаментално различни от острите, са нужни различни стратегии за лечение. Фактът, че бактериалните биофилми осигуряват „защитен“ растеж на клетката, който позволява тя да преживее в чуждия организъм, изправя медицината пред предизвикателство¹⁴⁹.

2.3.1.3. Превключване към биофилм – фази на формиране

Преминаването на бактериите от планктонна форма към биофилм не е мигновен и еднофазов процес, а е серия от стъпки, при които се осъществява и „координация“ между клетките. Също така биофилмите не са неструктурирани хомогенни струпвания от клетки и произведена от тях слузна среда, а сложни общности от прикрепени към повърхност клетки, обвити от полимерен матрикс, съдържащ константно отворени и проходими водни канали¹⁵⁰. Различават се 5 фази на формиране и узряване на бактериалния биофилм (Фигура 7).



Фигура 7. Биофилми, стадии на развитие, CNX OpenStax, 2016¹⁵¹

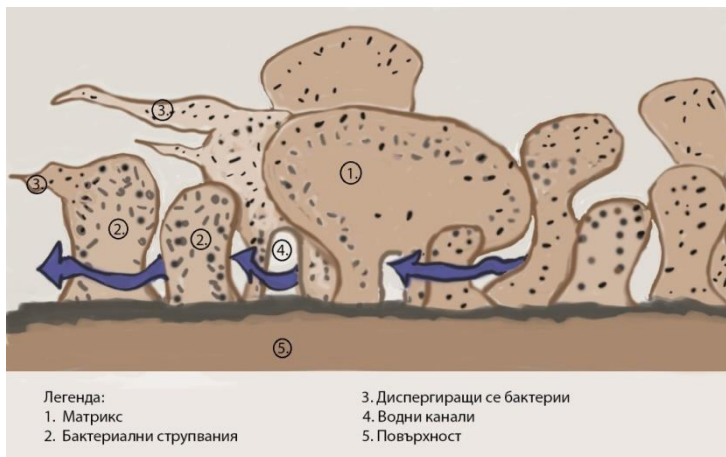
Фаза 1 – Фаза на „обратимо“ прикрепване. Първото изискване за формиране на биофилм е бактериите да се прикрепят към повърхност. „Подходяща“ повърхност обикновено е тази, по която има наличие на нутриенти – органични молекули или минерали, или е съставена от големи макромолекули (например гликопротеините муцини в мукуса на дихателните пътища²¹), които посредстват адхезия. Връзките между бактериите и повърхността в тази фаза обикновено са все още слаби (Ван дер Ваалсови) и обратими. Това е и фазата, в която образуването на биофилм най-лесно може да се предотврати¹⁴⁹.

Фаза 2 – Фаза на „необратимо“ прикрепване: бактериални структури като флагели, фимбрии, липополизахариди и екзополизахариди участват в необратимото прикрепване с ковалентни, йонни, водородни и хидрофобни връзки.

Фаза 3 – Фаза на ранна матурация: започва активно производство на матрикс, иницира се начално натрупване на биомаса и начална дивергенция във фенотипа (т.е. в „поведението“) на клетките от различните зони във филма.

Фаза 4 – Късна матурация – наличен е оформен биофилм с всичките му класически характеристики (Фигура 8) – „кули“, „гъбни структури“, водни канали, през които се осъществява дифузия на хранителни вещества и сигнални молекули и наличие на различни като фенотип и белтъчна продукция клетки.

Фаза 5 – Фаза на дисперсия – единични клетки или групи от клетки се откъсват от зрелия биофилм, колонизират се нови места. Фазата се достига при добри условия на средата^{140,146,152}.



Фигура 8. Зрял биофилм; Автор: арх. Росица Попова

Зрелият биофилм има особености и свойства, напълно различни от тези на планктонната форма. Най-значимите са механизмът на „разпознаване на кворум“ (quorum sensing), свойствата на матрикса, толерантността към антибиотични средства (отделно от механизмите на резистентност) и различните фенотипове и генотипове на клетките в рамките на биофилма.

2.3.1.4. Quorum sensing механизъм и комуникация между клетките

В началните фази на образуването на биофилма (фазите на прикрепване) бактериалните клетки все още имат белтъчната експресия на планктонната форма. Наблюдава се момент, в който се случва „превключване“ на експресията към биофилм-тип. Установено е, че това се дължи на тъй наречения quorum sensing механизъм. Той е следният: всяка бактериална клетка отделя в минимално количество сигнални молекули в

околната среда и същевременно бива достигана от сигнални молекули на други клетки. При достатъчно голям брой клетки броят сигнални молекули (автоиндусери) в междуклетъчната среда преминава определена гранична стойност, което се възприема като сигнал за достатъчна „плътност“ на колонията и бактериалните клетки превключват на белтъчна експресия, характерна за биофилм^{153,154}. При изследвания на биофилми на *Pseudomonas aeruginosa* например е установено, че само около 40% от експресираните белтъци са идентични с тези на планктонната форма¹⁵⁵.

Комуникацията между клетките в рамките на биофилма не се изчерпва само с механизма на quorum sensing. Установени са сигнални механизми (т.нар. „алармони“), чрез които клетки, изложени на неблагоприятни условия (физични, химични, антибиотични средства), могат да „предупредят“ останалите клетки от биофилма за опасността, при което последните да снижат метаболитната си активност като начин за намаляване на влиянието на новопоявилите се вреден фактор или да синтезират конкретен продукт (напр. рамнолипид), с който да понижат фагоцитиращата активност на клетките на имунитета^{140,149}.

2.3.1.5. Свойства на матрикса

Обемът на биофилмите е съставен от 80-85% екстрацелуларен матрикс и само около 15-20% клетки. Компонентите на матрикса са продукт на самите бактериални клетки и са хомо- и хетерополизахариди, протеини и извънклетъчно ДНК, често обобщавани като екстрацелуларна полимерна субстанция (extracellular polymeric substance - EPS). Инкапсулирайки клетките той съществено допринася за свойствата на биофилма. Матриксът физически предпазва клетките от вредните условия на средата, като вариации в температурата, осмоларитета (включително дехидратация) и възпрепятства свободната дифузия на вредни вещества – токсини, детергенти, антибактериални средства^{140,156,157}. Също така при *Pseudomonas aeruginosa* той може да свързва и обезврежда антибиотици с положителен заряд (напр. аминоклюкозиди), както и да предотвратява опсонизацията на клетките и тяхната фагоцитоза чрез съдържаните в него съединения (алгинат, рамнолипид)¹⁴⁰.

2.3.1.6. Резистентност и толерантност

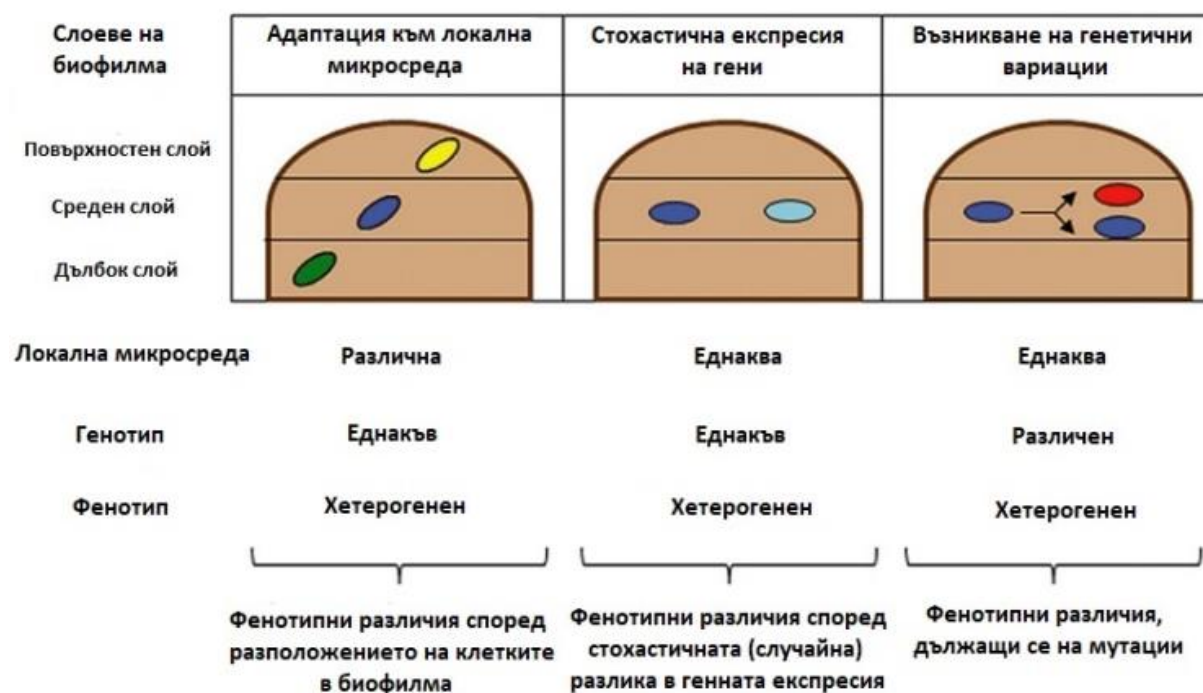
Клетките в бактериалните биофилми са 100 до 1000 пъти по-устойчиви на антибиотици от планктонните си форми¹⁵⁸. Това се дължи както на свойството „резистентност“, характерно и за планктонните форми, така и на специфичното свойство „толерантност“¹⁴⁰. Каква е разликата? Резистентността се дължи на метаболитни пътища и изменения (инактивация на гени, засилен синтез на конкретен белтък, efflux-помпи и т.н.), които правят бактериите „нечувствителни“ към антибактериалното средство и обикновено е „специфична“ към конкретно такова. Важна забележка е, че близостта на

бактериалните клетки в рамките на биофилма посредства и по-лесния пренос на резистентност чрез хоризонтален генен трансфер¹⁵⁷.

Толерантността е умението на бактериите в биофилма да „преживяват“ неблагоприятните условия. Толерантността е относително неспецифично свойство и се дължи на няколко фактора. На първо време роля има матриксът, намаляващ дифузията на вредни вещества и действащ срещу имунния отговор. Особено важно за толерантността е наличието на т.нар. *persistenter cells* или персистентни (спящи) клетки – обикновено клетки в по-дълбоките слоеве, при които метаболитната активност е практически нулева. Въпросните оцеляват след приложението на антибиотик (който убива по-горните слоеве клетки), след което повишават активността си и възстановяват биофилма^{140,146}.

2.3.1.7. Разлика във фенотипа и генотипа на бактериите в рамките на биофилма

Повечето бактериални биофилми в природата са полимикробни т.е. в състава им участват повече от един вид бактерии (най-разучените такива са биофилмите по зъбната плака^{146,159,160}). Особеност обаче е, че дори при едновидови биофилми има голяма фенотипна хетерогенност между отделните клетки.



Фигура 9. Процеси, водещи до вътрешовидова хетерогенност в рамките на едновидов микробен биофилм. Фенотипно различни субпопулации могат да възникнат поради индивидуалния отговор на всяка бактерия на локалната микросреда, поради стохастични разлики в генната експресия и поради генетични мутации; фигурата е адаптирана от фигура на Dufour D., Leung V., Lévesque C. M. – *Bacterial Biofilm: Structure, Function, and Antimicrobial Resistance*¹⁴⁰

Един от факторите, диктуващи тази хетерогенност, са различията в средата, на които всяка клетка е изложена. Различните концентрации на кислород, хранителни вещества, йони и т.н., различната им вариабилност (по-голяма в по-повърхностните слоеве) водят и до различия в експресията и метаболитната активност^{140,161}. Клетките в по-повърхностните слоеве обикновено консумират всички кислород и се развиват аеробно, докато по-дълбоките слоеве са анаеробни. Последните разчитат и на значително по-ниски концентрации на хранителни вещества, поради което обикновено най-дълбоките слоеве са съставени от „спящи“ или мъртви клетки. Друг механизъм на хетерогенност е стохастичната или случайна разлика в експресията на белтъци на отделните клетки. Появяващите се генетични мутации в част от бактериите добавят и още един източник на хетерогенност¹⁴⁰. Получилата се съвкупност от фено- и генотипна разлика между клетките (Фигура 9) значително повишава виталността на биофилма като цяло и в много по-голяма степен гарантира оцеляването му при различни промени в околната среда – при по-голяма вариабилност обикновено се намира клетка, която да успее да преживее при новите условия^{140,155,161,162}.

2.3.2. Бактериални биофилми като фактор за развитие на ХРС

На базата на много направени изследвания ХРС (с и без полипи) се свързва категорично с бактериални биофилми^{8,10–12,21,22,66,148,163–165}. Поради нуждата да се използва тъканна проба за необходимите образни изследвания, публикациите са предимно върху проучвания, при които пациентите са преминали ендоскопска ендоназална хирургия. Процентът на пациенти с ХРС, положителни на бактериален биофилм, варира при различните проучвания и спрямо използваната техника – 77% при FISH/CSLM¹⁰, 80% при SEM¹², 44% при CSLM¹⁴⁸, 90% при комбинирано изследване с FISH/CSLM и CSLM¹⁶⁵, при литературен обзор и сравнение на различни техники⁸ – между 25% и 92%.

Доказана е и конкретна положителна взаимовръзка между фактори, класически свързани с хроничен риносинусит, с наличието на бактериален биофилм, като тютюнопушене⁶⁶, свръхекспресия на муцини в мукуса на лигавицата^{21,22} и по-тежко клинично протичане на синусита¹⁶³, както и по-лоши следоперативни резултати след функционална ендоскопска синус-хирургия (ФЕСХ)^{11,164}.

Специфична конкретно за детската възраст е ролята на аденоидните вегетации, колонизирани от бактериален биофилм, които служат за резервоар за реинфекция на носните кухини и синусите^{43,72,134,166}. Докладвана е 91,5% позитивна предиктивна стойност на микробиология от отстранена трета сливица за предвиждане на бактериално присъствие в среден носов ход¹⁶⁷, като също е била установена съществена разлика в наличието на бактериален биофилм по повърхността на аденоидни вегетации, отстранени заради ХРС (95% честота) спрямо такива, отстранени заради обструктивна сънна апнея (2% честота на биофилм)¹⁶⁸. Във връзка с това отстраняването на аденоидната вегетация се е утвърдило като основен лечебен метод при детски хроничен риносинусит^{72,78,134,135} (по-обстойно разгледано в 2.2.5.2.3.).

2.4. Муцини

Друг фактор, който е възможно да играе ключова роля както за развитието на хроничен риносинусит сам по себе си, така и да има участие във фазата на прикрепване на бактериалния биофилм, са гликопротеините муцини, които се произвеждат в лигавицата на горния дихателен път и синусите^{21,22}. Реологичните качества на мукуса, покриващ дихателния път, се определят от муцините, като те играят и ключова роля за свързване на бактерии, подпомагайки по този начин мукоцилиарния клирънс за премахването им¹⁶⁹. Генерално има два типа муцини, произвеждани от лигавицата на дихателните пътища – мембрано-свързани (MUC1, 3A, 3B, 4, 11-13, 15-18 и 20) и секреторни (MUC2, 5AC, 5B, 6-10 и 19)^{16,169,170}. Въпреки важната функция, която муцините играят за нормалните физиологични процеси в дихателния път, тяхното свръхпроизводство се свързва с патология¹⁴⁻¹⁶, включително хроничен риносинусит^{17,18}. От различните видове муцини MUC5AC, основно произвеждан от чашковидните клетки¹⁷, и MUC5B, главно произвеждан от субмукозните жлези¹⁷, са най-изучаваните, както поради тяхното присъствие в здрава, но и в патологично засегната лигавица на дихателния път, така и поради разликите в експресията и производството им при болни и при здрави пациенти, като се установява, че патологично променена лигавица свръхпроизвежда муцини^{14,16,17}. От останалите секреторни муцини MUC2 основно се произвежда в гастроинтестиналния тракт и е изучаван предимно при патологии на последния^{19,171}. MUC6 също е предимно гастроинтестинален муцин¹⁹, като се смята, че има антибактериален ефект при инфекции с *H. pylori*^{172,173}. MUC7 и MUC8 са неполимерни муцини предимно експресирани от серозни секреторни клетки в субмукозните жлези в долните дихателни пътища¹⁹. Ролята им в ХРС е по-малко проучена, като темата е засегната в секция Дискусия.

В контекста на хроничния риносинусит е уместно по-подробно разглеждане конкретно на MUC5AC и MUC5B, включително поради значително по-големия брой публикации по темата¹⁹. *MUC5AC* и *MUC5B* (изписвано с наклон) са гените, кодиращи съответните муцини и е установено, че са разположени на 11-ата хромозома, в региона p15.5 заедно с още 2 полимерни секреторни муцина – *MUC2* и *MUC6*¹⁹. MUC5AC рутинно се използва като маркер за метаплазия на чашковидните клетки, като повишената му експресия се асоциира с хронични заболявания като муковисцидоза, ХОББ и астма¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. За MUC5B пък се смята, че има важна роля за мукоцилиарния клирънс и при физиологични условия е важен фактор за предотвратяване на инфекции на дихателните пътища¹⁷⁷.

2.5. Методи за изследване и оценка на CRS

2.5.1. Анамнеза и стандартизирани въпросници

Стар постулат в медицината е, че добре събраната анамнеза може да помогне изключително много в поставянето на диагнозата: „Qui bene interrogat, bene diagnoscit.“

Конкретно за патология на носните кухини и синусите въпросите следва да засягат наличието на затруднено носно дишане (ендостранно, двустранно, променящо се, денонощно или периодично и т.н.), наличие, характер и местоположение на болка, давност и трайност на болковите пристъпи, повлияват ли се от стандартни обезболяващи и т.н., наличие на затруднения или промени в обонянието, наличие на секреция (дренираща се напред, назад или и двете), наличие на кашлица или подкашляне, наличие на кихане, чувство за сърбеж в носа или в очите, зачервяване на очите и т.н.

Често се прилага използването на въпросници, които пациентите сами или с помощ на лекаря попълват. По този начин е възможно по-добро стандартизиране на тежестта на заболяването на пациентите, както и проследяването им и оценката на следоперативните резултати и степента на подобрение на оплакванията.

Често ползван въпросник е SNOT22 (Sino-nasal Outcome Test 22)⁸¹ или неговата разновидност SNOT20. SNOT22 съдържа 22 параметъра, които да бъдат количествено определени (Таблица 1).

1 Нужда да се издухва носа
2 Запушване на носа
3 Кихане
4 Секреция от носа
5 Кашлица
6 Стичане на секрет в гълтача
7 Гъст носен секрет
8 Заглъхване на ушите
9 Замайване
10 Болка в ушите
11 Тежест/болка в главата
12 Понижено обоняние/вкус
13 Трудно заспиване
14 Чести нощни събуждания
15 Лошо „наспиване“
16 Умора след сън

17 Умора
18 Намалена продуктивност
19 Намалена концентрация
20 Нервност
21 Тъга/минорно настроение
22 Чувство за срам

Таблица 1. Симптоми, оценявани с въпросника SNOT22

Всеки от гореизложените параметри се оценява от 0 до 5 (“0” означава липса на оплакване, а “5” е максимална сила на оплакването). Крайните резултати се сумират и сумата е индивидуалната оценка на пациента по SNOT22, като максималната оценка, означаваща максимална тежест на оплакванията, е 110.

Често използвани, но с по-малка специфичност, що се касае конкретно до оплакванията от синиут, са въпросниците за качество на живот, напр. EuroQoL Quality of Life Scale (EQ-5D)¹⁷⁸ и въпросниците за сила на различни симптоми (напр. болка), напр. Visual Analogue Scale (VAS)¹⁷⁹.

2.5.2. Физикални методи и ендоскопия

Класическите методи за изследване на носната кухина са предната риноскопия, осъществявана с източник на светлина и назален спекулум и индиректната задна риноскопия, осъществявана с източник на светлина, епифарингеално огледалце и шпатель. В последните десетилетия с развитието на технологиите в практиката широко навлязоха различни видове оптики – ригидни (включително с различен ъгъл на наблюдение) и флексибилни. Описаните методи, особено когато са комбинирани с предварителна деконгестия и анестезия на назалната лигавица, позволяват изключително обстоен оглед на назалните половини, както и оглед на или в близост до устията на синусите. Особено ключова за оглеждане зона е средният носов ход. Отбелязват се всякакви особености, които могат да имат отношение към патология, например девиация на септума, наличен шип (spina/шпора) на септума, осъществяващ комуникация с латералната стена, хипертрофия на конхи, наличие на полипи, наличие и вид на секрет, място, от което той изхожда, макроскопски вид и релеф на лигавицата и т.н.

Често използвани в практиката са различните системи за оценяване на състоянието на назалните половини при ендоскопия, като най-популярната е скалата на Лънд-Кенеди (Lund-Kennedy Score of Endoscopic Assessment)¹⁸⁰ (Таблица 2) или нейни модификации¹⁸¹.

Характеристики	Лява носна половина	Дясна носна половина
Полипи (0,1,2)
Оточност (0,1,2)
Секреция (0,1,2)

Таблица 2. Ендоскопска оценка на носните половици по Лънд-Кенеди; *Полип*: 0 – липсва, 1 – ограничен в среден носов ход, 2 - навлизащ в носната кухина; *Оточност*: 0 – липсва, 1 - умерена, 2 – полипоидна дегенерация; *Секреция*: 0 - липсва, 1 – серозна ; 2 – гъста/мукопуrolентна; максимална оценка – 12.

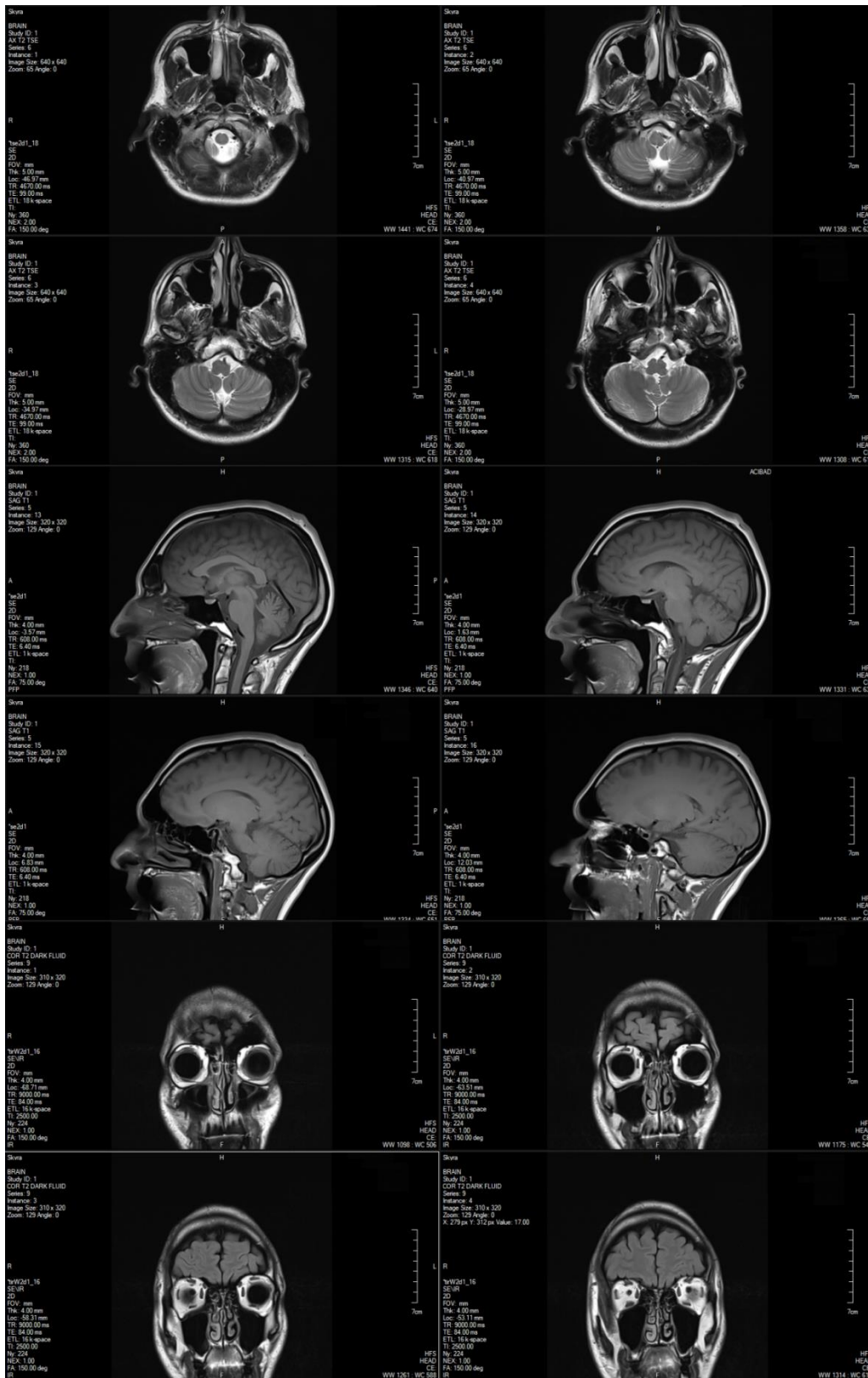
Класически физикални методи за изследване на синусите пък са перкусията и палпацията, но нивото на специфичност и сигурност на находката може широко да варира и поради това те имат ролята основно на допълнителен и допълващ метод. Към физикалните методи условно би могла да се причисли и диафаноскопията – осветяване на максиларните синуси; последната не се прилага рутинно поради по-ниска чувствителност спрямо други методи.

2.5.3. Образна диагностика

Класическите рентгенографски методи за оценка на синусите са рентгенографиите по Уотър (Water's view; Фигура 10) и по Калдуел (Caldwell's view). Техни предимства са тяхната скорост и достъпност, но информативността им често е слаба. Съвременните методи, които са вече широко разпространени, са компютърната томография и ЯМР (Фигура 11), които дават опцията за триизмерно наблюдение на структурите и много по-голяма разделителна способност, повишаваща точността на диагностиката.



Фигура 10 Рентгенография на околоносни кухини по Water



Фигура 11. ЯМР томография на синуси, представени са последователно аксиална, сагитална и коронална проекция;

За стандартизация и по-големи възможности за реоценка на пациентите са въведени различни скали за оценка, най-ползваната от които вероятно е скалата за оценяване по Лънд-Маккей (Lund-Mackay scale CT scan score; Таблица 3)¹⁸²

Характеристики	Лява носна половина	Дясна носна половина
Максиларен (0,1,2)
Предни етмоидални (0,1,2)
Задни етмоидални (0,1,2)
Сфеноидален (0,1,2)
Фронтални (0,1,2)
Остиомеатален комплекс (0,2)*

Таблица 3. Белези за оценка на гежестта на находката по скалата Lund-Mackay; 0 – без особености, 1 – частично засенчване, 2 – пълно засенчване *0 – без обструкция, 2 – с обструкция; максимална оценка – 24.

Други методи на образна диагностика са ултразвуковото изследване на синусите, което обаче не се прилага рутинно поради по-ниска диагностична стойност в сравнение с описаните вече образно-диагностични методи.

2.6. Методи за определяне на бактериално присъствие

2.6.1. Стандартно културелно изследване на секрет

Допълнителна информация, ориентираща лечебния подход, може да се получи при микробиологично изследване на носен секрет. Изолирането на бактерии ни посочва най-вероятния причинител и позволява насочено антибиотично лечение, съобразно с антибиограма. По-висока чувствителност и специфичност на метода може да се постигне при взимане на секрет конкретно от среден носов ход при съмнение за синусит, засягащ фронтални или максиларни синуси или предни етмоидални клетки¹⁸³.

2.6.2. Установяване на ендотоксин

Един от начините за доказване на бактериално присъствие е индиректен – чрез доказване на техен продукт, а именно - на бактериален ендотоксин. Такъв метод е бил утилизирани например при изследвания на пациенти със среден отит в търсене на бактериално присъствие¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. В едно такова проучване¹⁸⁵ се установява наличие на ендотоксин в секрет от средното ухо със серозен отит в 80% от пробите, като при култивиране на същия секрет бактерии се установяват само в 47% от случаите.

2.6.3. Генетични методи – полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR)

Метод за доказване на бактериално присъствие без да се доказва стриктно биофилм структура е полимеразната верижна реакция или PCR. Като метод тя е по-чувствителна от културелния метод и феноменът негативно културелно изследване и същевременно данни за наличие на жизнеспособни бактерии е описан при ортопедични протези^{187,188}, ендокардит (хемокултури)¹⁸⁸, хроничен серозен отит (otitis media with effusion)¹⁸⁹ и други.

2.6.4. Доказване на бактериална биофилм структура

Една от причините за относително късното откриване на бактериалните биофилми като фактор за хроничните инфекции е трудното им установяване и доказване чрез класическото култивиране в среда и нуждата от микроскопски методи - конфокална сканираща лазерна микроскопия (confocal scanning laser microscopy - CSLM) или електронна микроскопия за доказване на биофилм структура. Употребата на полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR) не може да бъде причислена към методите за доказване на биофилм, тъй като въпреки че може да докаже присъствие на бактерии в негативни култури, методът не разкрива биофилм структура, т.е. не доказва конкретно биофилм.

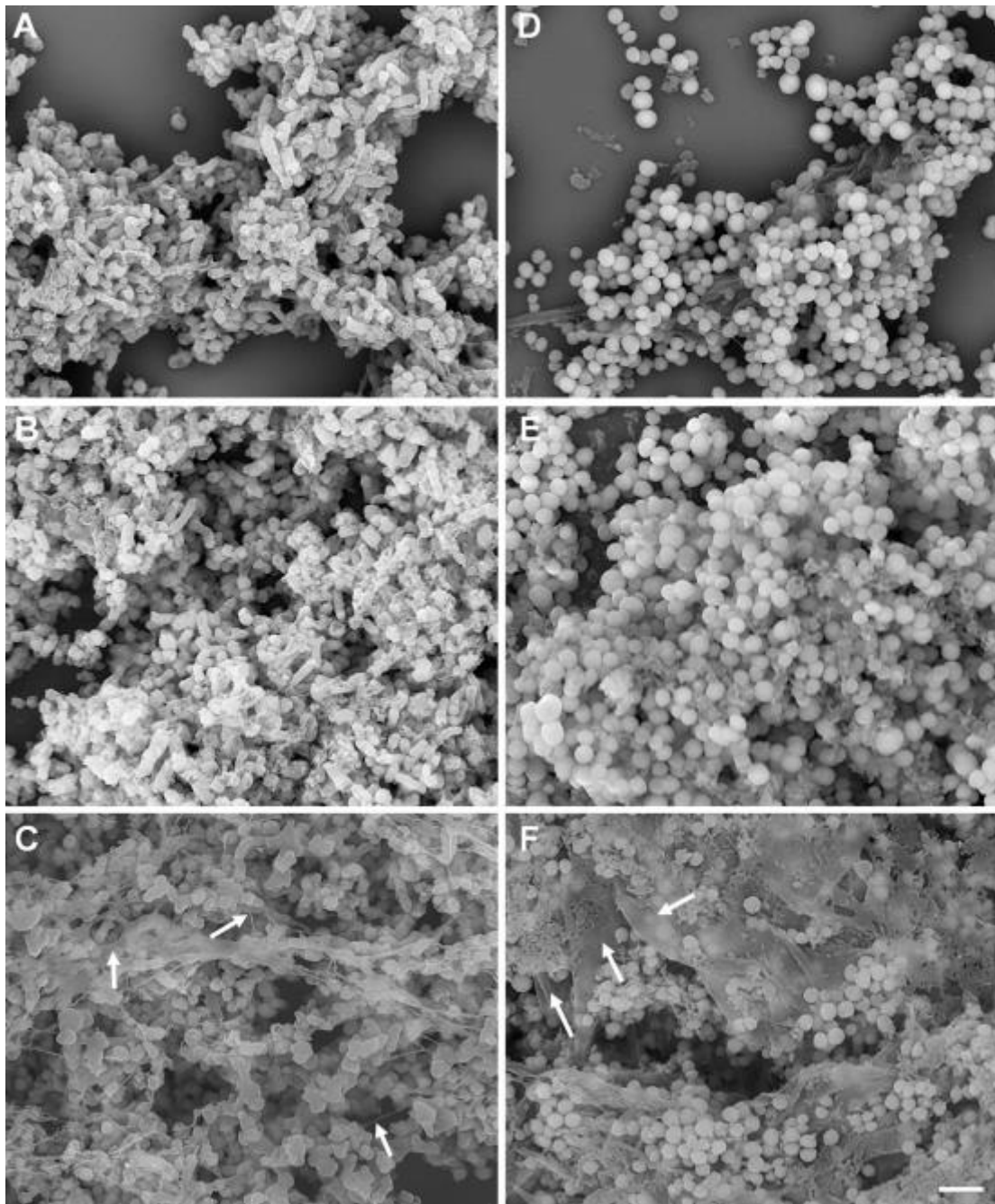
2.6.4.1. Сканираща електронна микроскопия (SEM, Scanning electron microscope, SEM)

Сканиращият електронен микроскоп е вид електронен микроскоп, който създава образи на повърхността на изследвана проба, като я сканира с насочен и фокусиран сноп от електрони¹⁹⁰. Електроните взаимодействат с атомите на пробата и по този начин се образуват разнообразни сигнали, които съдържат информация за топографията на повърхността на пробата, а също така и за състава ѝ. При най-честия вид сканиращ електронен микроскоп вторични електрони, излъчвани от атоми на пробата, които са били възбудени от електронния сноп, биват детектирани чрез детектор за вторични електрони (Everhart-Thomley detector)¹⁹⁰. Броят на вторичните електрони, които могат

да бъдат засечени и следователно интензитета на сигнала, зависи, наред с други неща, от топографията на повърхността на пробата. Някои СЕМ могат да постигнат резолюция и разделителна способност по-висока и от 1 нанометър¹⁹⁰.

В медицината СЕМ намира приложение за наблюдение на клетки и тъкани на тялото, както в норма¹⁹¹, така и при патология¹⁹². В допълнение СЕМ е един от най-често използваните методи за установяване на биофилм структура при хронични заболявания^{186,193-198}, включително изключително често използван метод за установяване на биофилми при проби от пациенти с ХРС^{11,12,21,199,200}.

Една от особеностите на СЕМ е нуждата от специфична подготовка на пробите преди да бъдат наблюдавани. Подготовката включва фиксация (глутаралдехид, осмиев тетроксид), дехидратация, импрегнация с продукти, съдържащи сребро и злато¹¹. Недостатъци на техниката в сравнение с други методи е, че се изследва само повърхността на пробата, че площта, която може да бъде изследвана, е ограничена поради голямото увеличение, нуждата от специфична обработка на пробата преди да бъде наблюдавана, както и известната трудност да се различат бактериите от компоненти на мукусния слой⁸. Предимствата на метода са възможността за изключително голямо увеличение и разделителна способност и високото качество на получените образи (Фигура 12). Като критерии за биофилм се счита установяването на окръглени структури с размер 0,5-2 микрометра, намиращи се върху епителния слой и образуващи характерни структури (кули, водни канали), както и ерозия на околния епител^{11,12,21}.



Фигура 12. Сканираща електронна микроскопия на бактериален биофилм. Биофилми, растящи на стъклена повърхност, фиксирани за 48 часа с 10% формалин (А и D), 2,5% глутаралдехид (В и E) и Метакарн (С и F) и впоследствие допълнително обработени за изследване със СЕМ. Слоеви от EPS (екстрацелуларна полимерна субстанция) на повърхността, средата и в долната част на биофилма (С и F) са показани с бели стрелки; (Bar = 4 μm ; 5,000 magnification); Фигурата е част от статията „Identification of a reliable fixative solution to preserve the complex architecture of bacterial biofilms for scanning electron microscopy evaluation“ на Dassanayake и съавтори²⁰¹.

2.6.4.2. Трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ, transmission electron microscopy, ТЕМ)

Трансмисионната електронна микроскопия е метод, при който сноп от електрони се насочва и преминава през дадена проба, при което се формира образ. Пробата обикновено е свръхтънка, със секция по-малка от 100 нанометра. Образът се формира от взаимодействията на електроните с атомите на пробата при преминаването на електронния сноп през нея. Образът впоследствие се увеличава и се фокусира върху устройство или повърхност, като например флуоресцентен екран, слой на фотографен филм или сензор като сцинтилатор²⁰². Методът се използва за доказване на бактериална биофилм структура¹⁵⁶, вкл. при пациенти с риносинуит^{12,203}, но най-често пред него биват предпочетени СЕМ или конфокална микроскопия. Предимство на метода е възможността за добиване на кроссекционни образи, но голям и основен недостатък е нуждата от свръхтънка проба⁸.

2.6.4.3. Конфокална микроскопия

Конфокалната микроскопия е техника за получаване на образи, даваща възможност за увеличаване на оптичката разделителна способност и контраста на микрограф²⁰⁴ (микрограф – снимка или дигитален образ на обект, направен чрез микроскопия, който съдържа фини детайли на наблюдаваната структура²⁰⁵). Това се постига чрез употребата на пространствен филтър във вид на отвор (spatial pinhole), който блокира или филтрира нефокусираната светлина при формирането на образа. За разлика от стандартния светлинен микроскоп, при който светлината преминава през пробата, при конфокалната микроскопия по-малък и концентриран светлинен сноп се фокусира върху конкретно поле и на конкретна дълбочина във всеки даден момент, като впоследствие полето и дълбочината могат да бъдат сменени и цялата проба постепенно да бъде „огледана“²⁰⁴. Заснемането на множество двуизмерни снимки от различна дълбочина на изследвания обект позволява реконструкция на триизмерна структура (оптическо секционирание) на обекта или пробата.

Техниката намира широко приложение в науката и индустрията и по-конкретно в биологията и медицината, при проверка и тестване на полупроводници и различни материали²⁰⁴.

Конфокалната микроскопия има няколко разновидности, от които най-често използваните са конфокалната сканираща лазерна микроскопия (confocal scanning laser microscopy, CSLM) и конфокалната микроскопия с въртящи се дискове (spinning disk confocal microscopy, SDCM).

2.6.4.3.1. CSLM

При конфокалната сканираща лазерна микроскопия се използват няколко огледала (обикновено 2 или 3, които сканират линейно по X- и Y-осите), с които лазерът се насочва, за да „сканира“ пробата, след което образът се „десканира“ от фиксиран филтър-отвор (pinhole) и детектор. Този процес обикновено е бавен и не е подходящ за изследване на проби „на живо“, но е надежден за създаване на представителни снимки и образи с висока резолюция на фиксирани проби²⁰⁴.

2.6.4.3.2. SDCM

Конфокалната микроскопия с въртящи се дискове (Nipkow диск) използва серия от подвижни филтриращи отвори (pinholes), разположени върху диск, за да сканира определени осветлени места от пробата. Тъй като поредица от филтриращи отвори сканира паралелно дадена област, всеки от тях може да се задържи над конкретна зона за по-дълго време, отколкото при CSLM, при което се намалява енергията за възбуждане и екситация, която е нужна за осветяване на пробата. Намалената възбуждаща енергия намалява фототоксичността и „избеляването“ на образите от пробата, което прави техниката предпочитана при наблюдение на живи клетки или организми²⁰⁴. В допълнение описаното паралелно сканиране прави скоростта на изследване на цялата проба пропорционална на броя филтриращи отвори, които са налични. В резултат SDCM има 100 до 1000 пъти по-голяма скорост на изследване на проба²⁰⁶ или на единица площ/обем от проба в сравнение с CSLM, което пък от своя страна позволява изследването на по-големи като площ и обем проби да е реално възможно и практично.

2.7. Методи за изследване на протеини

2.7.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

При този вид аналитичен метод най-често се използва повърхност, към която са прикачени антитела, за да се установи наличие на лиганд (най-често протеин) в течна проба; прикачените към твърдата повърхност антитела са със специфичност към протеина (антиген), който се търси²⁰⁷. Впоследствие към средата се добавят и детекционни антитела, свързани с ензим, водещ до появата на оцветяване, или свързани с флуорофор. ELISA е чест диагностичен инструмент в медицината, в ботаническата патология, в биотехнологията, както и като инструмент за контрол на качеството в различни индустрии²⁰⁷.

Методът има няколко разновидности – директна ELISA, индиректна ELISA, сандвич-ELISA и конкурентна ELISA, като при тях има различни комбинации от антитела и ред на взаимодействие, но при всички се разчита на основния принцип на специфичното взаимодействие антиген-антитяло²⁰⁸.

В медицината ELISA намира широко приложение, например за детектиране на тумори²⁰⁹, но и за откриване и околичествяване на нормални протеини, чието количество се променя при патология, вкл. на муцини^{210,211}.

2.7.2. Имунохистохимия (ИХХ, Immunohistochemistry, ИНС)

Имунохистохимията е метод, при който селективно се идентифицира определен антиген (протеин) в клетки от тъканна проба, като към него се свързва специфично антитяло. Въпросното антитяло е натоварено или с ензим, способен след реакция да предизвика оцветяване, което да визуализира резултата (хромогенна имунохистохимия), или с флуорофорна частица, чрез която да се осъществи визуализацията (имунофлуоресценция). Често въпросната частица (ензим или флуорофор) е прикрепена към второ антитяло, което специфично се свързва с части на прикрепил се към търсения протеин антитела²¹². Имунохистохимията е често използван метод за изследване и откриване на туморна тъкан^{209,213}, както и за установяване на намаляване или увеличаване на количеството на определени нормално присъстващи в тъканите протеини при определени болести, вкл. за муцини^{15,214–218}.

2.7.3. Изследване на експресия на ген на протеин

Алтернативен и индиректен метод за доказване на протеин в проба, както и за определяне на количеството му, е чрез идентифициране, размножаване чрез PCR и околичествяване на информационната РНК, носеща информация за транслацията на информация от нуклеинова киселина в протеинова структура. Задължително условие е обаче предварителната информация за генната последователност, кодираща структурата на конкретния търсен протеин. Използването на полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR) има голямото предимство дори много малко налично количество от търсената нуклеинова киселина да може да бъде размножено и околичествено чрез броя цикли на реакцията, които са били нужни за достигане на определено количество нуклеинова киселина. Поради описаните свойства PCR е освен изключително специфичен, така и изключително чувствителен метод²¹⁹. По-подробно описание на методиката в рамките на нашето проучване е представено в точка 4.2.3.

3. Цели и задачи

3.1. 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. Стремежът 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 оптимална стратегия за лечебен подход и начин на проследяване на пациентите с хроничен риносинуит.

3.2. 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 метода, с който ще бъдат изследвани.
3. Пробите, предназначени за установяване на наличието на бактериален биофилм, да се изследват с конфокален сканиращ лазерен микроскоп 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 риносинуит с клинични, поведенчески или терапевтични фактори да се изгради план за наблюдение на пациентите, включващ новите данни и зависимости.

4. Материали и методи

4.1. 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 риносинуит (ХРС група, 71 пациенти), което бе предвидено да се извърши с ендоскопска техника или поради остронастъпила носна травма (контролна група, 14 пациенти). 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 при тях на хронична патология в областта на носа и синусите^{17,163,199,200,220} и на употребата на тъкани от пациенти с остра травматична патология като контроли при други проучвания с риносинуит^{17,199,220}. Такава контролна група е използвана, както при проучване, разглеждащо ролята и наличието на бактериалните биофилми при пациенти с ХРС¹⁹⁹, така и при такова, разглеждащо ролята на муцините при пациенти с ХРС¹⁷. Решението ни да не използваме като контроли пациенти, подложени на септопластика поради *deviatio septi nasi* (изкривена носна преграда), както е правено в други проучвания^{10,200,221}, 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 ХРС⁶⁹. В добавка към изброените аргументи има и данни, че при пациенти с изкривена носна преграда има променена флора в среден носов ход²²².

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^{10,21,55,72,223,224}. 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^{199,224}. От 85-имата пациенти 5-има (всички от групата с ХРС) отпаднаха поради лошо качество или недостатъчно количество на пробите. Съответно крайната бройка на пациентите, чиито резултати се отчитат и анализират в нашето проучване, беше 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.

4.2. Методи

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

4.2.2. Установяване на наличие на бактериален биофилм

4.2.2.1. Конфокална 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). След това препаратите се транспортираха до Лаборатория по геномна стабилност към Института по молекулярна биология към БАН, където се оцветяваха с помощта на кит LIVE/DEAD™ BacLight™ (Thermo Fisher Scientific, Cat# L7007) според инструкциите на производителя.

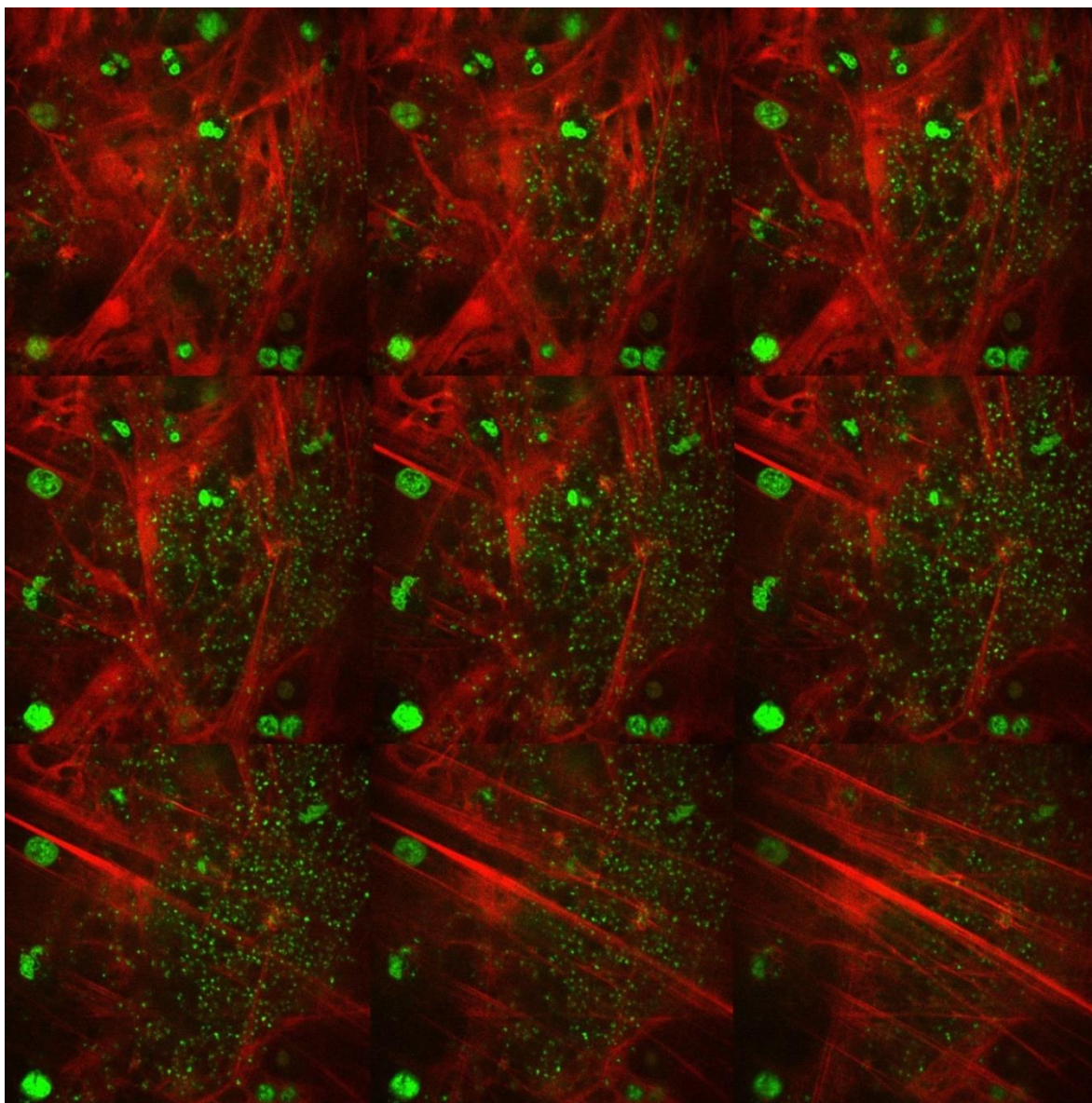
Накратко процесът е следният: пробите се промиват внимателно с фосфатен буфер с физиологична концентрация на натриев хлорид (Phosphate Buffer Saline, Merck, Cat# 524650) за премахване на останала от вземането на препарата кръв, след което се поставят в багрещия разтвор за 20 минути. Багрещият разтвор 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 стъкло дъно (MatTek, Cat# P35G-1.5-14-C), така че лигавицата да бъде разположена надолу към стъкленото дъно на петрито. Пробите се затискат отгоре с покривно микроскопско стъкълце, за да се притиснат към стъклото на петрито 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 13) 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 488 nm син лазер

с номинална енергия 30 mW, атенюирана до 20%, а за детектиране на червеното багрило пропидиев йодид беше използван 561 nm жълто-зелен лазер с номинална енергия 50 mW, атенюирана до 8.3%. В зависимост от качеството на оцветяване на пробите бяха използвани времена за експозиция в диапазона 50-200 ms за всеки заснет кадър. Детекцията на излъчения от пробите сигнал беше осъществена с високочувствителна EMCCD (Electron Multiplying Charge-Coupled Device) камера Andor iXon 897 (Andor, Oxford Instruments).

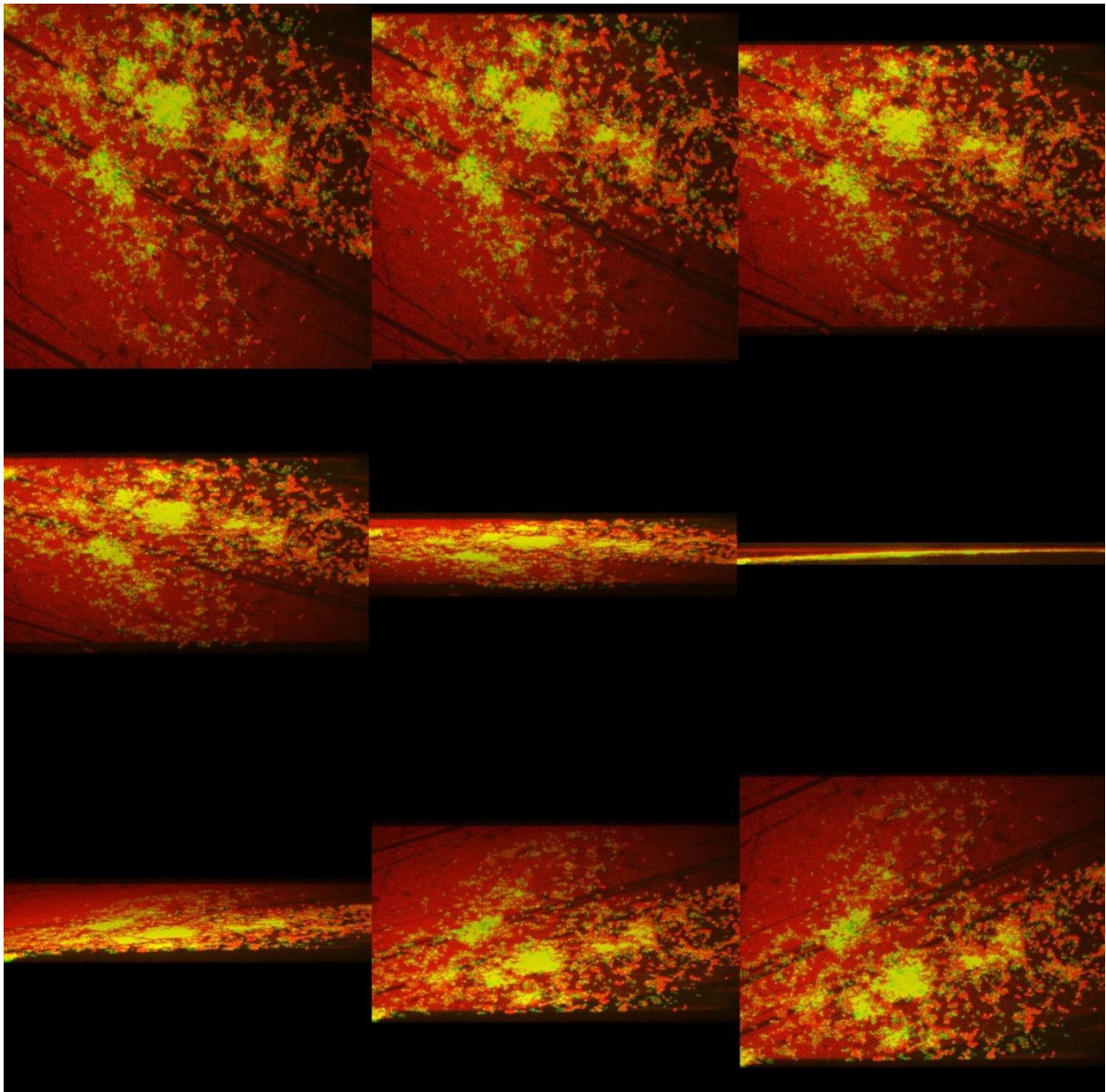


Фигура 13. Конфокален микроскоп с въртящи дискове, Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология към БАН

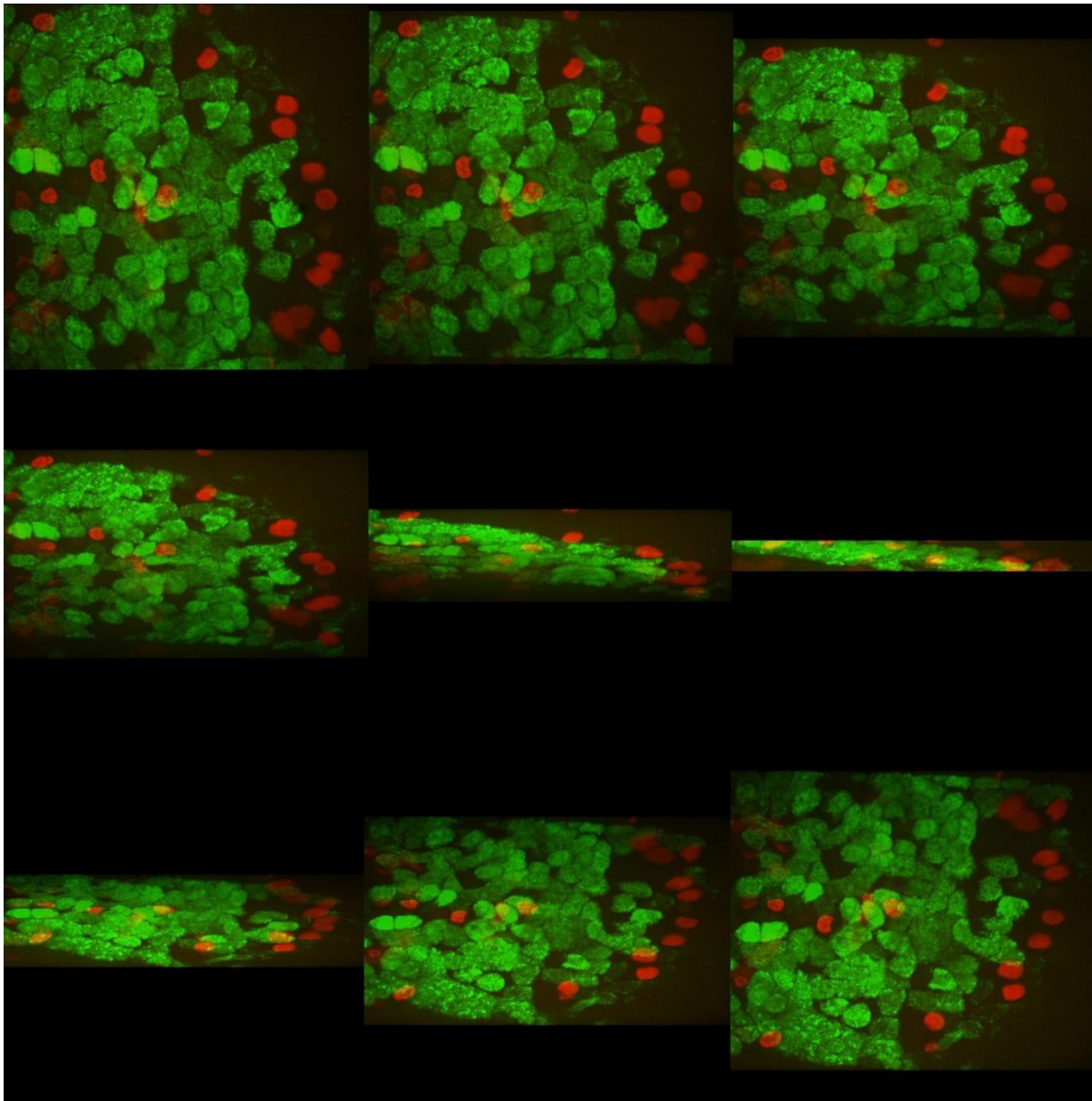
Всеки препарат беше подробно преглеждан и заснеман неколккратно, както в зеления, така и в червения канал, като всяко едно заснемане включваше генерирането на т.нар. Z-stack – поредица от равнини на заснемане през цялата дебелина на препарата (>40 отделни фокални равнини на разстояние 0.5 μm една от друга), което позволява да се заснеме епитела в цялата му дебелина както и намиращият се над него мукусен слой (Фигура 14). Общо се заснеха 642 подобни образа. Така заснетите препарати позволиха препаратите да се разгледат „триизмерно“ и да се ротират в различни равнини (Фигура 15, Фигура 16) и съответно позволиха да се направи точна и детайлна оценка както за наличието на биофилм, така и за състоянието на подлежащия епителен слой.



Фигура 14. Сканиране на препарат; Наслоени една след друга отделните изображения представляват един Z-stack



Фигура 15. Триизмерно изображение на бактериален биофилм, ротация по X-оста



Фиг. 16. Триизмерно изображение на здрава лигавица, ротация по X-оста

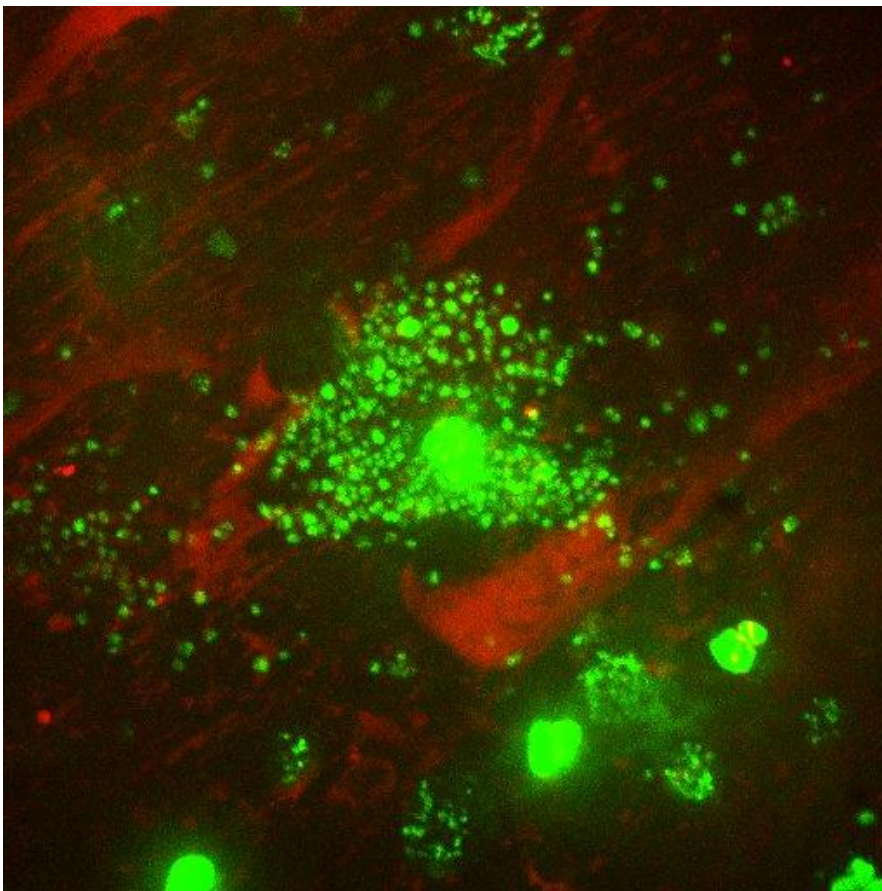
4.2.2.2. Критерии за наличие на биофилм

За коректно дефиниране и впоследствие – 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).

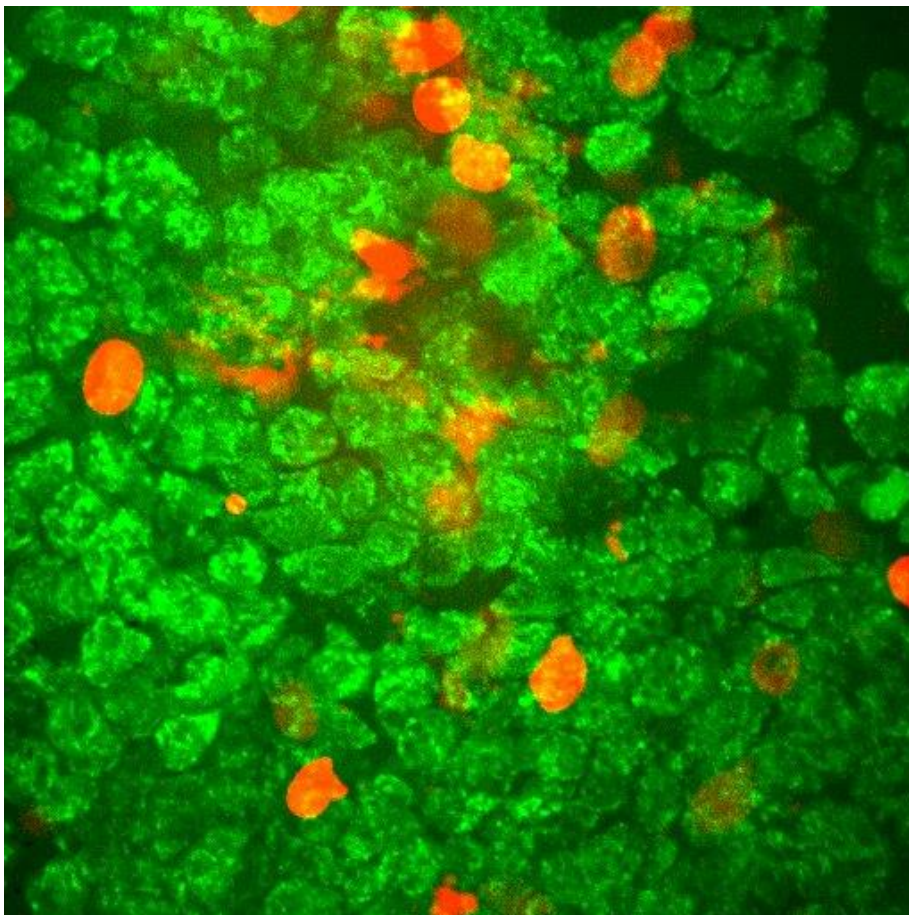
Критериите за наличие на биофилм бяха следните:

За бактериален биофилм се определяха струпвания на флуоресцентни елементи с размер, подобен на очаквания при бактерии ($0.5\text{--}3\ \mu\text{m}$)^{22,148,165} и приблизително

окръглена форма, подредени в характерна триизмерна структура. По-малко интензивен като сила на флуоресценция „ореол“^{10,165}, ограждащ такива силно флуоресциращи елементи, се приемаше, че се дължи на екзополисахаридния 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 и от двамата, че такова има (Фигура 17, Фигура 18).



Фигура 17. Бактериален биофилм



Фигура 18. Лигавица без следи от биофилм

4.2.3. Определяне на нивото на експресия на *MUC5AC* и *MUC5B*

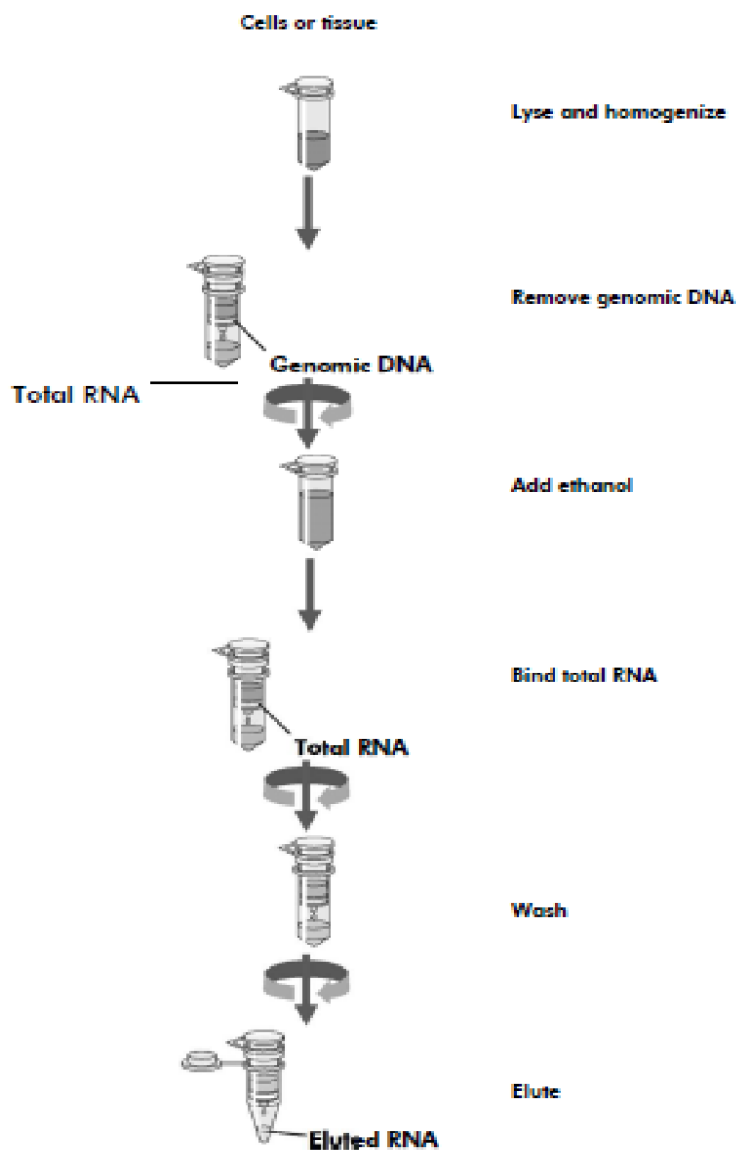
Незабавно след взимането им пробите, предназначени за установяване на експресията на *MUC5AC* и *MUC5B*, бяха поставяни в разтвор RNeasy® и замразявани. В такова състояние те бяха транспортирани до Центъра по Молекулна Медицина към Катедрата по Химия и Биохимия към МФ на МУ - София. За установяване на експресионния статус на *MUC5AC* и *MUC5B* гените ние приложихме метода на qRT-PCR (Фигура 19). Последователно описани са стъпките на алгоритъма, който бе приложен за всяка една от взетите тъканни проби.



Фигура 19. Апаратура за qRT-PCR, Център по Молекулна Медицина

4.2.3.1. Изолиране на РНК от тъкан.

От събраните тъканни проби беше изолирана тотална РНК с помощта на RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen), като се следваха инструкциите на производителя (Фигура 20). Малка част от тъканната 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 със силициево-базирана мембрана (RNeasy MinElute колонки). Следваха стъпки за промиване на колонката и нейното елуиране.



Фигура 20. Стъпки при изолирането на тотална РНК с помощта на RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen).

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

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

4.2.3.3. 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 100 ng РНК. В Таблица 4 са показани

реактивите използвани за RT-PCR и техните количества, а в Таблица 5 - условията за протичане на реакцията.

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

Таблица 4. Компоненти на RT-PCR реакцията.

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

Таблица 5. Условия за протичане на обратната транскрипция.

4.2.3.4. Провеждане на RT-qPCR

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

верижни ампликони флуоресцентният сигнал на SYBR Green багрилото нараства. Компонентите на реакцията са представени в Таблица 6, а условията за протичане на RT-qPCR реакцията са представени в Таблица 7.

Компонент	Количество (μl)
за една реакция	
2x QuantiTect	
SYBR Green PCR Master Mix	5 μl
10x QuantiTect Primer Assay	1 μl
RNase- free H ₂ O	варира
кДНК матрица	варира
Краен обем	10 μl

Таблица 6. Компоненти на RT-qPCR реакцията.

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

Таблица 7. Условия за протичане на RT-qPCR.

4.2.3.5. 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 амплифицираният се продукт се удвоява след всеки цикъл. Количествено определяне на кДНК по време на амплификационната реакция се осъществява чрез проследяване на флуоресцентния сигнал от репортера – при нарастване на броя на амплифицираните 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 ΔCt се взеха 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* генът.

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.

5. Резултати

5.1. Демографски анализ

Разпределението по пол при пациентите изобщо, включващо пациентите в ХРС групата и контролите, беше 54 мъже (67,5%) и 26 жени (32,5%), средната възраст беше 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 21). 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 24). 48 от 66 имаха ХРС с назална полипоза (36 мъже и 12 жени, Фигура 22), 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 23), 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 8; Фигура 24), но е редно да се спомене, че средната възраст при жените е повишена до голяма степен заради наличието на пациентка на възраст 74 години, и то 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 8. Средна възраст на пациентите в години, вкл. разбита по пол



Фигура 21. Разпределение на пациентите с ХРС по пол

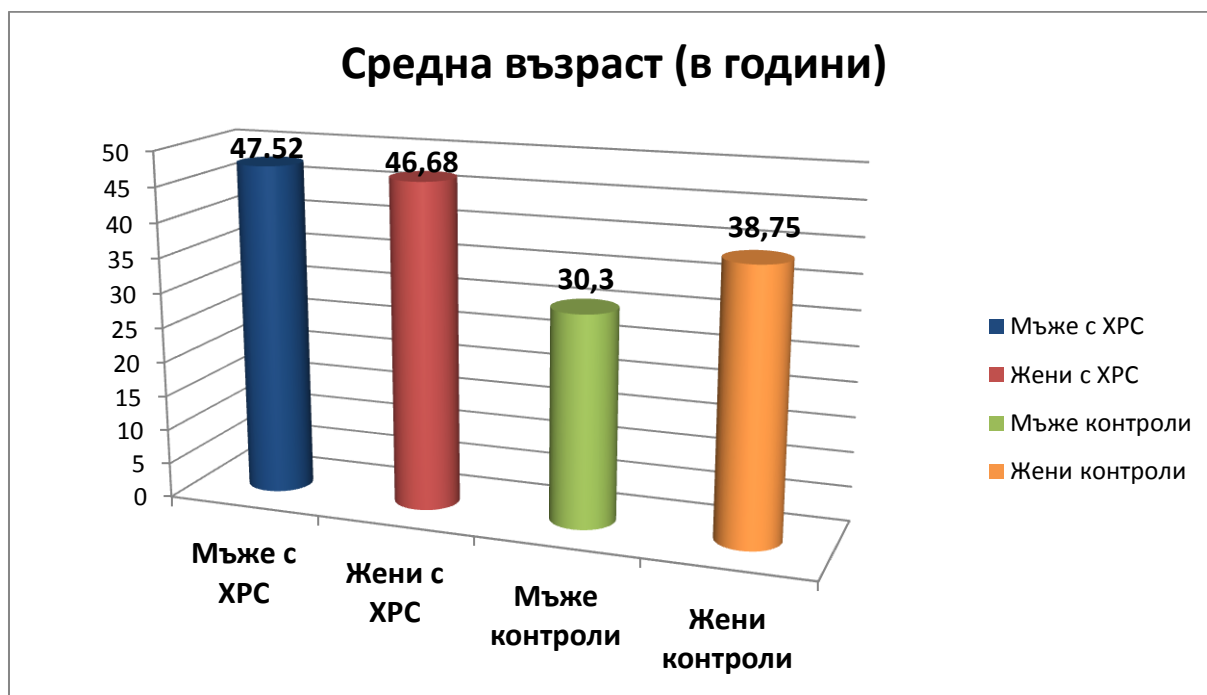


Фигура 22. Разпределение на пациентите от ХРС групата съобразно подтипа на ХРС



Фигура 23. Разпределение на пациентите контроли по пол

Впечатление прави по-ниската възраст на пациентите от контролната група, както при мъжете, така и при жените (Фигура 24). Това в много отношения е очаквано предвид емпиричното наблюдение, което е и потвърдено от статистически данни²²⁵, че по-млади пациенти по-често имат дейности, които водят или биха могли да доведат до травма в лицевата област²²⁵.



Фигура 24. Средна възраст на пациенти с ХРС и контроли, разбито по пол

5.2. Дескриптивен анализ

5.2.1. 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 9).

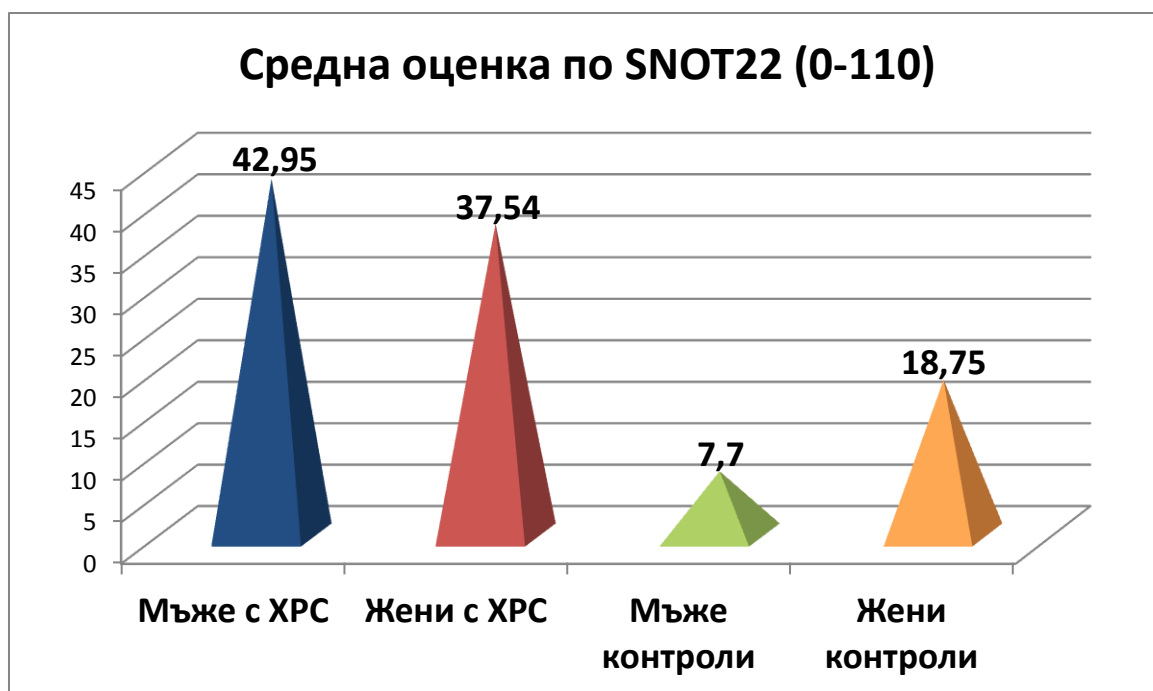
ХРС група	Средна оценка SNOT22 (от 110)
Мъже	42,95
Жени	37,54
Общо	41,15

Таб. 9. 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 10). Важна забележка, която бе посочена и в 4.1. е, че пациентите от контролната група бяха помолени да оценят симптомите си от времето преди претърпяването на травматичната увреда, заради 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 10. Средна оценка по SNOT22 при мъже, жени и общо при контролите



Фигура 25. Средна оценка по SNOT22 в различните група пациенти

Интересно наблюдение е, че мъжете с диагноза ХРС имат по-висока средна оценка по SNOT22 от жените с диагноза ХРС (Фигура 25). Обратното се наблюдава при контролните пациенти, където жените са оценили наличните си симптоми преди остро настъпилата травма като по-силни от контролите мъже.

5.2.2. 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 11; Фигура 26). 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-висок от нивото в популацията – 18,9%²²⁶.

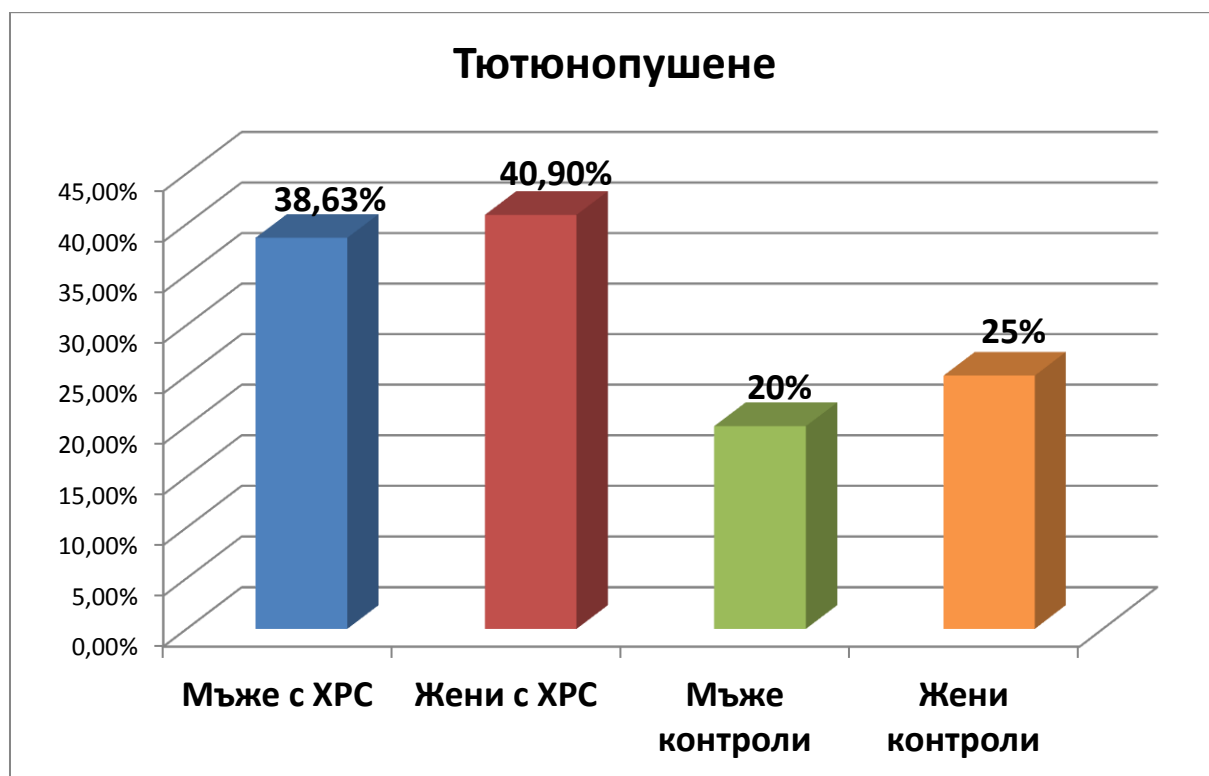
Пушене ХРС	Пушачи	Непушачи
Мъже	17/44 (38.63%)	27/44 (61.36%)
Жени	9/22 (40.90%)	13/22 (59.09%)
Общо	26/66 (39.39%)	40/66 (60.60%)

Таб. 11. Тютюнопушене поне в последната година преди операцията сред групата с ХРС

Сред контролите процентът на пушачи беше по-нисък – общо 21,42%, разбито по полове: 20% при мъжете и 25% при жените (Таблица 12; Фигура 26), като е редно да се има предвид относително малката извадка.

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 12. Тютюнопушене поне в последната година сред групата контроли



Фигура 26. Процент на пушачи сред различните групи

5.2.3. Консервативно лечение с назални стероиди преди операцията

Пациентите от ХРС групата бяха разпитани и за опитано консервативно лечение с назални стероиди преди операцията. Близко две трети от пациентите от групата с ХРС бяха опитали такова (Таблица 13; Фигура 27), 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 13. Предоперативна терапия с назални стероиди



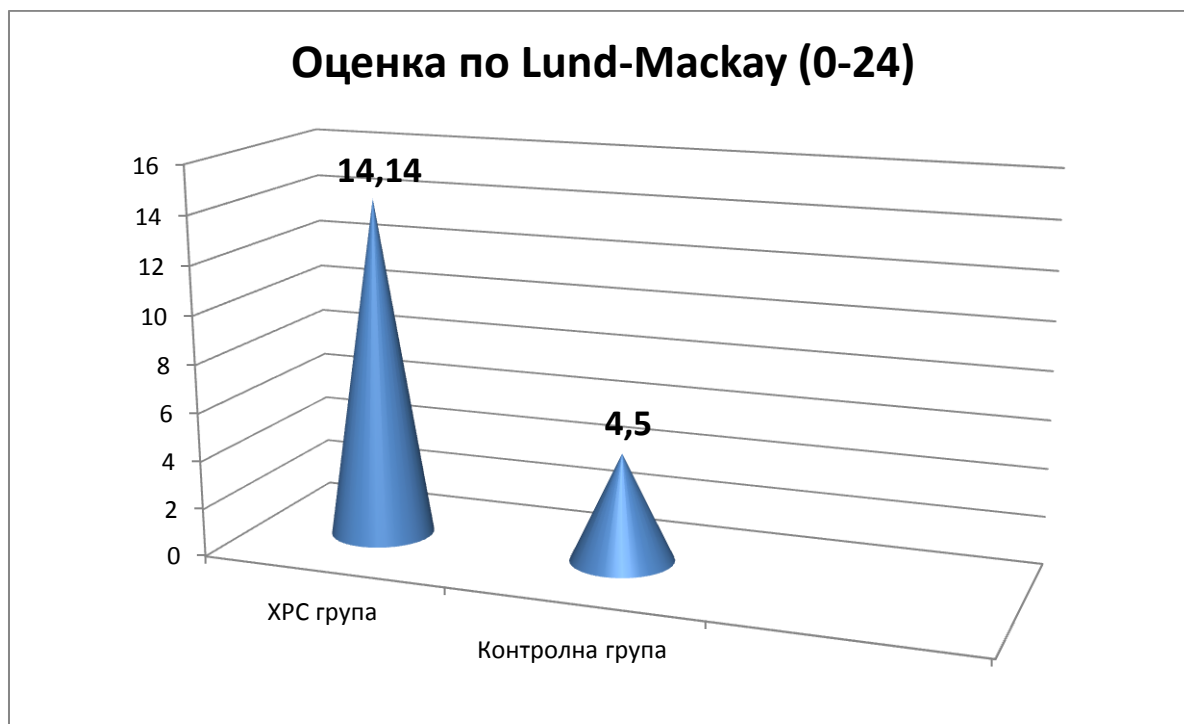
Фигура 27. Процент сред пациентите с ХРС, провеждали в миналото терапия с назални стероиди

5.2.4. 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 (Таблица 14; Фигура 28), описана по-подробно в точка 2.5.3. 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 14. Средна оценка по Lund-Mackay при пациентите с ХРС и при контролите



Фигура 28. 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 (5.3.1.7., 5.3.2.1.7., 5.3.2.2.7).

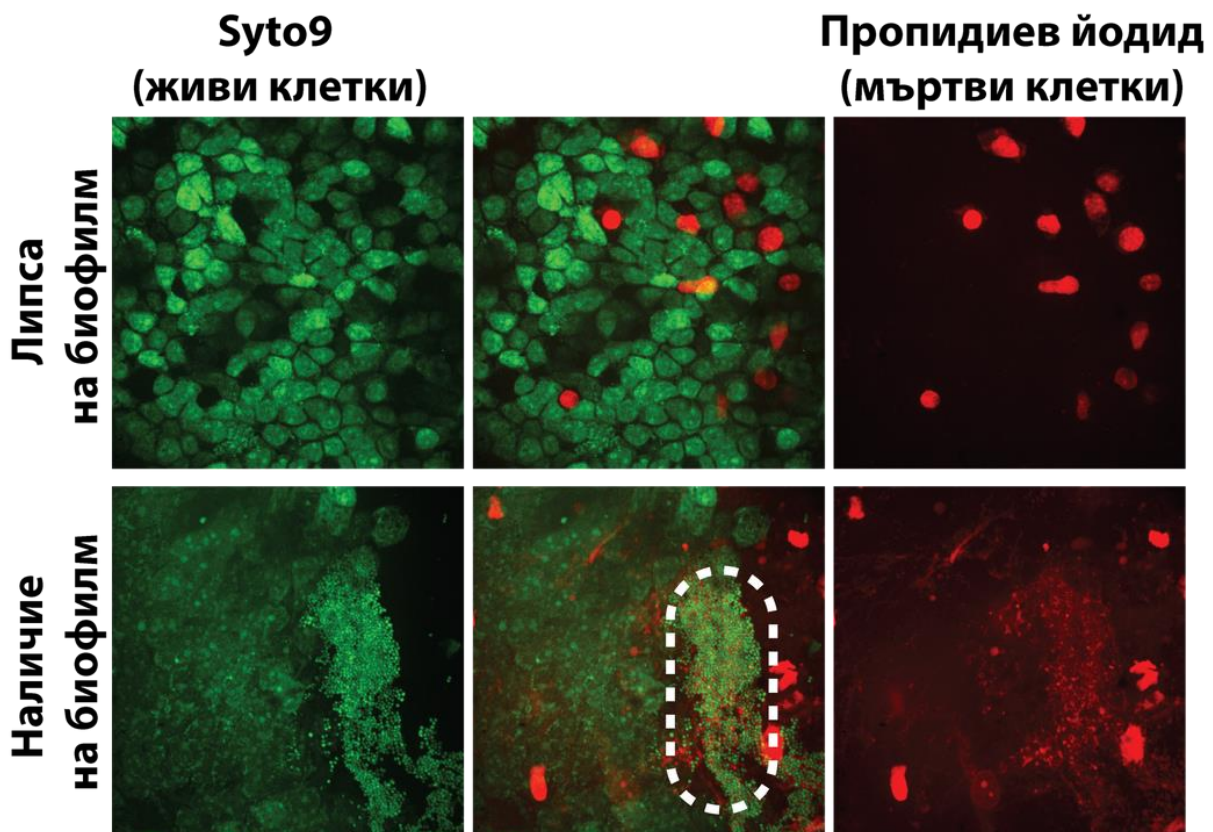
5.3. Статистически анализ

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 анализиранияте данни.

5.3.1. Наличие на бактериален биофилм

5.3.1.1. 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 29. 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“²²⁷

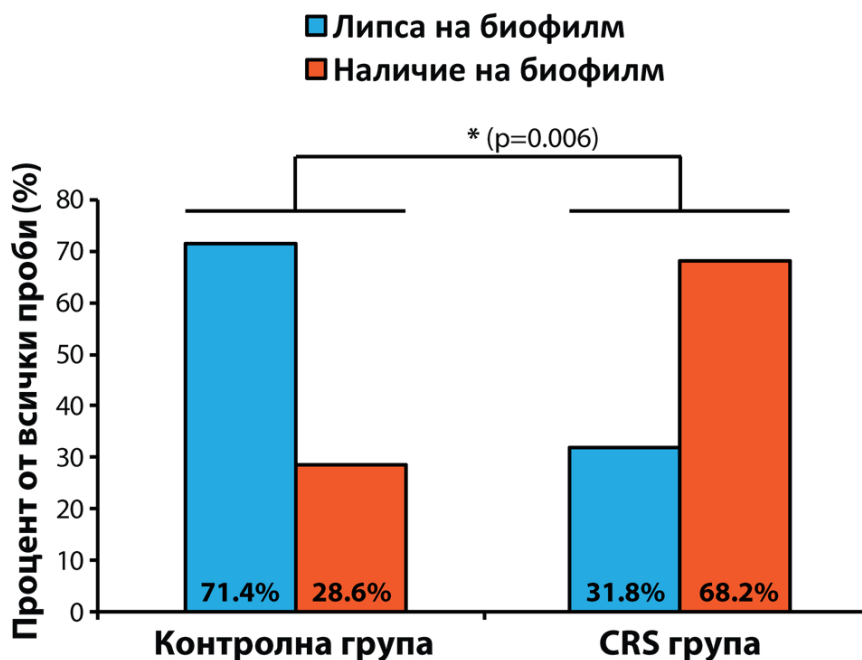
При разглеждане на пробите на пациентите от групата с ХРС бактериална биофилм структура се откри в пробите на 45 от 66-мата пациенти (45/66 или 68,2%), които бяха означени като биофилм-позитивни, докато в пробите на останалите 21 пациенти (21/66 или 31,8%) такава не се откри и те бяха означени като биофилм-негативни (Фигура 29).

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. 15).

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 15. 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 30. 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”²²⁷

Установи се разлика между двете групи с висока статистическа значимост ($p=0,006$). Резултатът (Фигура 30) 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. 16).

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 16. 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. 17) 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 17. 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 значение на субтипа на последния – CRSwNP или CRSsNP.

5.3.1.2. Взаимовръзка между наличието на биофилм и възрастта

За откриване на значима взаимовръзка между наличието на биофилм и възрастта 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	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 18. 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.

5.3.1.3. Взаимовръзка между наличието на биофилм и пола

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

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 19. Chi-square test за взаимовръзка между наличието на биофилм и пола 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 20. Fisher`s exact test за взаимовръзка между наличието на биофилм и пола 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.

5.3.1.4. 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. 21).

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 21. 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.

5.3.1.5. Взаимовръзка между наличие на биофилм и тютюнопушене

За откриване на значима взаимовръзка между наличието на биофилм и тютюнопушенето се направи статистически анализ, като за пациентите с ХРС се използва Chi-square test (Таб. 22), а за пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 23).

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 22. Chi-square test за взаимовръзката между наличието на биофилм и тютюнопушенето 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 23. Fisher's exact test за взаимовръзка между наличието на биофилм и тютюнопушенето при контролите; Не се установи статистически значима взаимовръзка ($p > 0,05$).

Противно на резултатите от други проучвания^{66,228}, откриващи връзка между тютюнопушенето и формирането на бактериални биофилми, нашите резултати не откриха сигнификантна такава нито при пациентите с ХРС, нито при контролите.

5.3.1.6. Взаимовръзка между наличието на биофилм и предходно лечение с назални стероиди

За откриване на значима взаимовръзка между наличието на биофилм и предходно лечение с назални стероиди на пациентите с ХРС се направи статистически анализ с Chi-square test (Таб. 24).

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 24. 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 предходното 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.

5.3.1.7. Взаимовръзка между наличието на биофилм и образно-диагностичната оценка по Lund-Mackay

За откриване на значима взаимовръзка между наличието на биофилм и образно-диагностичната 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. 25).

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 25. Mann-Whitney Test за взаимовръзка между наличието 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).

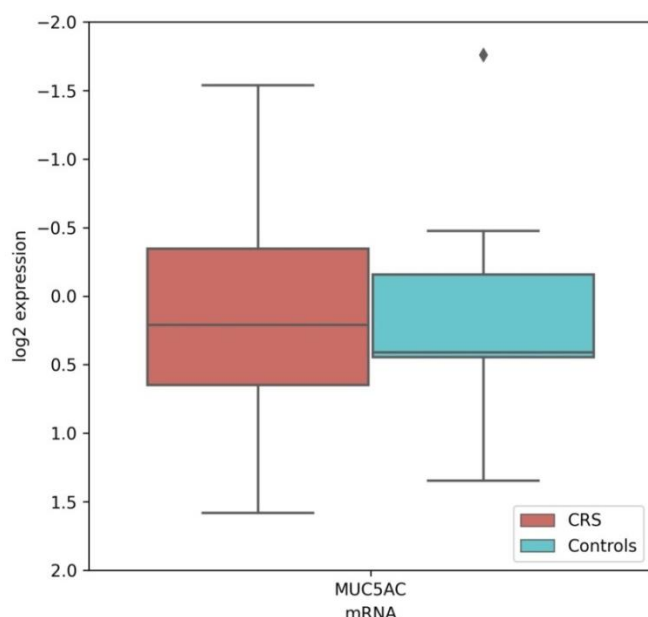
От резултата от направения анализ може да се заключи, че няма съществена взаимовръзка между наличието на бактериален биофилм и образно-диагностичната оценка на тежестта на риносинуита по скалата Lund-Mackay при пациентите с ХРС.

5.3.2. Муцинова експресия

5.3.2.1. Ниво на експресия на *MUC5AC*

5.3.2.1.1. 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 31) бе сметнато като релативна количествена (relative quantity, RQ) стойност чрез 2- $\Delta\Delta C_t$ метода.



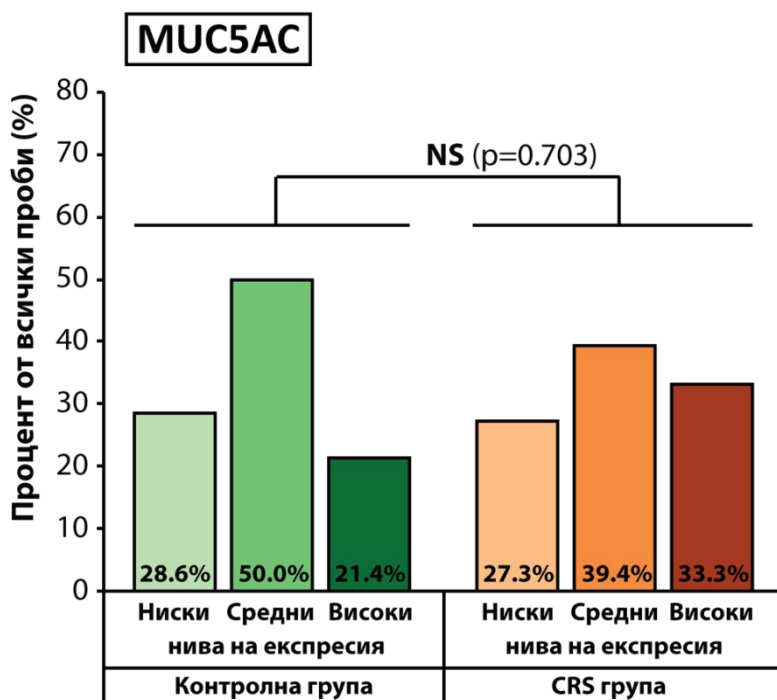
Фигура 31. Съпоставка на логаритмичните стойности на експресията на *MUC5AC* между пациенти с ХРС и контроли

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^{19,229}, 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 установена при 3 от 14 пациенти в контролната група (21,4%), докато при пациентите с ХРС 22-ма 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. 26).

RQ- <i>MUC5AC</i>		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 26. 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 32. 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“²²⁷

Въпреки че не се установи статистически значима разлика между двете групи (Фиг 32), 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 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 в процентите 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. 27).

<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 27. 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. 28).

<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 28. 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.

5.3.2.1.2. Взаимовръзка между нивото на експресия и възрастта

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. 29).

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 29. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и възрастта; 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.

5.3.2.1.3. Взаимовръзка между нивото на експресия и пола

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. 30), а за групата на пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 31).

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

Fisher`s exact test

Група	Пол		RQ-MUC5AC			Общо	p
			намалена експресия	срединна експресия	повишена експресия		
Контрол и	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 31. Fisher`s exact test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и пола 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.

5.3.2.1.4. 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. 32).

Група	Показател	RQ-MUC5AC	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 32. 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.

5.3.2.1.5. Взаимовръзка между нивото на експресия и тютюнопушенето

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. 33), а за контролите – Fisher's exact test (Таб. 34).

Група	Пушене		RQ-MUC5AC			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 33. Chi-square test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и тютюнопушенето при пациентите с ХРС; Статистически значима взаимовръзка не се установи при пациентите с ХРС ($p > 0,05$).

Група	Пушене		RQ-MUC5AC			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 34. Fisher`s exact test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5AC* и тютюнопушенето 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.

5.3.2.1.6. Взаимовръзка между нивото 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. 35).

Група	Назални стероиди		RQ-MUC5AC			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 35. Chi-square test за взаимовръзка между нивото 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.

5.3.2.1.7. Взаимовръзка между нивото на експресия и образно-диагностичната 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. 36).

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	

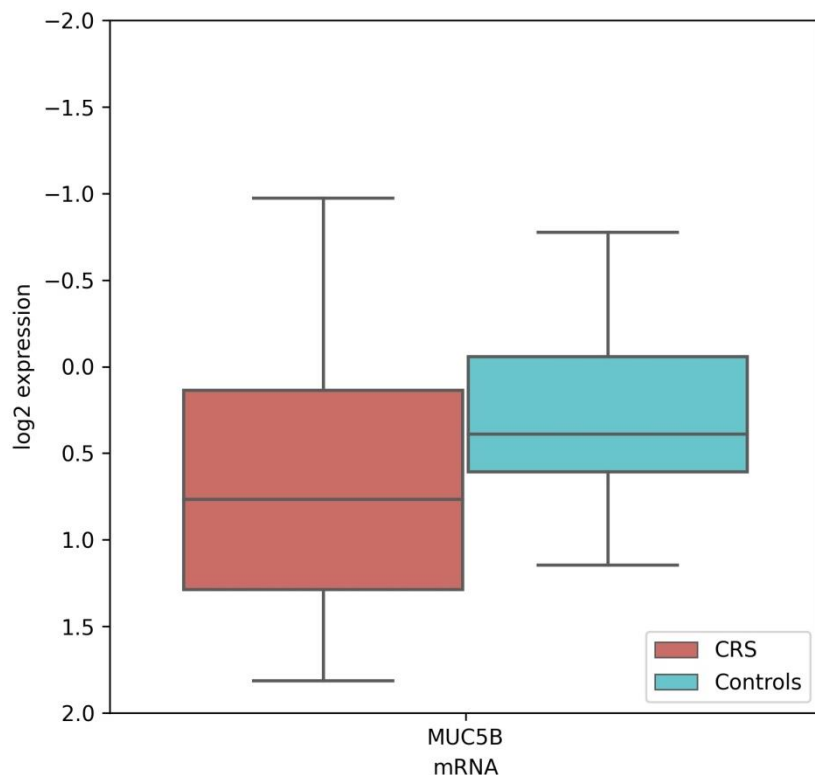
Таблица 36. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между ниво на експресия на *MUC5AC* и оценка по Lund-Mackay; Както при пациентите с ХРС, така и при контролите, броят на пациентите не позволява надеждно установяване на наличие на взаимовръзка (n/a).

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

5.3.2.2. Ниво на експресия на *MUC5B*

5.3.2.2.1. Сравнение на нивото 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 33) бе сметнато като релативна количествена (relative quantity, RQ) стойност чрез 2- $\Delta\Delta C_t$ метода.



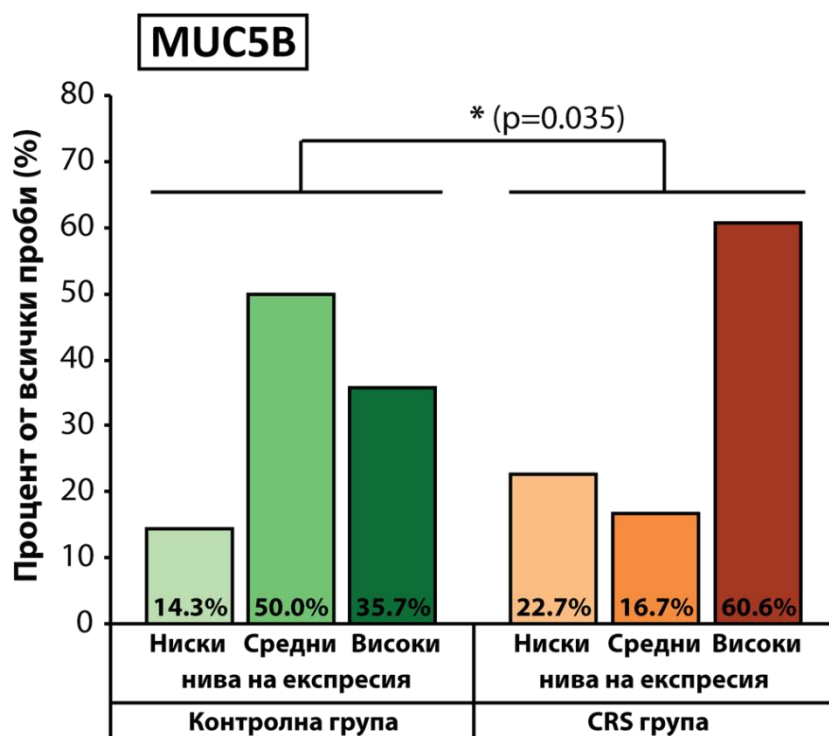
Фигура 33. Съпоставка на логаритмичните стойности на експресията на *MUC5B* между пациенти с ХРС и контроли

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^{19,229}, 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. 37).

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



Фигура 34 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”²²⁷

Установи се сигнификантна разлика в нивото на експресия между двете групи пациенти (Фигура 34), като процентът на пациенти с 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 средните 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. 38).

<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 38. 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. 39).

<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 39. 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 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.

5.3.2.2.2. Взаимовръзка между ниво на експресия и възраст

За откриване на значима взаимовръзка между нивото 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 нивото на експресия на *MUC5B* и възрастта 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.

5.3.2.2.3. Взаимовръзка между нивото 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 пациенти с ХРС се използва Chi-square test (Таб. 41), а за групата на пациентите контроли - Fisher`s exact test (Таб. 42).

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

Група	Пол		RQ- <i>MUC5B</i>			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 42. Fisher`s exact test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и пола 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.

5.3.2.2.4. Взаимовръзка между ниво на експресия и субективна симптоматика по SNOT22

За откриване на значима взаимовръзка между нивото 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. 43).

Група	Показател	RQ- <i>MUC5B</i>	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 43. Kruskal Wallis Test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и оценката 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.

5.3.2.2.5. Взаимовръзка между нивото на експресия и тютюнопушенето

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. 44), а за контролите – Fisher’s exact test (Таб. 45).

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 44. Chi-square test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и тютюнопушенето 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 45. Fisher’s exact test за взаимовръзка между нивото на експресия на *MUC5B* и тютюнопушенето 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.

5.3.2.2.6. Взаимовръзка между нивото на експресия и предходното 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. 46).

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 46. Chi-square test за взаимовръзка между нивото 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.

5.3.2.2.7. Взаимовръзка между нивото на експресия и образно-диагностичната оценка по Lund-Mackay

За откриване на значима взаимовръзка между нивото 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. 47).

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 47. 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.

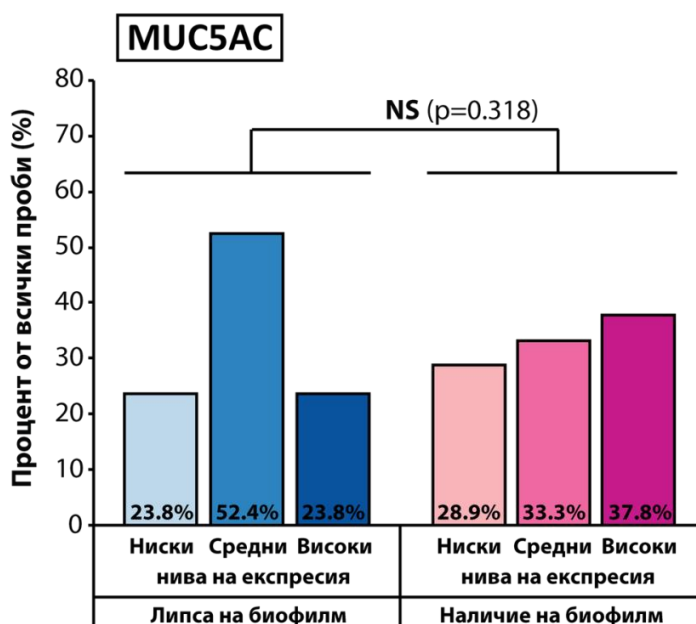
5.3.3. Взаимовръзка между двата фактора при пациентите с ХРС

5.3.3.1. 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. 48). Резултатите са представени и визуализирани и във Фигура 35.

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 48. 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 ($p=0,318$)

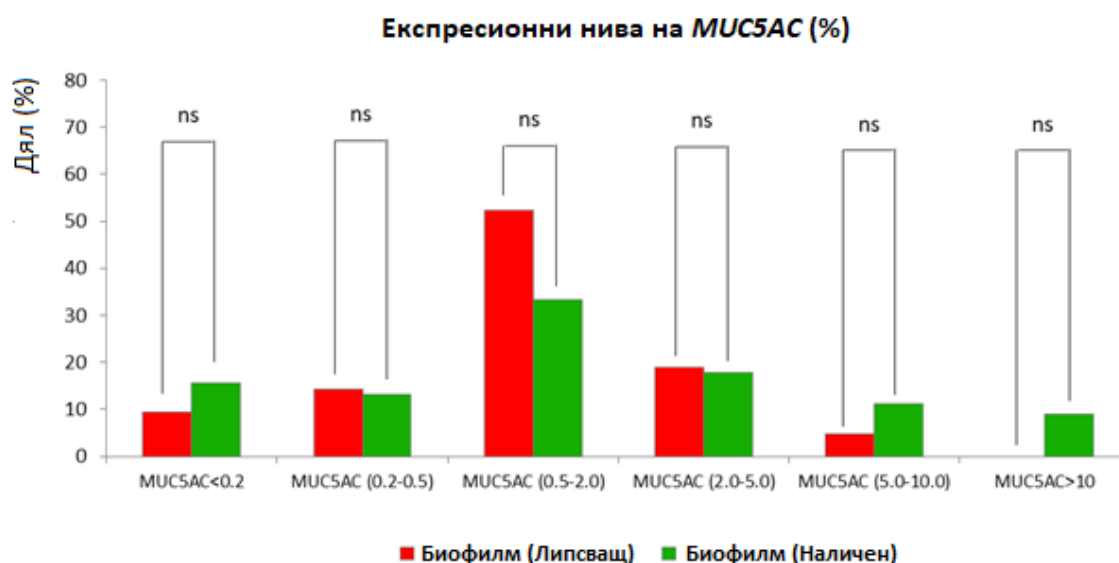


Фигура 35. Анализ на взаимовръзката между наличие на биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* при пациентите с ХРС; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients“²²⁷

В допълнение бе направен и статистически анализ с Chi-square test (Таб.49) на взаимовръзката между наличието на бактериален биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC*, като 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 36.

<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 49. 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 36. 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. 50), като 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 50. Сравнителен анализ на средните стойности, тест на Mann-Whitney; Не се открива статистически значима взаимовръзка ($p>0,05$)

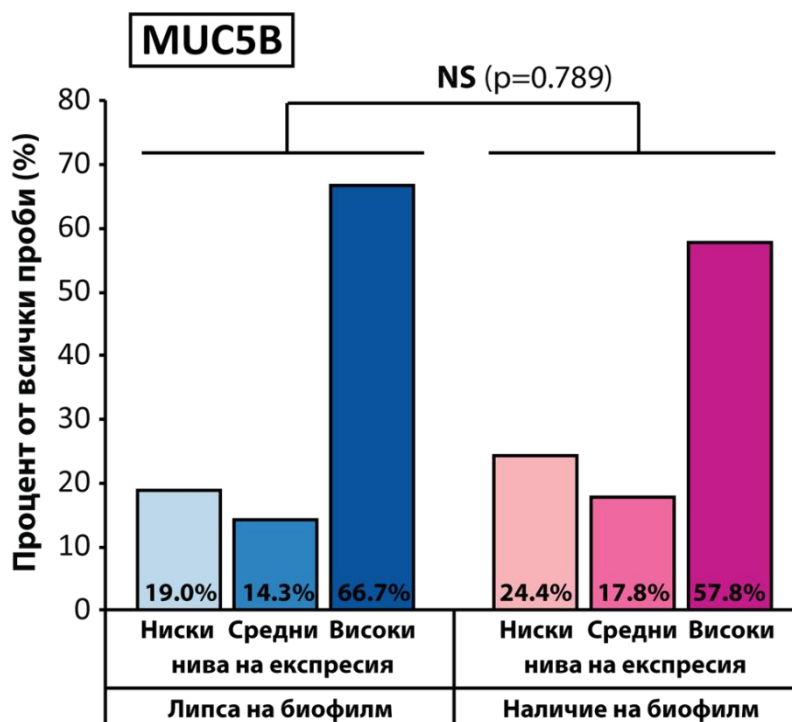
От резултатите от направените анализи може да се заключи, че поне директна взаимовръзка между капацитета за формиране на биофилм и нивото на експресия на *MUC5AC* няма. Възможно е наличие на по-сложна и многофакторна такава, хипотеза, която може да се потвърди или отхвърли с допълнителни бъдещи проучвания.

5.3.3.2. 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 статистически анализ с тест Chi-square (Таб. 51). Резултатите са представени и визуализирани във Фигура 37.

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



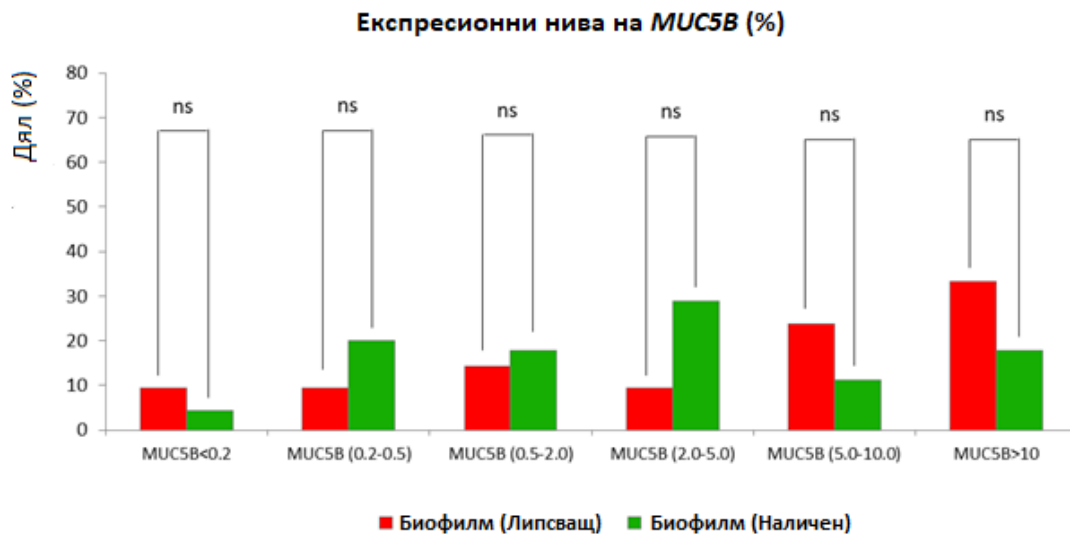
Фигура 37. Анализ на взаимовръзката между наличието на биофилм и нивото на експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС; Фигурата е адаптирана от статията „Analysis of Bacterial Biofilm Formation and *MUC5AC* and *MUC5B* Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients”²²⁷

В допълнение бе направен и статистически анализ с Chi-square test (Таб. 52) на взаимовръзката между наличието 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 38.

<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 52. Chi-square test за взаимовръзка между наличието на бактериален биофилм и експресията на *MUC5B*, разбита в 6 подгрупи; Статистически значима взаимовръзка не се установи ($p>0,05$)



Фигура 38. Взаимовръзка между наличието на бактериален биофилм и експресията 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. 53), като 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 53. 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.

6. 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 г. и продължи до месец юни 2021 г. 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 поведенията, 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, което 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^{5,230}, така и икономически^{3,231}. Множество фактори биват посочени като допринасящи за развитието на болестта, като например експозиция към цигарен дим⁶⁵, независимо дали активна или пасивна, алергия^{72,232,233}, бактериални суперантигени^{58,234} и особености на локалния климат и географското разположение². 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^{8,12,21,22,163}. Друг често цитиран фактор за хронификация е нарушената регулация на муциновата експресия от лигавицата на носа и синусите^{17,18}.

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 биофилм²⁰, както и че присъствието на муцини е важен и благоприятстващ фактор за развитието и оцеляването на бактериален биофилм^{235,236}. Две изследвания с реални пациенти пък докладват, че *in vivo* има взаимовръзка между качество и структура на

муцините²² или тяхното количество и експресия²¹ 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^{23,24}, 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^{177,237–239}, както и че муцини имат отношение и принос към разбиване или дисоциация на формиран се вече биофилм²⁴⁰. 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 пациенти 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 – за 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%⁸ като в едно проучване, конкретно при пациенти с ХРС с полипи, е докладвана честота от 97,1%²⁴¹. 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^{241–243}. 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.

Дискусията заслужават и установените взаимоотношения на бактериалните биофилми с другите изследвани фактори – 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^{199,243}. Относно връзката на субективните оплаквания, оценени с въпросника SNOT, и наличието на биофилм има разнопосочни като резултат проучвания – такива, установяващи връзка²⁴⁴ и такива, които не установяват съществена такава²⁴⁵. По отношение на тютюнопушенето като фактор за формиране 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 наличието на биофилм и тютюнопушенето^{66,228,246}. Нашите резултати не показва 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 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 биофилм¹⁶³, докато при друго такава се установява²⁴³, 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 фактора²⁴⁷, но по-голям брой са тези, установяващи такава^{164,248}. 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 околностествяващия показател RQ – такива с ниска, такива със срединна 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 срединна 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 (CRSwNP) и тези без назална полипоза (CRSsNP). Статистически значима разлика в нивата на експресия спрямо контролите не се установи за нито една от тези две групи (Таб. 27, Таб. 28). 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 лигавицата¹⁷⁷. 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-малкия 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 анализирания 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^{15,24,249} или кистична фиброза^{24,250} (муковисцидоза), по време на и след определени инфекции^{251–253}, както и поради тютюнопушене^{23,254}. По отношение на последното обаче нашите данни не показва 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 статия¹⁹, разглеждаща ролята на *MUC5AC* в развитието на ХРС, са цитирани 20 статии по темата, от които в 13 се съобщава за сигнификантно повишена експресия^{17,18,21,210,216–218,221,223,224,255–257}, в 4 не се съобщава за сигнификантна разлика между пациенти с ХРС и контроли^{211,214,215,258}, а в 3 статии се докладва намалена експресия на *MUC5AC* в пациентите с ХРС^{16,259,260}. По отношение на *MUC5B* в същия обзор се цитират 14 статии, от които 9 докладват увеличена експресия при пациентите с ХРС^{16–18,21,211,224,257,261,262}, в 4 не се установява сигнификантна разлика между пациентите с ХРС и контролите^{215,258,263,264} и в една се рапортува намалена експресия на *MUC5B* при пациентите с ХРС в сравнение с контролната група²⁵⁹. Редно е да се отбележи, че в цитираните проучвания има многообразие от дизайни и методология¹⁹. 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 първия от изброените муцини – *MUC2*, наблюдаваните в обзора¹⁹ данни са отново нееднозначни – 3 от разгледаните проучвания установяват повишена експресия в сравнение със здрави контроли^{261,265,266}, а друго 1 установява намалена такава²¹⁰. 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 полипи¹⁶. 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^{257,267}, и едно, в което не се установява такава²⁶⁴, а за MUC8 – 5, при които се установява увеличена експресия на муцина при пациентите с ХРС спрямо контроли^{257,259,260,265,268} и едно, при което се установява намалена такава¹⁶.

От всичко изложено дотук 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 документираните 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 фактора възраст има множество проучвания, които не установяват взаимоотношение между него и експресията и количеството на MUC5AC и MUC5B^{269–273}, както и някои, които установяват известна зависимост^{274,275}, 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 сочат, че няма отношение към експресията на муцините^{269–271,273}, 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. Любопитното е, че преимуществено се докладва повишаване на експресията на MUC5AC вследствие на цигарен дим^{23,229,254,276,277}, докато за MUC5B не се установява такъв ефект^{229,277}. 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), а това намеква 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*^{19,249,259} и на *MUC5B*²⁵⁹; при нашите пациенти обаче такава взаимовръзка не се установи, като 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^{17,21}. 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 високия 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^{23,24}, 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 2015²¹, в което се стига 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 повторваемост 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 г. Различава се съществено и общият брой на пациенти с ХРС, които са били набрани – докато Mao et al публикуват резултати за група от 24 пациенти, то нашата група на пациенти с хроничен риносинусит наброява ефективно 66-има (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^{8,165}, 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 Mao, като обаче и двете са в посочените по-горе широки граници от 25%-92%⁸, 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 подбраното място за биопсия, както вече коментирахме. 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 Mao 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 al²² от 2010 г. 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 внесения лиганд и в последствие да бъдат елиминирани от мукоцилиарния клирънс²².

Както е видно от всичко изложено по-горе, темата за бактериалните биофилми в контекста на хроничния риносинусит, 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 формираните вече биофилми.

Методите за директно антибактериално въздействие и елиминиране на бактериите в биофилма чрез антибиотици са сред 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 цитираните⁹ 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^{278,279}. Генерално обаче, макар да се установява краткосрочно подобрене, дългосрочните ефекти се оказват незначителни²⁸⁰. 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 ефект²⁸¹. В допълнение към проучванията за антибиотична борба с биофилмите, се разработват и проучват неантибиотични антибактериални методи. Веществото N,N-дихлоро-2,2-диметилурин (NVC-422) например е синтетичен вариант на вещество, което се отделя при фагоцитоза на микроби и е показало ефективността си срещу различни бактериални видове, а и срещу някои вируси²⁸². Проучванията с него обаче са твърде малко за по-дефинитивни заключения⁹. Друг често цитиран и проучван продукт с антимикробно 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^{283,284}, но за по-сигурни заключения са необходими повече и по-задълбочени изследвания. Слаби

органични киселини като оцетната и лимонената киселина от столетия се ползват за консервиране на храни и за дезинфекция²⁸⁵. Добрият им антибактериален ефект се отдава на наличието на относително хидрофобен органичен остатък в добавка към карбоксилната им група, който им позволява да преминат успешно през бактериалната мембрана и така карбоксилната група да претърпи дисоциация вътреклетъчно, което в крайна сметка води до клетъчна смърт²⁸⁵. 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 ХРС²⁸⁶, което дава нелоша опция за лечение на такива пациенти. Друга насока, в която има изследвания, са пробиотичните 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*²⁸⁷, така и *in vivo* при пациенти с ХРС²⁸⁸, като обаче при по-важното проучване *in vivo* ефектът не се е оказал съществен и задоволителен. Поредна насока за бактерицидно въздействие върху формирани 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 биофилма²⁸⁹, като същевременно друго проучване по темата на същия екип е показало, че такъв тип терапия е безопасен за мукозата и клетките ѝ²⁹⁰. Тази терапевтична опция е обаче все още в експериментална фаза и рутинно клинично приложение не се среща. Спекулира се също така и с използването на вируси – бактериофаги като начин за ерадикация на бактерии, формирани биофилм²⁸⁵.

Втора главна насока за противодействие на биофилмите е недопускане на формирането им като цяло. 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*²⁹¹, активатори или заместващи молекули при генетични дефекти на ключовия за потискане на AHL рецептор T2R38²⁹¹, макролиди и конкретно азитромицин, който има *in vitro* свойството да потиска AHL²⁷⁹, както и разграждащите AHL ензими параоксонази²⁹². Всички тези молекули и подходи обаче все още са генерално във фаза на *in vitro* изпитвания и приложението им в рутинната клинична практика не изглежда скорошно⁹.

Третата главна насока за противодействие на биофилмите е разбиването на съществуващите и образувалите 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 ХРС²⁹³. 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^{294–296} 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 невинаги се е показвал като достатъчно отчетлив и задоволителен, тъй като дава и голям процент нежелани реакции като алергия, парене в носа и главоболие^{297,298}. Опити са правени и с по-специфично разработени за целта съфактанти като например лимонена киселина/цвистерйонен съфактант (citric acid/Zwitterionic surfactant, CAZS), както и с препаратът SinuSurf. И в двата случая въпреки докладван отличен ефект *in vitro*^{299,300} е имало данни за токсични реакции²⁹⁹ и увреждане на ресничестия епител и съответно – на мукоцилиарния клирънс³⁰¹, поради което препаратите не се ползват в клиничната практика⁹. 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-B³⁰², който разгражда поли-N-ацетилглюкозамин – полизахарин, произвеждан от *S. aureus*, както и ензимът NucB³⁰³ – нуклеаза, разграждаща извънклетъчното ДНК на ББФ. И двете съединения са показали обещаващи резултати *in vitro*^{302,303}, но е нужно по-обстойно тестване, вкл. такова върху пациенти, за да се прилагат рутинно в клиничната практика⁹. От по-стандартно използваните в клиничната практика муколитици има данни, че N-ацетилцистеинът дава добър ефект за разбиване на бактериални биофилми²⁸⁶ и бива препоръчан като адювантно лечение при ХРС²⁸⁶.

В заключение лечението на бактериалните биофилми, включително в контекста на хроничния риносинуит, е обширна тема, в която непрестанно се подлагат на изследване различни познати методи и молекули, като същевременно активно се разработват и тестват нови такива. Предвид че към момента не е открит единичен надежден и високо-ефективен 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 риносинуит, включително би наложило изисквания за рутинно тестване на пациентите с тази патология за наличие на биофилм. В този контекст важни измерения ще придобият показатели 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 (екзоползахарид) от матрикса на биофилми на *S. aureus*²⁸⁶. Описаният в проучването от 2013 г. 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 13-те проби, при които се установява ББФ с FISH, 12 са положителни и при теста за екзоползахарида, 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 метода при по-голяма кохорта от пациенти¹³. 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 бактерий. Такъв е неминуемият недостатък (наред с други като нужда от обработка и време за изследване) и на микроскопията с FISH, когато дискутираме

метод, който, при налично лечение, да може да бъде прилаган по-масово. Същевременно в зависимост от това дали хипотетичният 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 багрило⁸ 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.

7. 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 по отношение на ключовата му 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.

8. Изводи

За изпълнение на поставените задачи в проучването финално бяха 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 риносинуита 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, взимаш 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.

9. Приноси

1. За първи път в България се създаде алгоритъм за изследване на тъканни проби от пациенти с риносинуит за наличие на бактериален биофилм; ефективно и с възможност за повторемост се изпълняваха стъпки за взимане на проба, съхранение и трансфер, оцветяване с VacLight 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 риносинуит.
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 риносинуит
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.

10. 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 риносинуит

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

CRSsNP – Chronic rhinosinusitis without nasal polyps, Хроничен риносинуит без назални полипи

CRSwNP – 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

11. 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. Min, J. Y. & Tan, B. K. Risk factors for chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **15**, 1–13 (2015).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. 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).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
20. 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).

21. 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).
22. Tan, L. *et al.* Aberrant mucin glycoprotein patterns of chronic rhinosinusitis patients with bacterial biofilms. *Am. J. Rhinol. Allergy* **24**, 319–324 (2010).
23. 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).
24. Rose, M. C. & Voynow, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol. Rev.* **86**, 245–278 (2006).
25. Проф. д-р Иван Ценев, д-р Е. Ц. *Практически нарѣчник по оториноларингология.* (Издателска къща ‘Стено’).
26. Проф. Д. Димов, П. Г. Г. *Ушни, носни, гърлени болести.* (Издателство ‘Знание’ ЕООД, 1998).
27. О. Деспотов, К. Д. *Ендоназална хирургия.* (ЦРХЦ ‘Анима’, 2002).
28. Flint, P. W. *et al.* *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery Sixth Edition.* (Elsevier, 2015).
29. Lalwani, A. K. *Current Diagnosis & Treatment Otolaryngology - Head and Neck Surgery, Third Edition.* (McGrawHill).
30. Boboridis, K. G. & Bunce, C. Surgical orbital decompression for thyroid eye disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2009) doi:10.1002/14651858.CD007630.
31. Попов Т. М., Рангачев Ю., Конов Д., Попов Г., Ц. И. Ендоскопска орбитална декомпресия при пациент с метастаза в орбитата. *ОтоРиноЛарингология* **12**, 37–42 (2016).
32. Meng, X. & Zhu, G. Nasal Septal Swell Body : A Distinctive Structure in the Nasal Cavity. 1–7 (2021) doi:10.1177/01455613211010093.
33. Wikipedia. Nasal consonant. https://en.wikipedia.org/wiki/Nasal_consonant.
34. Cappello ZJ, Minutello K, D. A. Anatomy, Head and Neck, Nose Paranasal Sinuses. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499826/>.
35. Lundberg, J. O. Nitric oxide and the paranasal sinuses. *Anat. Rec.* **291**, 1479–1484 (2008).
36. Andersson, J. A., Cervin, A., Lindberg, S., Uddman, R. & Cardell, L. O. The paranasal sinuses as reservoirs for nitric oxide. *Acta Otolaryngol.* **122**, 861–865 (2002).
37. Rossie, J. B., Simons, E. L., Gauld, S. C. & Rasmussen, D. T. Paranasal sinus anatomy of Aegyptopithecus: Implications for hominoid origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8454–8456 (2002).
38. Lanza, D. C. & Kennedy, D. W. Adult rhinosinusitis defined. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **117**, S1–S7 (1997).
39. Thaler, E. R. & Kennedy, D. W. Rhinosinusitis: A guide for diagnosis and management. *Rhinosinusitis A Guid. Diagnosis Manag.* 1–279 (2008) doi:10.1007/978-0-387-73062-2.
40. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar, S. Diagnostic Criteria for Rhinosinusitis. *Clin. Pract. Guidel. Am. Acad. Otolaryngol. Neck Surg.* **12** (2015).
41. Lalwani, A. K. *Current Diagnosis & Treatment in Otolaryngology - Head & Neck Surgery.* (McGrawHill, 2012).
42. Tomassen, P. *et al.* Reliability of EP3OS symptom criteria and nasal endoscopy in the assessment of chronic rhinosinusitis - A GA2LEN study. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **66**, 556–561 (2011).

43. Snidvongs, K. Pediatric Versus Adult Chronic Rhinosinusitis. (2020).
44. Чилингиоров К., П. Г. Остър и хроничен риносинусит в детската възраст: анализ на съвременните терапевтични подходи. *In Spiro* 18–22 (2023).
45. Davis, L. J. B. & Kita, H. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: Role of airborne fungi and bacteria. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **24**, 59–73 (2004).
46. Ponikau, J. U. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin. Proc.* **74**, 877–884 (1999).
47. Douglas, R. *et al.* Response of peripheral blood lymphocytes to fungal extracts and staphylococcal superantigen B in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **117**, 411–414 (2007).
48. Isaacs, S., Fakhri, S., Luong, A. & Citardi, M. J. A meta-analysis of topical amphotericin B for the treatment of chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **1**, 250–254 (2011).
49. Orlandi, R. R., Marple, B. F., Georgelas, A., Durtschi, D. & Barr, L. Immunologic response to fungus is not universally associated with rhinosinusitis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **141**, 750–756.e2 (2009).
50. Orlandi, R. R. & Marple, B. F. Fungus and chronic rhinosinusitis: Weighing the evidence. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **143**, 611–613 (2010).
51. Wood, A. J., Antoszewska, H., Fraser, J. & Douglas, R. G. Is chronic rhinosinusitis caused by persistent respiratory virus infection? *Int. Forum Allergy Rhinol.* **1**, 95–100 (2011).
52. Anderson, H. M. *et al.* Assessment of wheezing frequency and viral etiology on childhood and adolescent asthma risk. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 692–694 (2017).
53. Brook, I. Microbiology of chronic rhinosinusitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **35**, 1059–1068 (2016).
54. Corriveau, M. N., Zhang, N., Holtappels, G., Van Roy, N. & Bachert, C. Detection of *Staphylococcus aureus* in nasal tissue with peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Rhinol. Allergy* **23**, 461–465 (2009).
55. Ou, J. *et al.* Association of intracellular *Staphylococcus aureus* with prognosis in chronic rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **6**, 792–799 (2016).
56. Suh, J. D., Cohen, N. A. & Palmer, J. N. Biofilms in chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **18**, 27–31 (2010).
57. Bendouah, Z., Barbeau, J., Hamad, W. A. & Desrosiers, M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **134**, 991–996 (2006).
58. Conley, D. B. *et al.* Superantigens and chronic rhinosinusitis: Skewing of T-cell receptor V β -distributions in polyp-derived CD4+ and CD8+ T cells. *Am. J. Rhinol.* **20**, 534–539 (2006).
59. Lam, K., Schleimer, R. & Kern, R. C. The Etiology and Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis: a Review of Current Hypotheses. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **15**, (2015).
60. London, N. R., Tharakan, A. & Ramanathan, M. The Role of Innate Immunity and Aeroallergens in Chronic Rhinosinusitis. *Adv. Otorhinolaryngol.* **79**, 69–77 (2016).
61. Robert M. Naclerio, MD; Marcella L. deTineo, RN; Fuad M. Baroody, M. Ragweed Allergic Rhinitis and the Paranasal Sinuses.pdf. **198**, 1–4 (2015).
62. Baroody, F. M., Mucha, S. M., deTineo, M. & Naclerio, R. M. Nasal challenge with allergen leads to maxillary sinus inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, (2008).
63. DeYoung, K., Wentzel, J. L., Schlosser, R. J., Nguyen, S. A. & Soler, Z. M. Systematic review of immunotherapy for chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **28**, 145–150 (2014).

64. Sundaresan, A. S. *et al.* Occupational and environmental risk factors for chronic rhinosinusitis: A systematic review. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **5**, 996–1003 (2015).
65. 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).
66. Goldstein-Daruech, N. *et al.* Tobacco smoke mediated induction of sinonasal microbial biofilms. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
67. Briggs, R. D., Wright, S. T., Cordes, S. & Calhoun, K. H. Smoking in Chronic Rhinosinusitis: A Predictor of Poor Long-Term Outcome after Endoscopic Sinus Surgery. *Laryngoscope* **114**, 126–128 (2004).
68. Kayalioglu, G., Oyar, O. & Govsa, F. Nasal cavity and paranasal sinus bony variations: A computed tomographic study. *Rhinology* **38**, 108–113 (2000).
69. 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).
70. Vincent, T. E. S. & Gendeh, B. S. The association of concha bullosa and deviated nasal septum with chronic rhinosinusitis in functional endoscopic sinus surgery patients. *Med. J. Malaysia* **65**, 108–111 (2010).
71. Tiwari, R. & Goyal, R. Study of Anatomical Variations on CT in Chronic Sinusitis. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **67**, 18–20 (2015).
72. 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).
73. Pérez-Piñas, I., Sabaté, J., Carmona, A., Catalina-Herrera, C. J. & Jiménez-Castellanos, J. Anatomical variations in the human paranasal sinus region studied by CT. *J. Anat.* **197**, 221–227 (2000).
74. Stanford Medicine; Otolaryngology - Head & Neck Surgery. Deviated Septum; Sinus Center. https://med.stanford.edu/ohns/OHNS-healthcare/sinuscenter/resources/patient_guides/deviated-septum.html.
75. Kweon, S., Deok, J., Seung, J., Hoon, S. & Hoon, S. The incidence of concha bullosa , unusual anatomic variation and its relationship to nasal septal deviation : A retrospective radiologic study \$. *Auris Nasus Larynx* (2017) doi:10.1016/j.anl.2017.01.003.
76. Coste, A. *et al.* Atypical Sinusitis in Adults Must Lead to Looking for Cystic Fibrosis and Primary Ciliary Dyskinesia. *Laryngoscope* **114**, 839–843 (2004).
77. El-Serag, H. B., Sweet, S., Winchester, C. C. & Dent, J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: A systematic review. *Gut* **63**, 871–880 (2014).
78. Превод на EPOS2020 от Българско ринологично сдружение. *Европейски консенсус за риносинуити и носна полипоза 2020*. vol. 21 (2020).
79. Hanna, B. C. & Wormald, P. J. Gastroesophageal reflux and chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **20**, 15–18 (2012).
80. Leason, S. R. *et al.* Association of gastro-oesophageal reflux and chronic rhinosinusitis: Systematic review and meta-analysis. *Rhinology* **55**, 3–16 (2017).
81. Kennedy, J. L. *et al.* Sino-nasal Outcome Test (SNOT-22): A predictor of post-surgical improvement in patients with chronic sinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **111**, 246–251 (2014).
82. Ishak, N. L., Subha, S. T. & Bakar, S. A. Isolated sphenoid sinusitis: A big headache. *Malaysian Fam. Physician* **14**, 29–30 (2019).
83. Emirates, U. A. Characteristics of sinus-related pain. 842–847 (2000) doi:10.1067/mhn.2000.101814.

84. ScienceDirect. Primary Headache. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/primary-headache>.
85. StanfordMedicine. Types of Headache. <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/brain-and-nerves/headache/types.html>.
86. Foundation, N. S. & Allergy, O. -- Head and Neck Surgery Otolaryngology – Head and Neck Surgery. **131**, 1–62 (2004).
87. Bent, J. P. & Kuhn, F. A. Diagnosis of allergic fungal sinusitis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **111**, 580–588 (1994).
88. European Forum for Research and Education in Allergy and Airway Diseases. <https://www.euforea.eu/crswnp>.
89. Steinke, J. W. & Borish, L. Chronic rhinosinusitis phenotypes. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **117**, 234–240 (2016).
90. Nadel, D. M., Lanza, D. C. & Kennedy, D. W. Endoscopically guided cultures in chronic sinusitis. *Am. J. Rhinol.* **12**, 233–241 (1998).
91. Soler, Z. M. *et al.* Antimicrobials and chronic rhinosinusitis with or without polyposis in adults: An evidenced-based review with recommendations. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 31–47 (2013).
92. Lin, J. W., Kacker, A., Anand, V. K. & Levine, H. Catheter- and antibiotic-related complications of ambulatory intravenous antibiotic therapy for chronic refractory rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* **19**, 365–369 (2005).
93. Fowler, K. C., Duncavage, J. A., Murray, J. J. & Tanner, S. Chronic sinusitis and intravenous antibiotic therapy: Resolution, recurrence, and adverse events. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S85 (2003).
94. Anand, V. *et al.* Intravenous antibiotics for refractory rhinosinusitis in nonsurgical patients: Preliminary findings of a prospective study. *Am. J. Rhinol.* **17**, 363–368 (2003).
95. Fokkens, W. J. *et al.* EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* **50**, 1–12 (2012).
96. Smith, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1539–1550 (2005).
97. Seresirikachorn, K., Khattiyawittayakun, L., Chitsuthipakorn, W. & Snidvongs, K. Antihistamines for treating rhinosinusitis: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled studies. *J. Laryngol. Otol.* **132**, 105–110 (2018).
98. Haye, R. The effect of cetirizine on symptoms and signs of nasal polyposis. *J. Laryngol. Otol.* **112**, 1042–1046 (1998).
99. Simons, F. E. R. Advances in H₁ -Antihistamines . *N. Engl. J. Med.* **351**, 2203–2217 (2004).
100. Yáñez, A. & Rodrigo, G. J. Intranasal corticosteroids versus topical H₁ receptor antagonists for the treatment of allergic rhinitis: A systematic review with meta-analysis. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **89**, 479–484 (2002).
101. Benninger, M. S. Intranasal corticosteroids vs oral H₁ receptor antagonists in allergic rhinitis: Systematic review of randomized control trials. *Am. J. Rhinol.* **13**, 158 (1999).
102. Di Lorenzo, G. *et al.* Randomized placebo-controlled trial comparing fluticasone aqueous nasal spray in mono-therapy, fluticasone plus cetirizine, fluticasone plus montelukast and cetirizine plus montelukast for seasonal allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 259–267 (2004).
103. Williams, P. V. A comparison of the efficacy of fluticasone propionate aqueous nasal spray and loratidine, alone and in combination, for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol.* **13**, 156–157 (1999).

104. Ratner, P. H. *et al.* Combination therapy with azelastine hydrochloride nasal spray and fluticasone propionate nasal spray in the treatment of patients with seasonal allergic rhinitis. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **100**, 74–81 (2008).
105. Succar, E. F., Turner, J. H. & Chandra, R. K. Nasal saline irrigation: a clinical update. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **9**, S4–S8 (2019).
106. Rudmik, L. *et al.* Topical therapies in the management of chronic rhinosinusitis: An evidence-based review with recommendations. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 281–298 (2013).
107. Thomas, W. W., Harvey, R. J., Rudmik, L., Hwang, P. H. & Schlosser, R. J. Distribution of topical agents to the paranasal sinuses: An evidence-based review with recommendations. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **3**, 691–703 (2013).
108. Craig, J. R., Palmer, J. N. & Zhao, K. Computational fluid dynamic modeling of nose-to-ceiling head positioning for sphenoid sinus irrigation. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **7**, 474–479 (2017).
109. Wilson, A. M., O’Byrne, P. M. & Parameswaran, K. Leukotriene receptor antagonists for allergic rhinitis: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* **116**, 338–344 (2004).
110. Zhang, N. *et al.* Mucosal tissue polyclonal IgE is functional in response to allergen and SEB. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **66**, 141–148 (2011).
111. Gevaert, P. *et al.* Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1–8 (2013).
112. Pinto, J. M. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of anti-IgE for chronic rhinosinusitis. *Rhinology* **48**, 318–324 (2010).
113. Denburg, J. A., Sehmi, R. & Upham, J. Regulation of IL-5 receptor on eosinophil progenitors in allergic inflammation: Role of retinoic acid. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **124**, 246–248 (2001).
114. Bachert, C., Wagenmann, M., Hauser, U. & Rudack, C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 837–842 (1997).
115. Sahlstrand-Johnson, P., Ohlsson, B., von Buchwald, C., Jannert, M. & Ahlner-Elmqvist, M. A multi-centre study on quality of life and absenteeism in patients with CRS referred for endoscopic surgery. *Rhinology* **49**, 7 (2011).
116. Gevaert, P. *et al.* Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 989-995.e8 (2011).
117. Bachert, C. *et al.* Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **140**, 1024-1031.e14 (2017).
118. Laidlaw, T. M. *et al.* Dupilumab improves nasal polyp burden and asthma control in patients with CRSwNP and AERD. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **7**, 2462-2465.e1 (2019).
119. Bachert, C. *et al.* Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet* **394**, 1638–1650 (2019).
120. Bachert, C. *et al.* Effect of subcutaneous dupilumab on nasal polyp burden in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, 469–479 (2016).
121. Fokkens, W. J. *et al.* EUFOREA consensus on biologics for CRSwNP with or without asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **74**, 2312–2319 (2019).
122. Vaezi, M. F. *et al.* Proton pump inhibitor therapy improves symptoms in postnasal drainage. *Gastroenterology* **139**, 1887-1893.e1 (2010).

123. Choi, H. G. & Kong, I. G. The association between chronic rhinosinusitis and proton pump inhibitor use: a nested case–control study using a health screening cohort. *Sci. Rep.* **12**, 1–9 (2022).
124. Lund, V. The evolution of surgery on the maxillary sinus for chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **112**, 415–419 (2002).
125. Mickulicz, J. *Zur operativen Behandlung das Empyens der Highmorshohle*No Title. (1887).
126. Stennert, E. Rhino-frontal sinuseptotomy (RFS): A combined intra-extra nasal approach for the surgical treatment of severely diseased frontal sinuses. *Laryngoscope* **111**, 1237–1245 (2001).
127. Messerklinger, W. *Endoscopy of the Nose*. Urban & Schwarzenberg, Baltimore. (1978).
128. Vining, E. M. & Kennedy, D. W. The transmigration of endoscopic sinus surgery from Europe to the United States. *Ear, Nose Throat J.* **73**, (1994).
129. García, J. & Masegur, H. 2 . 17 Principles of Functional Endoscopic Sinus Surgery. 259–260.
130. Catalano, P. J. & Strouch, M. The minimally invasive sinus technique: Theory and practice. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **37**, 401–409 (2004).
131. Malte Erik Wigand. *Endoscopic Surgery of the Paranasal Sinuses and Anterior Skull Base*. (2019).
132. M Roth 1, D C Lanza, J Zinreich, D Yousem, K A Scanlan, D. W. K. Advantages and Disadvantages of Three-Dimensional Computed Tomography Untraoperative Localization for Functional Endoscopic Sinus Surgery. doi:DOI: 10.1288/00005537-199512000-00003.
133. Surgery, C., Surgery, C., Surgery, I., Endoscopic, F. & Surgery, S. COMPUTER-ASSISTED FUNCTIONAL ENDOSCOPIC SINUS SURGERY (C-A FESS) - A REVIEW. 1–4 (1998).
134. Chandy, Z., Ference, E. & Lee, J. T. Clinical Guidelines on Chronic Rhinosinusitis in Children. (2019).
135. Brietzke, S. E. *et al.* Clinical Consensus Statement : Pediatric Chronic Rhinosinusitis. (2014) doi:10.1177/0194599814549302.
136. Shin, K. S. *et al.* The role of adenoids in pediatric rhinosinusitis. (2008) doi:10.1016/j.ijporl.2008.07.016.
137. Berçin, A. S., Ural, A., Kutluhan, A. & Yurttas, V. Relationship Between Sinusitis and Adenoid Size in Pediatric Age Group. **116**, 550–553 (2007).
138. Brietzke, S. E. & Brigger, M. T. Adenoidectomy outcomes in pediatric. (2008) doi:10.1016/j.ijporl.2008.07.008.
139. Bettadahalli, V. & Chakravarti, A. Post-adenoidectomy quality of life in children with refractory chronic rhinosinusitis. 1–6 (2017) doi:10.1017/S002221511700113X.
140. Dufour, D., Leung, V. & Lévesque, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod. Top.* **22**, 2–16 (2010).
141. Попов Г., Гергова Р., П. Д. Бактериалните биофилми участват в патогенезата на хроничните инфекции. *Списание МД* Стр. 72-76 (2021).
142. Wong, A. C. L. Biofilms in Food Processing Environments. *J. Dairy Sci.* **81**, 2765–2770 (1998).
143. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J. & Lombó, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front. Microbiol.* **9**, 1–18 (2018).
144. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).
145. Fletcher, M. Bacterial biofilms and biofouling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 302–306 (1994).

146. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science (80-.)*. **284**, 1318–1322 (1999).
147. Reid, G. Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**, 223–226 (1999).
148. 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).
149. Hänsch, G. M. Host Defence against Bacterial Biofilms: “Mission Impossible”? *ISRN Immunol.* **2012**, 1–17 (2012).
150. Pugliese, G. & Favero, M. S. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms The Success of Routine , Voluntary Inpatient HIV Testing. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**, 352 (2002).
151. File:OSC Microbio 02 03 Biofilms.jpg - Wikimedia Commons.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:OSC_Microbio_02_03_Biofilms.jpg.
152. Vlastarakos, P. V., Nikolopoulos, T. P., Maragoudakis, P., Tzagaroulakis, A. & Ferekidis, E. Biofilms in ear, nose, and throat infections: How important are they? *Laryngoscope* **117**, 668–673 (2007).
153. Ward, J. P. *et al.* Early development and quorum sensing in bacterial biofilms. *J. Math. Biol.* **47**, 23–55 (2003).
154. Dickschat, J. S. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 343–369 (2010).
155. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**, 1140–1154 (2002).
156. Chole, R. A. & Faddis, B. T. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **128**, 1129–1133 (2002).
157. Post, J. C., Hiller, N. L., Nistico, L., Stoodley, P. & Ehrlich, G. D. The role of biofilms in otolaryngologic infections: Update 2007. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **15**, 347–351 (2007).
158. Govan, J. R. W. & Deretic, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**, 539–574 (1996).
159. Chávez De Paz, L. E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *J. Endod.* **38**, 318–323 (2012).
160. Høiby, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog. Dis.* **70**, 205–211 (2014).
161. Veening, J. W., Smits, W. K. & Kuipers, O. P. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 193–210 (2008).
162. Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 199–210 (2008).
163. 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).
164. 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).
165. 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).
166. Heath, J. *et al.* Chronic Rhinosinusitis in Children : Pathophysiology , Evaluation , and Medical Management. (2018).

167. Elwany, S., Omran, A. & Mandour, Z. Relationship between bacteriology of the adenoid core and middle meatus in children with sinusitis. 279–281 (2011) doi:10.1017/S0022215110002586.
168. Zuliani, G. *et al.* Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. (2006) doi:10.1016/j.ijporl.2006.05.002.
169. Lillehoj, E. P., Kato, K., Lu, W. & Kim, K. C. *Cellular and Molecular Biology of Airway Mucins. International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 303 (Elsevier, 2013).
170. Ali, M. S. & Pearson, J. P. Upper airway mucin gene expression: A review. *Laryngoscope* **117**, 932–938 (2007).
171. Allen, A., Hutton, D. A. & Pearson, J. P. The MUC2 gene product: A human intestinal mucin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 797–801 (1998).
172. Thornton, D. J., Rousseau, K. & McGuckin, M. A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 459–486 (2008).
173. McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P. & Florin, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 265–278 (2011).
174. Symmes, B. A., Stefanski, A. L., Magin, C. M. & Evans, C. M. Role of mucins in lung homeostasis: regulated expression and biosynthesis in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 1–13 (2018).
175. Bonser, L. R. & Erle, D. J. Airway mucus and asthma: The role of MUC5AC and MUC5B. *J. Clin. Med.* **6**, (2017).
176. Voynow, J. A. & Menger, B. K. R. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* **135**, 505–512 (2009).
177. Roy, M. G. *et al.* Muc5b is required for airway defence. *Nature* **505**, 412–416 (2014).
178. EuroQoL Quality of Life Scale (EQ-5D). <https://instruct.uwo.ca/kinesiology/9641/Assessments/Biological/EQ-5D.html>.
179. Klimek, L. *et al.* Visual analogue scales (VAS) - Measuring instruments for the documentation of symptoms and therapy monitoring in case of allergic rhinitis in everyday health care. *Allergo J.* **26**, 36–47 (2017).
180. Lund, V. J. & Kennedy, D. W. Staging for Rhinosinusitis. *Otolaryngol. Neck Surg.* **117**, S35–S40 (1997).
181. Psaltis, A. J., Li, G., Vaezaefshar, R., Cho, K. S. & Hwang, P. H. Modification of the Lund-Kennedy endoscopic scoring system improves its reliability and correlation with patient-reported outcome measures. *Laryngoscope* **124**, 2216–2223 (2014).
182. 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).
183. Araujo, E., Dall, C., Cantarelli, V., Pereira, A. & Mariante, A. R. Microbiology of middle meatus in chronic rhinosinusitis. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **73**, 549–555 (2007).
184. Iino, Y., Yuasa, R., Kaneko, Y., Takasaka, T. & Kawamoto, K. Prognosis and endotoxin contents in middle ear effusions in cases after acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* **104**, 85–89 (1987).
185. DeMaria, T. F., Prior, R. B., Briggs, B. R., Lim, D. J. & Birck, H. G. Endotoxin in middle-ear effusions from patients with chronic otitis media with effusion. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 15–17 (1984).
186. Попов Г., Гергова Р., П. Д. Бактериални биофилми и свързана с тях патология в оториноларингологията. *Списание МД 1. Попов Г*, Стр. 92-96 (2022).
187. Fux, C. A., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. & Costerton, J. W. Bacterial biofilms: A diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **1**, 667–683 (2003).

188. Hall-Stoodley, L. *et al.* Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 127–145 (2012).
189. Aly, B. H., Hamad, M. S., Mohey, M. & Amen, S. Polymerase Chain Reaction (PCR) Versus Bacterial Culture in Detection of Organisms in Otitis Media with Effusion (OME) in Children. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **64**, 51–55 (2012).
190. Wikipedia - Scanning electron microscope. https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope.
191. Oldstone, M. B. A. & Dixon, F. J. Inhibition of antibodies to nuclear antigen and to DNA in New Zealand mice infected with lactate dehydrogenase virus. *Science (80-.)*. **175**, 784–786 (1972).
192. Winther, B., Brofeldt, S., And, B. C. & Mygind, N. Light and scanning electron microscopy of nasal biopsy material from patients with naturally acquired common colds. *Acta Otolaryngol.* **97**, 309–318 (1984).
193. Saunders, J., Murray, M. & Alleman, A. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: Scanning electron microscopy findings. *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.* **32**, 32–37 (2011).
194. Woo, J. H. *et al.* Comparison of tonsillar biofilms between patients with recurrent tonsillitis and a control group. *Acta Otolaryngol.* **132**, 1115–1120 (2012).
195. Parsa, K. *et al.* Demonstration of bacterial biofilms in culture-negative silicone stent and jones tube. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* **26**, 426–430 (2010).
196. Saylam, G., Tatar, E. Ç., Tatar, I., Özdek, A. & Korkmaz, H. Association of adenoid surface biofilm formation and chronic otitis media with effusion. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **136**, 550–555 (2010).
197. Kania, R. E. *et al.* Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope* **118**, 128–134 (2008).
198. Saafan, M. E. & Ibrahim, W. S. Role of bacterial biofilms in idiopathic childhood epistaxis. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* **270**, 909–914 (2013).
199. 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).
200. 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).
201. Dassanayake, R. P. *et al.* Identification of a reliable fixative solution to preserve the complex architecture of bacterial biofilms for scanning electron microscopy evaluation. *PLoS One* **15**, 1–15 (2020).
202. Wikipedia - Transmission electron microscopy. https://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy.
203. Ferguson, B. J. & Stolz, D. B. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* **19**, 452–457 (2005).
204. Wikipedia - Confocal microscopy. https://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_microscopy.
205. Wikipedia - Micrograph. <https://en.wikipedia.org/wiki/Micrograph>.
206. Zeiss. Education in Microscopy and Digital Imaging. <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html?fbclid=IwAR1bSxD8g-aKyNkuEqr2xOuu1HD1DEm5JdM4EwgzE0sFDtkSNHix49NyybU>.
207. Wikipedia - ELISA. <https://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>.

208. Abcam. ELISA principles and types. <https://www.abcam.com/kits/elisa-principle>.
209. Ferrier, C. M. *et al.* Comparison of immunohistochemistry with immunoassay (ELISA) for the detection of components of the plasminogen activation system in human tumour tissue. *Br. J. Cancer* **79**, 1534–1541 (1999).
210. 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).
211. 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).
212. Wikipedia - Immunohistochemistry. <https://en.wikipedia.org/wiki/Immunohistochemistry>.
213. Bahrami, A., Truong, L. D. & Ro, J. Y. Undifferentiated tumor: True identity by immunohistochemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**, 326–348 (2008).
214. 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).
215. Wu, X. *et al.* Histologic characteristics and mucin immunohistochemistry of cystic fibrosis sinus mucosa. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **137**, 383–389 (2011).
216. 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).
217. 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).
218. Luo, Q. *et al.* Human neutrophil elastase induces MUC5AC overexpression in chronic rhinosinusitis through tumour necrosis factor- α converting enzyme. *Acta Otolaryngol.* **136**, 641–648 (2016).
219. Wikipedia - Polymerase chain reaction. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.
220. 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).
221. 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).
222. Stern, S. *et al.* Bacteriology of the middle meatus in chronic rhinosinusitis with and without polyposis. *Orl* **78**, 223–231 (2016).
223. 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).
224. 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).
225. Fornazieri, M. A. *et al.* Fratura de Ossos Nasais : Uma Análise Epidemiológica Fracture of Nasal Bones : An Epidemiologic Analysis. *Management* 498–501 (2008).
226. Национален статистически институт. <https://nsi.bg/bg/content/3368/начин-на-живот>.
227. Popov, G. *et al.* Analysis of Bacterial Biofilm Formation and MUC5AC and MUC5B Expression in Chronic Rhinosinusitis Patients. (2023).
228. Hutcherson, J. A., Scott, D. A. & Bagaitkar, J. Scratching the surface - Tobacco-induced bacterial biofilms. *Tob. Induc. Dis.* **13**, 1–6 (2015).
229. 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).
230. 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).
 231. Smith, K. A., Orlandi, R. R. & Rudmik, L. Cost of adult chronic rhinosinusitis: A systematic review. *Laryngoscope* **125**, 1547–1556 (2015).
 232. Marcus, S., DelGaudio, J. M., Roland, L. T. & Wise, S. K. Chronic Rhinosinusitis: Does Allergy Play a Role? *Med. Sci.* **7**, 30 (2019).
 233. 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).
 234. 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).
 235. 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).
 236. 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).
 237. Caldara, M. *et al.* Mucin biopolymers prevent bacterial aggregation by retaining cells in the free-swimming state. *Curr. Biol.* **22**, 2325–2330 (2012).
 238. Frenkel, E. S. & Ribbeck, K. Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 332–338 (2015).
 239. 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).
 240. Co, J. Y. *et al.* Mucins trigger dispersal of Pseudomonas aeruginosa biofilms. *npj Biofilms Microbiomes* **4**, 1–8 (2018).
 241. Danielsen, K. A. *et al.* Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis; distribution and prevalence. *Acta Otolaryngol.* **36**, 109–112 (2015).
 242. 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).
 243. Zhang, Z. *et al.* Clinical factors associated with bacterial biofilm formation in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **144**, 457–462 (2011).
 244. Zhang, Z. *et al.* Biofilm-forming bacteria and quality of life improvement after sinus surgery. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **5**, 643–649 (2015).
 245. 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).
 246. Elwany, S., Gamea, M. A. & Talaat, I. Passive smoking induces nasal biofilms in children. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **146**, 110755 (2021).
 247. Chen, H. H. *et al.* Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis and their relationship with inflammation severity. *Auris Nasus Larynx* **39**, 169–174 (2012).
 248. Singhal, D., Foreman, A., Bardy, J. J. & Wormald, P. J. Staphylococcus aureus biofilms: Nemesis of endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* **121**, 1578–1583 (2011).
 249. Groneberg, D. A. *et al.* Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma. *Histopathology* **40**, 367–373 (2002).

250. Kreda, S. M., Davis, C. W. & Rose, M. C. CFTR, Mucins, and Mucus Obstruction in Cystic Fibrosis. (2012).
251. 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).
252. 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).
253. Janyt, B. & Gallup, M. Mucin gene expression in rat airways following infection and irritation. **181**, 1–8 (1991).
254. Cortijo, J. *et al.* Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur. Respir. J.* **37**, 244–254 (2011).
255. Kim, H. K. *et al.* Increased expression of hCLCA1 in chronic rhinosinusitis and its contribution to produce MUC5AC. *Laryngoscope* **126**, E347–E355 (2016).
256. 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).
257. 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).
258. 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).
259. 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).
260. 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).
261. 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).
262. 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.
263. 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).
264. 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).
265. 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).
266. Sakakura, Y. MUC2 Mucin Gene Expression in the Nose and Maxillary Sinus. **16**, 391–395 (1995).
267. 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).
268. 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).
269. 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).
270. Boonla, C. *et al.* Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* **98**, 1438–1443 (2003).

271. 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).
272. 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).
273. 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).
274. 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).
275. Paulsen, F., Langer, G., Hoffmann, W. & Berry, M. Human lacrimal gland mucins. *Cell Tissue Res.* **316**, 167–177 (2004).
276. 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).
277. 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).
278. 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).
279. Tateda, K. *et al.* Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1930–1933 (2001).
280. 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).
281. 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).
282. 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).
283. 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).
284. 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).
285. Hughes, G. & Webber, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 2237–2246 (2017).
286. 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).
287. 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).
288. Mukerji, S. S. *et al.* Probiotics as adjunctive treatment for chronic rhinosinusitis: A randomized controlled trial. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **140**, 202–208 (2009).
289. 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).
290. 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).
291. 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).
 292. 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).
 293. 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).
 294. 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).
 295. 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).
 296. 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).
 297. 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).
 298. 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).
 299. Kofonow, J. M. & Adappa, N. D. In vitro antimicrobial activity of sinusurfTM. *Orl* **74**, 179–184 (2012).
 300. 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).
 301. 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).
 302. 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).
 303. Shields, R. C. *et al.* Efficacy of a Marine Bacterial Nuclease against Biofilm Forming Microorganisms Isolated from Chronic Rhinosinusitis. *PLoS One* **8**, (2013).