BIOFILM U ANTROKOANALNIH POLIPA

Poje, Gorazd

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:487714

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Gorazd Poje

BIOFILM U ANTROKOANALNIH POLIPA

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Drago Prgomet, dr. med.

Rad ima 81 list.

Umjesto predgovora, zahvaljujem osobama koje su pomogle u ostvarenju ove doktorske disertacije i bez kojih njezina izrada ne bi bila moguća:

- mentoru prof. dr. sc. Dragi Prgometu,
- dr. sc. Antoniji Jakovčević i dr. Zdenki Hutinec iz Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb,
- akademiku Svetozaru Musiću i dr. sc. Miri Ristić iz Zavoda za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković,
- obitelji.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. ANTROKOANALNI POLIP 4
1.2. BAKTERIJSKI BIOFILM 9
1.3. PRIKAZ PROBLEMA 13

2. HIPOTEZA 15

3. CILJ ISTRAŽIVANJA 16

4. MATERIJALI I METODE 17

4.1. USTROJ STUDIJE 17
4.2. MATERIJAL 17
4.3. METODE 19
4.3.1. Elektronska mikroskopija 22
4.3.2. Statističke metode 22

5. REZULTATI 24

5.1. OPIS ISTRAŽIVAČKOG UZORKA 24
5.1.1. Demografska obilježja ispitanika 24
5.1.2. Lokalizacija ACP-a s obzirom na stranu 25
5.1.3. Proširenost ACP-a 25
5.2. PRISUTNOST BIOFILMA I HISTOPATOLOŠKI NALAZ UZORKA SLUZNICE 26
5.2.1. Prisutnost biofilma u ACP-a 26
5.2.2. Prisutnost biofilma na sluznici maksilarnog sinusa 27
5.2.3. Histopatološki nalaz uzoraka sluznice maksilarnog sinusa 30
5.3. NALAZ MIKROBIOLOŠKOG OBRISKA I UZROČNIKA 31
5.3.1. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u kavumu 31
5.3.2. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u maksilarnom sinusu 32
5.4. KORELACIJE NALAZA BIOFILMA S HISTOPATOLOŠKIM PROMJENAMA 33
5.4.1. Korelacije nalaza biofilma kod bolesnika s ACP-om 33
5.4.2. Korelacije nalaza biofilma kod ispitanika kontrolne skupine 35
5.5. KORELACIJE NALAZA BIOFILMA S MIKROBIOLOŠKIM UZROČNICIMA 36
5.5.1. Korelacije nalaza biofilma s mikrobiološkim uzročnicima u kavumu 36
5.5.2. Korelacije nalaza biofilma s mikrobiološkim uzročnicima u maksilarnom sinusu 37
5.6. KORELACIJE MIKROBIOLOŠKIH UZROČNIKA S HISTOPATOLOŠKIM PROMJENAMA 39
5.6.1. Korelacije mikrobioloških uzročnika u kavumu s histopatološkim promjenama 39
5.6.2. Korelacije mikrobioloških uzročnika u maksilarnom sinusu s histopatološkim promjenama 40
5.6.3. Korelacije mikrobioloških uzročnika dviju lokalizacija 41
5.7. UNIVARIJANTNA I MULTIPLA LOGISTIČKA REGRESIJA 42

6. RASPRAVA 47

6.1. DEMOGRAFSKA OBILJEŽJA ISPITANIKA 47

6.2. LOKALIZACIJA POLIPA S OBZIROM NA STRANU 47
6.3. PROŠIRENOST ACP-A....48
6.4. PRISUTNOST BIOFILMA I HISTOPATOLOŠKI NALAZ UZORKA SLUZNICE 48
6.4.1. Prisutnost biofilma u ACP-u 48
6.4.2. Prisutnost biofilma na sluznici maksilarnog sinusa....49
6.4.3. Histopatološki nalaz uzoraka sluznice maksilarnog sinusa i biofilm....51
6.5. NALAZ MIKROBIOLOŠKOG OBRISKA I UZROČNIKA 53
6.5.1. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u kavumu 53
6.5.2. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u maksilarnom sinusu 54
6.6. KORELACIJE NALAZA BIOFILMA S HISTOPATOLOŠKIM PROMJENAMA 56
6.7. KORELACIJE NALAZA BIOFILMA S MIKROBIOLOŠKIM UZROČNICIMA....56
6.8. UNIVARIJANTNA I MULTIPLA LOGISTIČKA REGRESIJA 58
6.9. KLINIČKE IMPLIKACIJE BIOFILM POZITIVNOG KRONIČNOG RINOSINUITISA....59
6.10. OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA....61

7. ZAKLJUČCI 62

8. SAŽETAK 63

9. SUMMARY....65

10. LITERATURA 67

11. ŽIVOTOPIS 78

12. PRILOZI 81

Popis kratica

RS	rinosinuitis
ESS	endoskopska operacija sinusa (engl. endoscopic sinus surgery)
KRS	kronični rinosinuitis
CRSsNP	kronični rinosinuitis bez nosnih polipa (engl. chronic rhinosinusitis without nasal polyps)
CRSwNP	kronični rinosinuitis s nosnim polipima (engl. chronic rhinosinusitis with nasal polyps)
DNP	difuzna nosna polipoza
ACP	antrokoanalni polip
CT	kompjutorizirana tomografija (engl. computed tomography)
ACP	antrokoanalni polip
MR	magnetska rezonanca
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy)

1. Uvod

Rinosinuitis (RS), skupina poremećaja koju karakterizira upala sluznice nosa i paranazalnih sinusa, predstavlja velik javnozdravstveni problem. Njegove su prevalencija i incidencija u stalnom porastu, a za njegovo liječenje troše se velika sredstva (1, 2). Koliko je RS čest, govori podatak da se javlja u 1 od 7 odraslih osoba u Sjedinjenim Američkim Državama, što znači da tamo pogađa više od 32 milijuna ljudi svake godine (3). Godišnji izravni troškovi SAD-a vezani uz rinosinuitis premašuju 11 milijardi dolara, a uključuju i više od 500.000 kirurških zahvata na paranazalnim sinusima (4, 5). Procijenjeni neizravni troškovi samo za bolesnike koji se odluče podvrgnuti endoskopskoj operaciji sinusa (ESS) premašuju 13 milijardi dolara (6). RS je peta najčešća dijagnoza za koju se propisuje antibiotik (4).

Kronični rinosinuitis (KRS) heterogeni je upalni poremećaj, tj. klinički sindrom karakteriziran perzistentnom simptomatskom upalom sluznice nosa i paranazalnih sinusa koja traje duže od 12 tjedana, s prisutna dva fenomena: upalom i pregradnjom tkiva (4, 7, 8). KRS je jedna od najčešćih kroničnih bolesti/poremećaja, a pogađa oko 10% svjetske populacije (9). Global Allergy and Asthma Network of Excellence - GALEN objavila je prvu multicentričnu studiju prevalencije KRS-a koja se temeljila na 56.000 upitnika u 19 centara iz 12 europskih zemalja, a slučajni uzorak upućen je na klinički pregled kako bi se potvrdila dijagnoza (10, 11). Ispitivanjem je zaključeno da prevalencija KRS-a u Europi iznosi 10,9%, tj. između 6,9 i 27,1% u različitim europskim gradovima. U SAD-u je prevalencija još veća. Tamo KRS zahvaća do 16% stanovništva. Među svim bolesnicima s KRS-om u SAD-u oko 20–33% njih ima KRS-a s nosnim polipima, 60–65% ima KCR bez nosnih polipa, a 8–12% alergijski gljivični sinuitis (7, 12, 13). Treba napomenuti da mnogi pacijenti s KRS-om nemaju dijagnozu potvrđenu radiološkim ili endoskopskim pregledom (14).

Unatoč brojnim i značajnim istraživanjima, etiologija KRS-a i dalje je slabo razumljiva, a rasprava o potencijalnim ulogama mikrobnih zajednica nije riješena. Smatra se da je etiopatogeneza multifaktorijalna. U nju su uključeni: alergija i ostali

imunološki poremećaji, anatomske abnormalnosti, mukocilijarna disfunkcija, kongenitalne bolesti, superantigeni, kolonizirajući fungi, odontogene infekcije, metaboličke abnormalnosti, trajna infekcija, čimbenici okoliša, bronhijalna astma, intolerancija na salicilate, gastroezofagusni refluks, a u novije vrijeme i biofilm (4, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). Lokalni čimbenici uključuju sinonazalne anatomske nepravilnosti, jatrogena stanja poput ožiljaka i priraslica od prethodne operacije sinusa, neoplazme i prisutnosti stranog tijela (23). Nadalje, manji broj slučajeva KRS-a povezan je s genetskim (npr. Kartagenerov sindrom ili cistična fibroza), autoimunim poremećajima (npr. Wegenerova granulomatoza) i imunodeficijencijama (npr. HIV infekcija) i može se reći da KRS predstavlja lokalni simptom sistemske bolesti, a obično pokazuje minimalno specifičniji histološki i klinički tijek (20).

KRS negativno utječe na kvalitetu života. Njegov je učinak na kvalitetu života jednak ili veći u odnosu na kronični bronhitis, astmu, ulkusnu bolest, kroničnu opstruktivnu bolest pluća ili kongestivno zatajenje srca (4, 16, 24, 25).

U KRS uključeni su različiti klinički fenotipovi i upalni endotipovi, a najčešće se dijeli na dva glavna klinička fenotipa koji su temeljeni na prisutnosti ili odsutnosti nosnih polipa pri endoskopskom pregledu nosa:

1. kronični rinosinuitis bez nosnih polipa (engl. CRSsNP - chronic rhinosinusitis without nasal polyps), koji je prevladavajući,

2. kronični rinosinuitis s nosnim polipima (engl. CRSwNP - chronic rhinosinusitis with nasal polyps), kod kojeg se u nosnim i sinusnim šupljinama javljaju polipozne mase, i koji je rjeđi (26, 27).

Za ovaj drugi fenotip u nas je uvriježen naziv *difuzna nosna polipoza* (DNP). Nedavna otkrića o pregradnji tkiva potvrđuju ovu razliku u fenotipovima KRS-a i otkrivaju da postoje značajne razlike između fenotipova. Histološki, CRSsNP karakterizira pretežno neutrofilna upala, dok DNP karakterizira pretežno eozinofilna upala (28). CRSsNP karakterizira fibroza sluznice i bazalne membrane, dok DNP karakterizira važan edem s taloženjem albumina i razvojem pseudocista. Razlikovanje tipova upale na temelju T pomoćnih stanica omogućuje klasificiranje u

takozvane endotipove KRS-a unutar kliničkih fenotipova koji se konačno mogu koristiti za definiranje inovativnih terapijskih ciljeva i njihovu primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi (7, 29). Iako se klinički simptomi između ova dva fenotipa KRS-a preklapaju, kongestija nosa i olfaktorne smetnje nešto su tipičnije povezane s DNP-om, dok je CRSsNP nešto tipičnije karakteriziran rinorejom i osjećajem boli, pritiska ili nelagode u području lica (30).

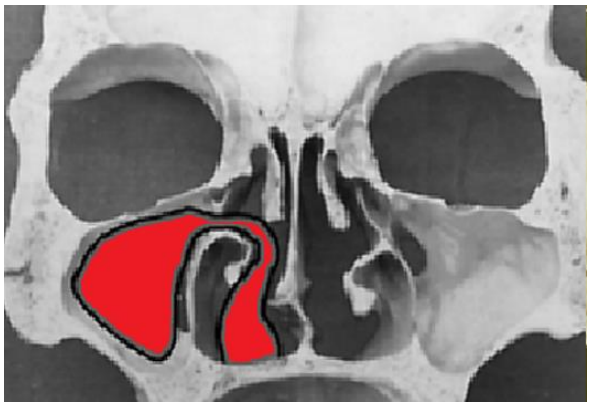
Kronični rinosinuitis, bez nosnih polipa ili s njima, definira se kao upala nosa i paranazalnih sinusa koja traje 12 tjedana ili dulje. Karakterizirana je s dva ili više simptoma, od kojih jedan treba biti nosna opstrukcija ili pojačana sekrecija (prednja i/ili stražnja), a drugi facijalna bol/pritisak i/ili poremećaj osjeta mirisa (30, 31, 32). Ostali simptomi uključuju gnoj u nosnoj šupljini, febrilitet, bol u području zuba gornje čeljusti, halitozu, umor, kašalj, bol, pritisak ili osjećaj punoće u uhu, glavobolju, umor i kašalj (33, 34). Ti simptomi trebali bi se potkrijepiti endoskopskim znakovima bolesti i/ili promjenama na CT-u. Endoskopski znakovi bolesti najčešće uključuju mukopurulentni sekret primarno iz srednjeg nosnog hodnika i/ili nosne polipe i/ili edem/nosnu opstrukciju, prije svega u srednjem nosnom hodniku. CT promjene odnose se na promjene sluznice u ostiomeatalnom kompleksu i/ili sinusima (16, 35). Uz lokalne simptome kod KRS-a su vrlo često prisutni loša kvaliteta sna i teški umor (4).

Treba napomenuti da je endoskopski pregled nosa jako važan za dijagnostičku točnost i da se treba koristiti kao rani dijagnostički alat. Dijagnostička endoskopija može pomoći u smanjenju uporabe CT-a, a time i smanjenju troškova te izloženosti zračenju (16, 35). Nadalje, standardni rendgenogrami sinusa se, zbog niske osjetljivosti i specifičnosti, kod rinosinuitisa ne preporučuju ni kao dijagnostički kriterij ni kao screening alat, a to je u Hrvatskoj još uvijek čest slučaj. Osjetljivost i specifičnost u najboljem slučaju iznose 69% i 64% (36).

1.1. Antrokoanalni polip

Antrokoanalni polip (ACP) je unilateralni benigni tumor sinusa i nosa koji potječe iz sluznice maksilarnog sinusa u kojem raste, širi se u nosnu šupljinu i proteže se do koane ili dalje do nazofarinksa (37, 38, 39). Predstavlja izolirani entitet koji također pripada u KRS, ali ne pripada ni u jednu od ranije navedene dvije skupine, a i puno se rjeđe javlja od njih. On čini samo 3-6% svih slučajeva polipa (31, 40, 41). DNP i ACP svojim se značajkama, poput kroničnog, rekurentnog tijeka bolesti i otpornosti na konzervativnu terapiju, uklapaju u profil kroničnih infekcija povezanih s bakterijskim biofilmom (16).

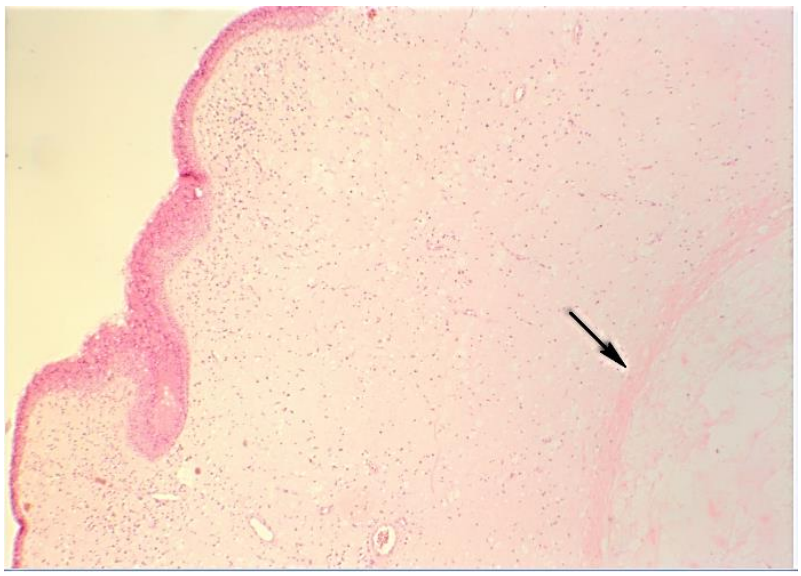
ACP se, za razliku od DNP-a, uvijek javlja na istom mjestu, u maksilarnom sinusu. Palfyn je prvi 1753. godine izvijestio o slučaju ACP-a, Zuckerkandl ga je 1891. godine prvi opisao, a Killian je 1906. godine razlučio ACP od DNP-a te se po njemu naziva i Killianovim polipom (42, 43, 44). ACP se javlja solitarno u 1-4% populacije. Nadalje, ACP čini samo 5% svih polipa u nosu (45). Bisagastog je oblika i sastoji se od dijela u maksilarnom sinusu koji može biti cističan, peteljke te dijela u nosnoj šupljini i epifarinksu. Kad svojim rastom ispuni sinus, probija stijenku sinusa gdje je ona najslabija, a to je područje fontanele. Kroz fontanelu dalje raste u nosnoj šupljini prema koani i kroz nju raste dalje u nosnom ždrijelu (Slika 1.1) (42, 46).



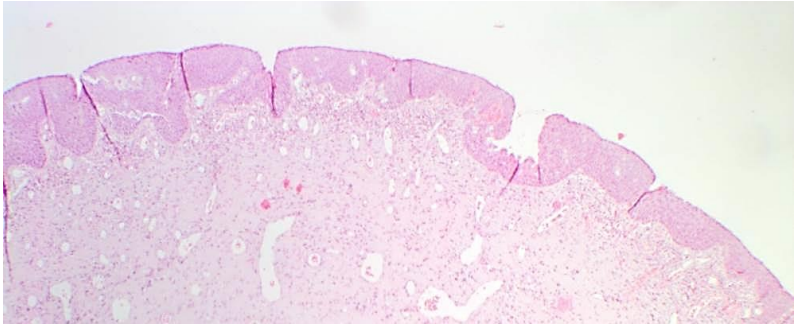
Slika 1.1. Shematski prikaz antrokoanalnog polipa.

Klinički se ACP primarno manifestira unilateralnom nosnom opstrukcijom. Ona može biti i bilateralna ako je ACP svojim rastom ispunio cijelo nosno ždrijelo (47). Bilateralna nosna opstrukcija javlja se u 20-25% slučajeva (42). Ostali simptomi

ACP-a su nosna sekrecija, hrkanje, osjećaj stranog tijela (nosni dio može flotirati), hiposmija, svrbež, opstruktivna apneja u snu te ev. epistaksa (48, 49, 50). Histološka građa ACP-a i DNP-a je slična. Površinu im čini respiratorni cilindrični epitel koji može metaplazirati u pločasti epitel. Polipi u DNP-u obično sadrže oskudne mukozne žlijezde, imaju miksoidnu stromu s varijabilnom količinom upalnih stanica u blizini njihove površine, a kod ACP-a su upalni infiltrat, mukozne žlijezde i broj eozinofila manji nego kod DNP-a (Slika 1.2. i 1.3) (41, 51, 52, 53).



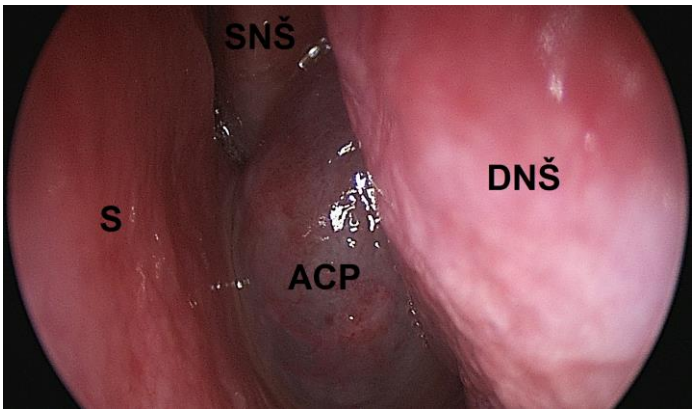
Slika 1.2. Antrokoanalni polip. Histološki polipozna tvorba građena od rahle, edematozne vezivne strome, prožeta oskudnim, pretežito kroničnim upalnim infiltratom. Na površini se nalazi pravilni, višeredni cilindrični epitel s trepetljikama. U edematoznoj vezivnoj stromi vidljiva je pseudocistična šupljina prožeta rahlim fibrinom (strelica) (HE x 40).



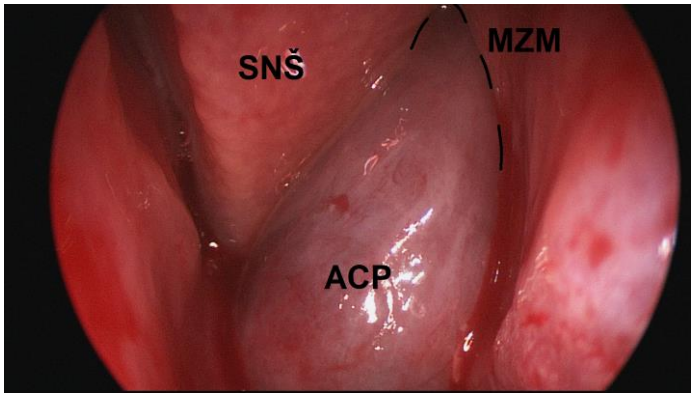
Slika 1.3. Antrokoanalni polip s metaplastičnim pločastim epitelom na površini. Subepitelno vezivna stroma sa sitnim krvnim žilama te cistična područja (HE x 100).

ACP se najčešće javlja u mlađoj životnoj dobi, tj. između 20. i 30. godine života, a DNP se obično javlja iza 40. godine života (42). Dok se DNP uvijek javlja obostrano (obično počinje u području ostiomeatalnog kompleksa), kod ACP-a je to iznimno rijetko. ACP je u pravilu jednostrana bolest jer je do sada u znanstvenoj literaturi na engleskom jeziku opisano 12 slučajeva (39, 54).

Dijagnoza ACP-a u velikoj je mjeri klinička, a potvrđuje se radiološki. Standard u dijagnostici ACP-a predstavlja endoskopski pregled nosa (slike 1.4. i 1.5), a dijagnoza se potvrđuje CT-om nosa i sinusa (42, 55, 56).

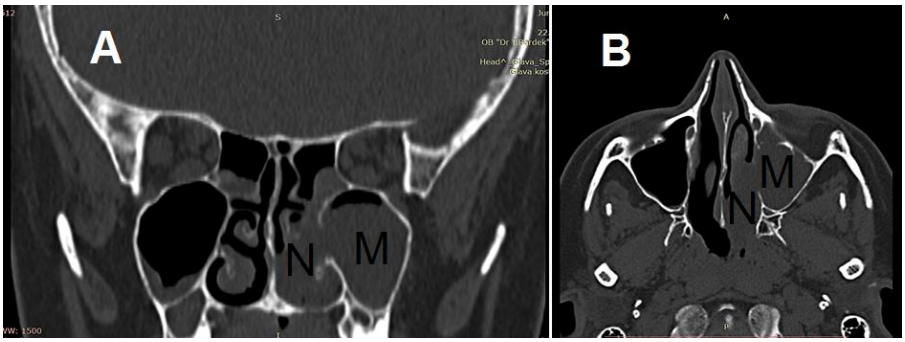


Slika 1.4. Endoskopska slika ACP-a u lijevom nosnom kavumu. (S – septum, DNŠ – donja nosna školjka, SNŠ – srednja nosna školjka)

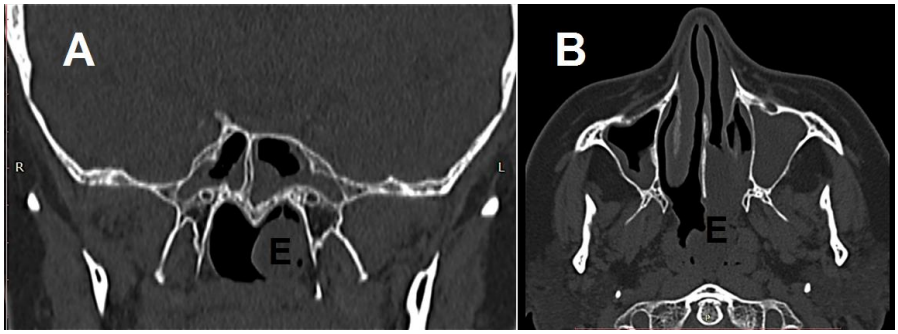


Slika 1.5. Endoskopska slika izlazišta ACP-a iz lijevog maksilarnog sinusa (isprekidanom crtom označen je defekt medijalnog zida maksilarnog sinusa kroz koji je probio u kavum). (SNŠ – srednja nosna školjka, MZM – medijalni zid maksilarnog sinusa)

CT obično pokazuje mekotkivnu tvorbu koja ispunjava maksilarni sinus, proteže se u nosni kavum gdje poglavito opacificira srednji nosni hodnik te ekstenziju tvorbe kroz koanu u epifarinks (slike 1.6. i 1.7) (48, 57).



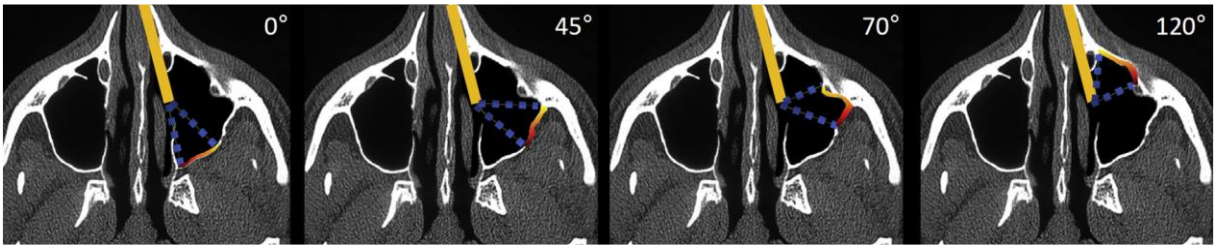
Slika 1.6. CT sinusa na kojoj je vidljiv ACP. A – koronalni presjek, B – aksijalni presjek. (M – dio ACP-a u maksilarnom sinusu, N – dio ACP-a u nosnoj šupljini)



Slika 1.7. CT sinusa na kojoj je vidljiv ACP u epifarinksu. A – koronalni presjek, B – aksijalni presjek. (E – dio ACP-a u epifarinksu)

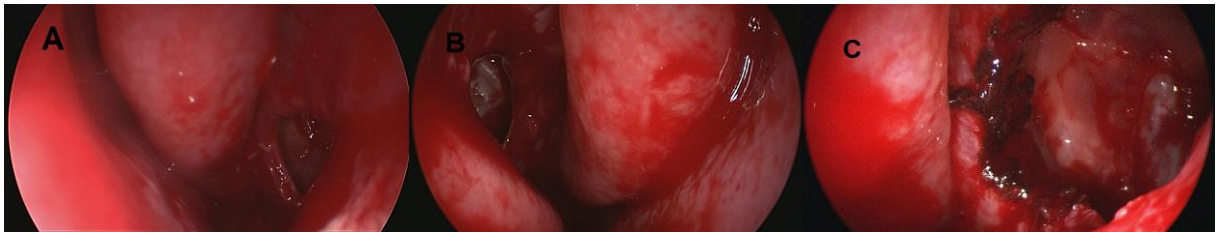
ACP se, za razliku od DNP-a, liječi isključivo kirurški (58). Postoji više kirurških tehnika, a najpoznatija je nekoć bila ona po Caldwell-Lucu (otvaranje maksilarnog sinusa kroz fosu kaninu sublabijalnim pristupom). Unazad 20-tak godina ACP-i se gotovo isključivo operiraju endonazalnim endoskopskim (ESS) pristupom jer je minimalno invazivan, tj. ACP se odstranjuje kroz nos, bez ikakvog vanjskog ili sublabijalnog reza, šavova ili ožiljaka (37, 42, 55, 59). Nakon što se pod kontrolom endoskopa prikaže ACP u nosnoj šupljini, taj dio se odstrani, a zatim se kroz defekt u fontaneli koji je sam ACP napravio odstrani i preostali dio iz maksilarnog sinusa. Ako

je potrebno, za endoskopski prikaz u maksilarnom sinusu koriste se optike pod različitim kutovima (slika 1.8) (48).



Slika 1.8. Shema koja prikazuje prikaz korištenja optika različitih kuteva gledanja (0°, 45°, 70°, 120°) unutar maksilarnog sinusa.

Ako je defekt u fontaneli premalen, prije samog odstranjivanja polipa iz maksilarnog sinusa prvo se defekt proširi, najviše na račun njegova stražnjeg ruba (Slika 1.9).

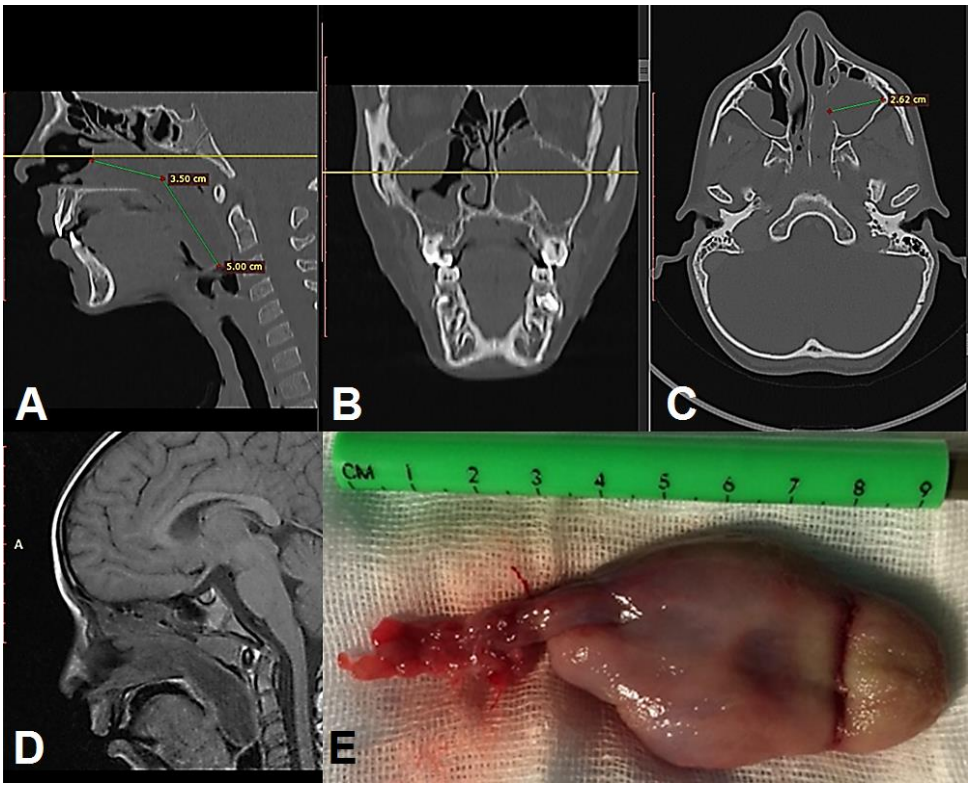


Slika 1.9. Stanje nakon odstranjenog ACP-a. Vidljivi otvori u području fontanele kroz koje se vidi lumen maksilarnog sinusa. A – lijevi nosni kavum, B – desni nosni kavum, C – proširen defekt u fontaneli desnog nosnog kavuma.

Osim nepostojanja reza i ožiljka, velika prednost endoskopskog pristupa jest i njegova sigurnost, a rijetke, manje komplikacije uključuju sinekije između donje školjke i septuma te epistaksu. Nadalje, tijekom endoskopske operacije mogu se ispraviti i nepovoljni anatomski čimbenici (hipertrofija donje školjke, deformacija septuma, bulozna srednja školjka, hipertrofija adenoida), koji potencijalno doprinose opstrukciji osteomeatalnog kompleksa. Definitivna dijagnoza ACP-a je patohistološka (slike 1.2. i 1.3) (55, 60, 61, 62).

Diferencijalnodijagnostički, kod ACP-a u obzir dolaze retencijske ciste, invertni papilom, mukocela maksilarnog sinusa, gljivična infekcija (fungal ball), juvenilni

angiofibrom, kapilarni hemangiom, glioma, meningoencefalocele i Tornwaldtove ciste (63, 64). Operirane bolesnike potrebno je poslije operacije redovito kontrolirati najmanje dvije godine jer se u tom periodu razvije 95% recidiva (47).



Slika 1.10. Najveći ACP koji je autor operirao, a dosezao je do epiglotisa. A – sagitalni, B – koronalni i C – aksijalni CT prikaz, D – sagitalni MR prikaz, E – odstranjeni ACP.

1.2. Bakterijski biofilm

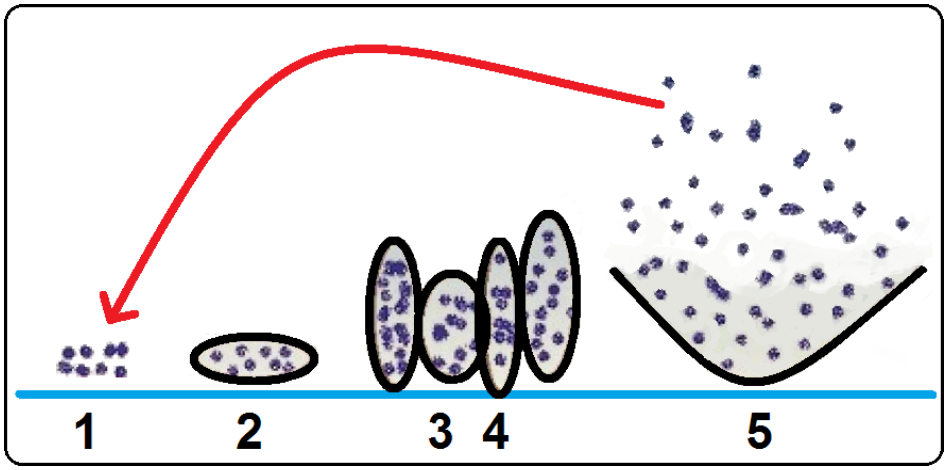
Brojna istraživanja govore o utjecaju bakterijskog biofilma u nastanku i održavanju kroničnih infektivnih bolesti. Vjeruje se da 99% svih bakterija postoji u formi biofilma, a samo 1% živi u tzv. planktonskom obliku, tj. bakterije žive planktonski samo prolazno, dok je veći dio njih u formi biofilma (65). Biofilm postoji jako dugo: njegove su mikrokolonije identificirane na fosilima i hidrotermalnim stijenama starim preko tri milijarde godina (66). Sam taj podatak govori koliko je bitan za preživljavanje bakterija. Pojam *biofilm*, uveden 1978. godine, danas se definira kao sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa

supstratom i međusobno, te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a pokazuju izmijenjen fenotip uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje ne uočavamo u planktonskih mikroorganizama (67, 68, 69). Prema podacima američkog Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, bakterijski biofilmovi sudjeluju u patogenezi do 85% svih ljudskih bakterijskih infekcija te 65% nosokomijalnih infekcija. Značajke su biofilm-infekcija perzistencija kroničnih infekcija, nemogućnost detekcije mikrobnog uzročnika standardnim mikrobiološkim tehnikama kultivacije u većini slučajeva, te neuspjeh antimikrobne terapije i imunološkog sustava domaćina u eradikaciji uzročnika (69, 70). Biofilmovi mogu dovesti do smanjenja aktivacije komplementa i osjetljivosti na fagocitozu od strane imunoloških stanica domaćina, kao i do rezistencije na humoralne aspekte imunološkog sustava, poput endogenih antimikrobnih peptida (71). Za bakterije kao što su *Pseudomonas species*, *Staphylococcus species* i *Haemophilus influenzae* poznato je da su sposobne prianjati na inertne materijale i živa tkiva, a upravo su one česti uzročnici rinosinuitisa (15, 71, 72, 73).

Bakterije, dakle, postoje u dva biološka oblika: u planktonskom obliku te unutar biofilma. Akutne bakterijske infekcije izazivaju planktonski oblici patogenih bakterija (69). Formiranje mikrobnog biofilma složeni je proces. U početku se sesilne planktonske bakterije vežu za neživu ili živu površinu i tvore mikrokolonije, a početno vezivanje je moguće zahvaljujući slabim van der Waalsovim silama (4, 23). Mnoga istraživanja pokazala su da se bakterije unutar biofilma u slučajevima kronične upale nalaze u biološki vrlo inertnom stanju, pa su im potrebe za prehrambenim tvarima i kisikom vrlo smanjene. Biofilm je važan za preživljavanje bakterija i nastaje kada okolina postane nepovoljna za bakterije. Njegovo stvaranje započinje sekrecijom malih signalnih molekula kojima bakterije međusobno komuniciraju, a naziva se *quorum sensing* (4). *Quorum sensing* još je jedan obrambeni mehanizam bakterija u biofilmu. Ovo jedinstveno svojstvo omogućava bakterijama da proizvode i izdvajaju određene signalne molekule koje služe za aktivaciju transkripcije određenih gena koji bi inače ostali tihi (27). Zahvaljujući kombiniranju trodimenzionalnih tehnika slikovnog prikaza, specifičnih molekularnih fluorescentnih tehnika bojenja, tehnike molekularnog izvjestitelja (engl. molecular reporter technology) i uspostavljanjem

mogućnosti kultiviranja biofilma, dokazano je da biofilm nije pasivna nakupina stanica koje su nabacane po površinama, već je riječ o strukturalno i dinamički kompleksnim sustavima (74, 75, 76, 77).

Biofilm čini trodimenzionalna mikrokolonija bakterija agregirana na podlogu koja je čvrsto povezana matriksom. Matriks je građen od polisaharida, proteina, lipida i izvanstanične DNK, a proizvode ga same bakterije. Prožet je otvorenim kanalima – *vodenim kanalićima* (engl. water channels) koji omogućuju opskrbu otopljenim hranjivim tvarima (70, 78). Struktura matriksa razlikuje se prema vrstama ili sojevima bakterija, uvjetima tijekom razvoja i prostornim položajem unutar bilo kojeg danog biofilma. Sam matriks utječe na fiziologiju, interakciju s okolinom, otpornost na antibiotike i obrambene mehanizme domaćina (68, 79). U većini biofilmova manje od 10% suhe tvari odgovara mikroorganizmima, dok više od 90% čini matriks (70). Skup bakterija i polisaharidnog matriksa na okupu održava i štiti kapsula. Unutar matriksa bakterije međusobno komuniciraju, izmjenjuju metabolite, enzime i genetski materijal – plazmide. Genetska se različitost pojedinih sojeva istih bakterija temelji na međusobnoj razmjeni plazmida. Biofilm je vrlo otporan na obrambene mehanizme domaćina, kako urođene tako i specifične imunosti. Pretpostavlja se da upravo razmjena genetskog materijala među bakterijama omogućuje njihovu prilagodbu na nepovoljne uvjete iz okoline, odnosno uzrokuje rezistenciju bakterija na antibiotike i obrambene mehanizme imunološkog sustava domaćina (67, 75, 80, 81). U stanju biofilma bakterije su i do 1000 puta otpornije na tipično učinkovite antibiotike (4, 81). Biofilmovi stvaraju loše okruženje za djelovanje antibiotika tako što reguliraju metaboličku aktivnost njihovih "jezgrinih" bakterija, smanjujući koncentraciju kisika i mijenjajući pH u jezgri biofilma (27). Bakterije unutar biofilma imaju smanjene metaboličke potrebe za kisikom i hranjivim tvarima, smatraju se inaktivnima i genetski se razlikuju od bakterija u planktonskom obliku. Nakon izvjesnog vremena provedenog unutar matriksa, nakon tzv. procesa sazrijevanja, životni ciklus biofilma završava, kapsula se raspukne, pa genetski promijenjene bakterije izlaze iz nje i vraćaju se u planktonski oblik (Slika 1.11). Stoga je biofilm primarna struktura preživljavanja i proliferacije bakterija (21, 82, 83).



Slika 1.11. Razvoj biofilma ciklički je proces u više koraka, koji uključuje početnu agregaciju bakterija za podlogu, stvaranje i sazrijevanje biofilma, nakon čega slijedi disperzija i vraćanje bakterija u planktonski oblik.

Biofilm se može širiti otpuštanjem planktonskih bakterija na udaljena mjesta na koja se one mogu lijepiti i ponovo započeti složen proces stvaranja biofilma (4). Kolonizacijom novih ciljnih mjesta objašnjavaju se rekurentne kronične infekcije. Genetski te bakterije više nisu iste, tj. genotip im je toliko promijenjen da vrlo često ne reagiraju na antibiotike na koje su reagirale bakterije iz početka ciklusa (67, 68, 75, 78, 80).

Adaptacija biofilma te njegov rast u različitim uvjetima zapanjujuće su slični, što govori kako su važne konvergentne strategije preživljavanja koje se djelomice potvrđuju strukturnom specijalizacijom dijelova biofilma. Strukturna sličnost je zapažena uspoređivanjem onih biofilmova koji nastaju u blizini hidrotermalnih izvora, u rijekama u kojima teče svježa voda te u laboratorijskim uvjetima u posudama malog protoka vode. Ipak, mogu se uočiti određene razlike. Biofilm koji nastaje u mirnom okolišu ili u uvjetima malog protoka nalik je gljivi ili sličnim oblicima. No tamo gdje je protok vrlo ubrzan rubovi biofilma mogu biti izobličeni u niti ili slične hidro(aero)dinamičke produkte. Može se pretpostaviti da protok zraka kroz nos djeluje na biofilm slično protoku vode (84, 85).

Mogućnost vizualizacije i proučavanja biofilma na biomaterijalima i u humanim uzorcima rezultirala je intenzivnim istraživanjima brojnih infekcija i njihove

povezanosti sa stvaranjem biofilma (69). Većina biofilmova otporna je na standardno kultiviranje pa njihovo otkrivanje zahtijeva specijalizirane tehnike (86). Postoji nekoliko mikroskopskih tehnika kojima se može detektirati biofilm na sluznici sinusa: transmisijska elektronska mikroskopija, skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), konfokalna skenirajuća laserska mikroskopija i fluorescencija in situ hibridizacije (87, 88, 89). Može se reći da svaka tehnika detekcije biofilma iziskuje zahtjevne, skupe i dugotrajne protokole. SEM koristi snop elektrona visoke energije kako bi se prikazala površina promatranog uzorka. Tako SEM daje dvodimenzionalne morfološke informacije o površinskoj strukturi biofilma pa se primjenjuje za analizu strukture i funkcije biofilma (morfologija, gustoća glikokaliksa i debljina sloja) na živim površinama ili neživim materijalima (75, 68, 90).

Biofilm se u ljudskom organizmu razvija na vitalnom ili nekrotičnom tkivu te na inertnim površinama različitih biomaterijala (69). U području glave i vrata biofilm je pronađen kod periodontalnih bolesti (dentalni plak je najpoznatiji i prvi opisani biofilm u ljudi, van Leeuwenhoek 1674. godine), kroničnih upala srednjeg uha (serozni otitis i kolesteatom), kroničnog tonzilitisa, adenoidnih vegetacija, cistične fibroze te kroničnog rinosinuitisa, a može se naći i na umjetnim materijalima: ventilacijskim cjevčicama na bubnjiću, govornim protezama, endotrahealnim tubusima, kohlearnim implantima, centralnim venskim kateterima i stentovima za frontalni sinus. Bakterije koje proizvode biofilm u ovoj regiji su *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa*, koagulaza-negativni *staphylococci*, *Enterobacter spp*., *Proteus mirabilis*, *Hafnia spp*. i *Acinetobacter spp*. (71, 76, 84, 89, 91, 92).

1.3. Prikaz problema

Kod KRS-a postoje slučajevi bolesnika s negativnim mikrobiološkim obriscima čiji se simptomi poprave dok primaju antibiotike, a relaps bolesti javlja se kada se antibiotska terapija ukine. Kada bakterije napuštaju biofilm i prelaze u planktonski oblik, izazivaju simptome i postaju podložne antibioticima. Nadalje, kod dijela

operiranih bolesnika simptomi bolesti ostaju i nakon operacije (1, 85). Histološki se radi o jednom od četiriju podtipova kroničnoga sinuitisa po Terrieru (93).

Ova se disertacija temelji na dosadašnjim spoznajama o ulozi biofilma u nastanku kronične sinusne bolesti. Ona se nastavlja na istaknute radove inozemnih autora o povezanosti KRS-a i biofilma, ali koji nisu do sada zahvatili u patologijsku problematiku vezanu za sam ACP, koji predstavlja izolirani entitet u sklopu KRS-a. Znakovi postojanja biofilma prvo su nađeni u životinja u uvjetima eksperimentalnog sinuitisa prouzročenog inokulacijom bakterija soja *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Uloga biofilma u KRS-u počela se istraživati prije petnaestak godina (4). Cryer je prvi objavio svoje rezultate o tome 2004. godine, utvrdivši elektronskom mikroskopijom biofilm u bolesnika s KRS-om koji su nakon konzervativnog i kirurškog liječenja dalje imali simptome (94). Nadalje, Sanclement i sur. su u 24 od 30 ispitanih bolesnika operiranih radi KRS-a dokazali biofilm, također uz pomoć elektronske mikroskopije (95). Palmer je potvrdio prisutnost biofilma u KRS-u, koristeći humane perioperativne uzorke (83). Može se pretpostaviti da zdrav, normalan epitel gornjeg dijela dišnog sustava sprječava rast biofilma, a u KRS-u dolazi do gubitka cilija, što bi moglo pogodovati nastanku samog biofilma (96, 97).

Nastanak ACP-a nedostatno je raščlanjen, a povezanost biofilma i ACP-a do sada nije istraživana. Rezultati ove studije trebali bi pokazati ima li biofilma na bilo kojem dijelu ACP-a; ako ga ima, gdje ga ima najčešće i najviše; koje su eventualne morfološke razlike biofilma u pojedinim dijelovima samoga ACP-a, i tako pomoći u razumijevanju etiopatogeneze ove bolesti (86).

2. Hipoteza

Glavna je hipoteza ovoga rada da biofilm postoji na dijelu ACP-a i u maksilarnom sinusu i u nosnoj šupljini te na samoj sluznici maksilarnog sinusa. Između biofilmova na ove tri lokalizacije ne postoje elektronskomikroskopske morfološke razlike, kao ni razlike u patohistološkom nalazu u smislu kronične upale.

Dodatne hipoteze jesu:

1. ACP je vrsta kroničnog maksilarnog sinuitisa, a ne podvrsta nosnih polipa,

2. zasebna vrsta biofilma može se naći i u zdravih osoba (bez kliničkih i radioloških znakova KRS-a).

3. Cilj istraživanja

Primarni je cilj istraživanja utvrditi ima li elektronskomikroskopskih znakova biofilma na bilo kojem od dijelova ACP-a (dio u maksilarnom sinusu i dio u nosnoj šupljini) te na sluznici maksilarnog sinusa koja nije u izravnom doticaju s ACP-om.

Sekundarni cilj je istražiti postoji li biofilm u maksilarnom sinusu u rinosinusološki zdravih osoba i usporediti eventualno postojanje biofilma na navedenim lokalizacijama s patohistološkim nalazom uzorka sluznice s istoga mjesta kako bi se utvrdilo na kakvoj sluznici biofilm može postojati: na zdravoj ili dokazano bolesnoj sluznici. Naime, sluznica koja je naoko zdrava to ne mora biti i patohistološki.

4. Materijali i metode

4.1. Ustroj studije

Ovo presječno istraživanje (engl. cross-sectional study) odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (prilog 1). Istraživanje je provedeno u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Zagreb u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske.

Istraživanje je proveo pristupnik (prim. mr. sc. Gorazd Poje, dr. med.) tijekom rutinskog rada s pacijentima u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC-a Zagreb u razdoblju od 15. lipnja 2015. do 22. prosinca 2017. godine.

4.2. Materijal

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 80 osoba obaju spolova životne dobi iznad 18 godina koje su bile na rinološkom pregledu radi planiranja operacije ACP-a ili operacije kojom se kroz zdrave sinuse dolazi do bolesnikova patološkog supstrata, a koje su nakon detaljnog upoznavanja s planom i svrhom istraživanja te načinom njegova provođenja potpisale informirani pristanak i dale svoju pismenu suglasnost za sudjelovanje u istraživanju (prilog 2).

U istraživanu skupinu uključeno je 40 bolesnika s ACP-om (20 muškog i 20 ženskog spola) koji prethodno nisu bili podvrgnuti operaciji sinusa. ACP se dijagnosticirao kliničkim endoskopskim pregledom (polipoidna masa koja iz maksilarnog sinusa prominira u nosnu šupljinu prema nosnom dijelu ždrijela), a

dijagnoza se potvrdila CT-om. Materijal koji se za vrijeme operacije inače baca u biološki otpad upotrijebio se za patohistološku i elektronskomikroskopsku analizu kako bi se istražilo ima li patohistoloških znakova kronične upale sluznice u navedenim regijama i ima li znakova postojanja biofilma u istim područjima. Bolesnici s ACP-om uključeni u istraživanje bili su podvrgnuti potpuno identičnom kirurškom zahvatu kao i bolesnici s ACP-om koji nisu bili uključeni u istraživanje. ACP-i su odstranjeni tehnikom endonazalne endoskopske minimalno invazivne kirurgije (ESS) bez ikakvog vanjskog reza, ožiljka ili šavova. To znači da se kroz nos, endoskopski (optikama različitih vidnih polja), prvo odstranjuje dio polipa iz nosne šupljine, a zatim se kroz nos endoskopski otvara maksilarni sinus (proširuje se njegovo naturalno ušće) te se odstranjuje dio ACP-a iz maksilarnog sinusa. Na kraju se iz područja koje nije bilo u doticaju s ACP-om odstranio dio sluznice sinusa. Polovina svake zasebne cjeline stavila se u formalin i uputila na patohistološku analizu, a druga polovina se predvidjela za pripremu preparata za elektronsku mikroskopiju. Svim se bolesnicima neposredno prije samog zahvata uzeo mikrobiološki obrisak nosnog kavuma i to iz srednjeg nosnog hodnika, a za vrijeme operacije, nakon što se maksilarni sinus otvorio, i iz samog maksilarnog sinusa pod kontrolom endoskopa.

Kontrolnu skupinu činili su bolesnici sa zdravim sinusima koji na operaciju nisu došli zbog bolesti sinusa (40 ispitanika, 20 muškog i 20 ženskog spola), nego se kroz sinuse dolazilo do njihova patološkog supstrata. Kliničkim i endoskopskim pregledom te pomoću CT-a i/ili MR-a, koje je bilo potrebno učiniti radi njihove osnovne bolesti, a ne samo radi istraživanja, isključila se bolest nosa i sinusa. Radilo se o bolesnicima koji su operirani zbog tumora hipofize, likvorske fistule, dekompresije orbite zbog distiroidne orbitopatije, dekompresije koštanog kanala očnoga živca, odstranjivanja mukocela sfenoidnog sinusa te drugih lezija lubanjske osnovice, tj. o bolesnicima kod kojih su se morali ukloniti dijelovi sluznice sinusa i oni kojima se sinusi otvaraju kako bi se za vrijeme operacije napravio put do lezije koju je trebalo kirurški riješiti. Uzimanje komadića zdrave sluznice kod tih osoba s etičkog stajališta pritom nije upitno, jer njihova operacija sama po sebi to zahtijeva, podrazumijeva i nalaže kontroliranu disekciju sinusnih prostora kako bi se došlo do tumora ili druge ciljne lezije. Tijekom takvih operacija manji dio tkiva koji se odstranio nije završio u

biološkom otpadu, što se u pravilu i praksi svakodnevno događa, nego se koristio za istraživanje. I tim su se bolesnicima, istovjetno bolesnicima s ACP-om, uzeli i mikrobiološki obrisci. Identifikacija bakterija provedena je standardnim mikrobiološkim testovima. Treba naglasiti da su iz kontrolne skupine isključivani svi oni bolesnici koji su prethodno imali bilo kakvu operaciju nosa i sinusa te oni kojima sluznica nije endoskopski izgledala zdravo ili je bila suspektna za uzimanja uzoraka.

4.3. Metode

Polovina svakog uzorka sakupljenih tkiva s prethodno spomenutih triju lokalizacija (dio ACP-a u sinusu, dio u nosnom kavumu te sluznica maksilarnog sinusa) upućena je na patohistološku analizu pod šifrom da bi anonimnost bolesnika bila zajamčena, a objektivnost promatranja što veća. Nalazi patohistološke analize razvrstani su u skupine prema Terrierovoj klasifikaciji kronične upale sluznice maksilarnog sinusa (93):

1. **normoplastična sluznica**

Makroskopski je to ružičasta, prozirna i tanka sluznica. Kroz gracilnu sluznicu, koja u cijelosti izgledom odgovara normalnoj, zdravoj, sinusnoj sluznici, lako se opaža vaskularni crtež finih krvnih žilica (Slika 4.1).

2. **hiperplastična sluznica**

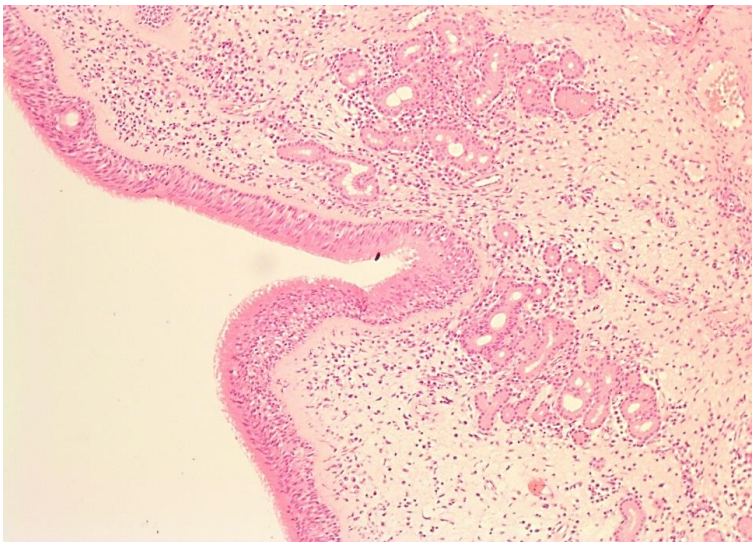
Sluznica je zadebljana, edematozna, neprozirna, vaskularni crtež smanjen ili nestao u kongestivnom i difuznom crvenilu stijenke (Slika 4.2).

3. **polipoidna sluznica**

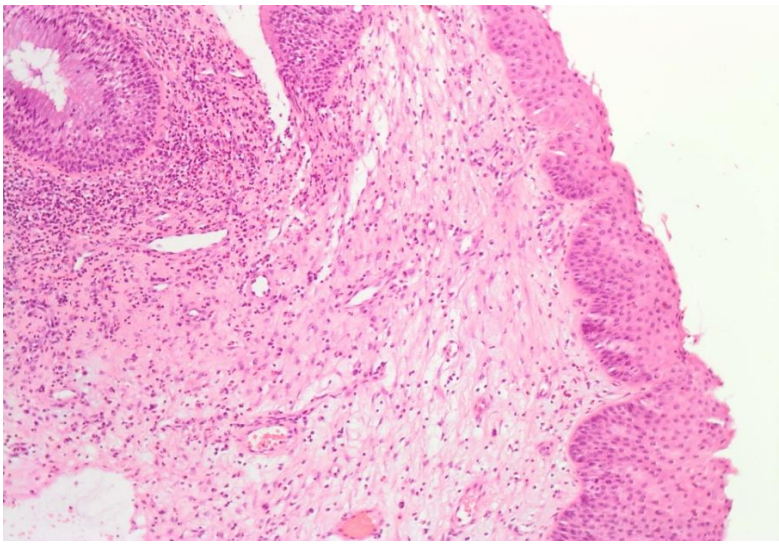
Sluznica je mjestimično zadebljana, edematozna i peteljkasta, a mjestimično je i normoplastična. Dio na kojem polip nastaje zamućen je, zadebljan i crven (Slika 4.3).

4. **polipozna sluznica**

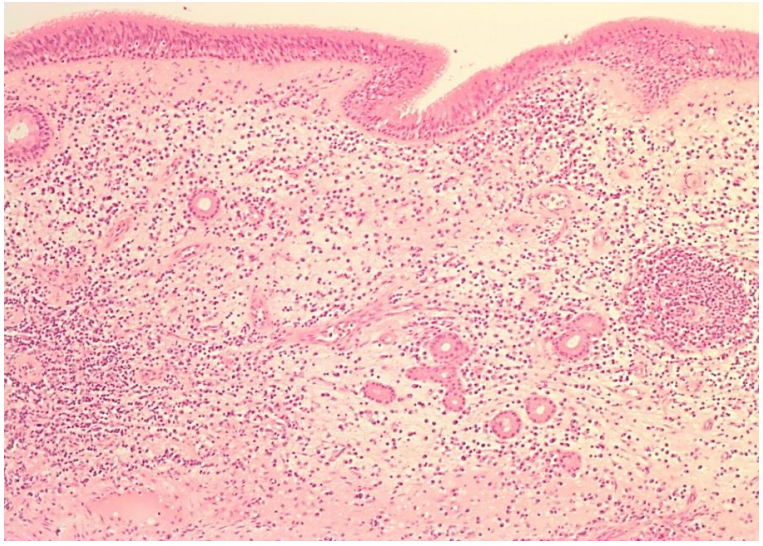
Sluznica je kombinacija difuzne hiperplastične sluznice s polipoznim dijelovima (polipi), tj. ona je kombinacija 2. i 3. tipa (Slika 4.4).



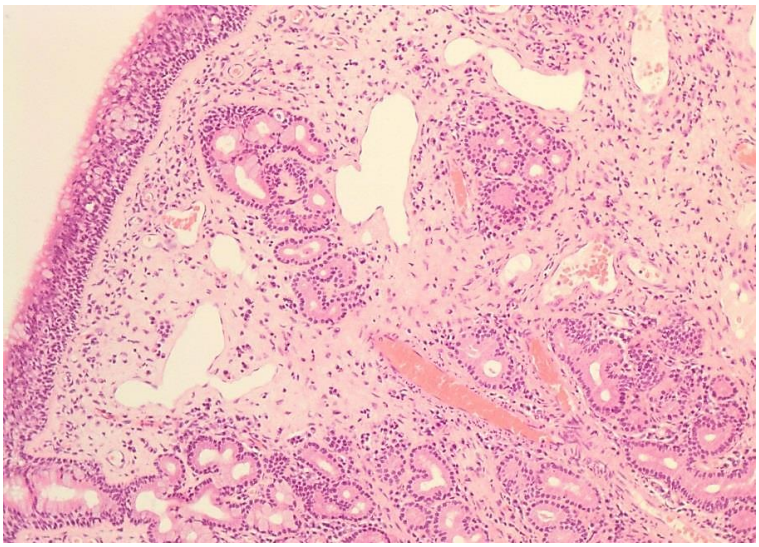
Slika 4.1. Normoplastična sluznica. Histološki na površini je hiperplastični višeredni cilindrični epitel s trepetljikama. Stroma je vezivna, dijelom edematozna, ev. prožeta oskudnim limfoplazmocitoidnim upalnim infiltratom. U stromi mogu biti lagano umnožene mukozne žlijezde (HE x 100).



Slika 4.2. Hiperplastična sluznica. Histološki dio respiratorne sluznice na čijoj se površini nalazi metaplastični pločasti epitel. Stroma je rahla, dijelom edematozna, prožeta srednje obilnim kroničnim upalnim infiltratom građenim od limfocita i plazma stanica uz nešto eozinofila. Seromukozne žlijezde su umnožene (HE x 100).



Slika 4.3. Polipozno zadebljana sluznica. Histološki se na površini nalazi višeredni cilindrični epitel s trepetljikama, a subepitelno zadebljana bazalna membrana. Stroma je izrazito rahla, edematozna, prožeta srednje obilnim limfoplazmocitoidnim infiltratom. U stromi su mukozne žlijezde (HE x 100).



Slika 4.4. Polipozna tvorba građena od vezivne strome i seromukoznih žlijezda. Stroma je prožeta srednje obilnim kroničnim upalnim infiltratom. Seromucinozne žlijezde u stromi su umnožene, neke su cistično proširene. Na površini se nalazi pravilni, višeredni cilindrični epitel s trepetljikama (HE x 100).

4.3.1. Elektronska mikroskopija

Druga polovina uzetih tkiva, također pod šifrom, bila je uklopljena u formalin te obrađena za elektronsku mikroskopiju i to tako da se naknadno odvojila od formalina i isprala u otopini dvostruko destilirane vode i etanola. Pritom su se koristili sljedeći volumni udjeli destilirane vode i etanola: 75/25, 50/50, 25/75. Nakon toga su se uzorci dvaput isprali u apsolutnom etanolu (proizvođač „Kemika“) i potom stavili u Petrijeve posude, pokrili poroznim papirom i sušili dvadeset i četiri sata. Tako osušeni uzorci narezali su se i bili spremni za elektronsku mikroskopiju.

Za elektronsku mikroskopiju koristio se Thermal field emission electron microscope (FE SEM, model JSM-7000F, proizvođač JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Elektronska mikroskopija izvodila se slijepo jer su se uzorci obrađivali pod šifrom i to posebno za svaki dio ACP-a (dio u maksilarnom sinusu i dio polipa u nosnoj šupljini) te za sluznicu maksilarnog sinusa. Na svakoj od tri skupine uzoraka analiziralo se postojanje biofilma, a zatim i njegove morfološke značajke sukladno parametrima elektronske mikroskopije. Kriteriji za *in vivo* identifikaciju bakterijskog biofilma bila je prisutnost karakteristične morfologije biofilma. To su za podlogu adherirane bakterije organizirane u formacijama mikrokolonija koje mogu biti povezane i organizirane mrežoliko ili pilama, trodimenzionalna struktura biofilma, bakterijske stanice prekrivene (amorfnim) ekstracelularnim matriksom, prisutni kanali i džepovi bez bakterija na površini ekstracelularnog matriksa, stvaranje tornjeva (engl. towers), postojanje vodenih kanalića (engl. water channels) i sferični (kuglasti) oblici u matriksu (98, 99). Nadalje, na sve tri spomenute lokalizacije uzeti su i mikrobiološki obrisci.

4.3.2. Statističke metode

U obradi podataka primijenjena je deskriptivna statistika. Kontinuirane, numeričke varijable opisane su centralnom vrijednošću i mjerama raspršenosti (aritmetička sredina ± standardna devijacija i medijan, raspon), a kategorijalne varijable su prikazane apsolutnim (N) i relativnim (%) frekvencijama.

Normalnost distribucije varijabli testirana je Shapiro-Wilksovim W testom, a homogenost varijance Levenovim testom. Razlike u vrijednostima kontinuiranih nezavisnih varijabli između skupina analizirane su neparametrijskim testom (Mann-Whitney), a razlike u vrijednostima kategorijalnih varijabli između skupina ispitane su Hi-kvadrat (nezavisne varijable) i McNemar (zavisne varijable) testom. Post hoc analiza je provedena pomoću Bonferroni testa bez korekcije i s korekcijom.

Povezanost i smjer povezanosti varijabli testirani su Spearman Rank Order neparametrijskim testom korelacije, a jačina i neovisnost povezanosti procijenjeni su univarijantnom i multiplom logističkom regresijom.

Statistički značajnom smatrane su razlike $p<0,05$. U analizi podataka korišteni su programski paketi Statistica 13.5 (TIBCO Inc., USA) i SPSS 23.0 (IBM, USA).

5. Rezultati

5.1. Opis istraživačkog uzorka

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 80 ispitanika obaju spolova, među kojima 40 (50%) muškaraca i 40 (50%) žena. Prosječna životna dob ispitanika bila je 35,01 ± 14,71 godina (Med 30, Min 18, Max 72; SE 1,64).

Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine:

Skupina 1 (N=40) obuhvaćala je bolesnike s ACP-om.

Skupina 2 (N=40) obuhvaćala je ispitanike kontrolne skupine tj. bolesnike sa zdravim sinusima koji na operaciju nisu došli zbog bolesti sinusa nego se kroz sinuse dolazilo do njihovog patološkog supstrata.

5.1.1. Demografska obilježja ispitanika

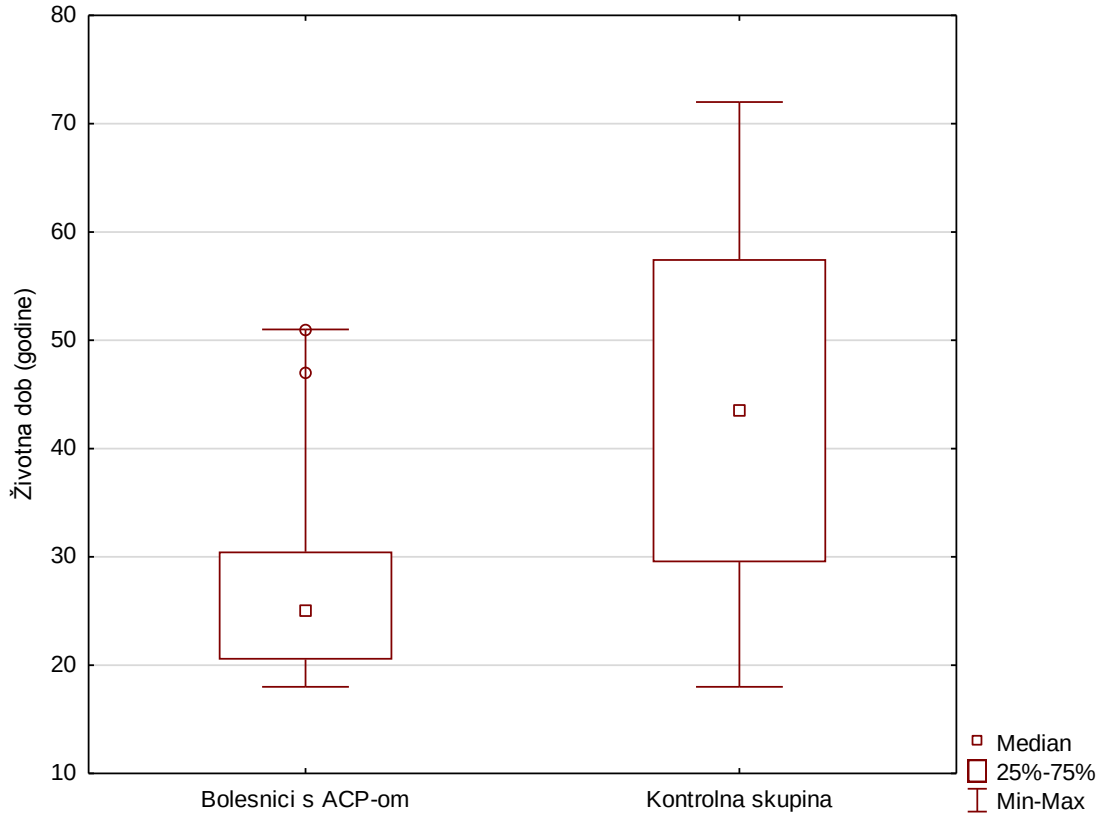
U Tablici 5.1. prikazana su demografska obilježja ispitanika podijeljenih u dvije ispitivane skupine prema prisutnosti/odsutnosti ACP-a.

Tablica 5.1. Demografska obilježja ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema prisutnosti/odsutnosti ACP-a.

	Bolesnici s ACP-om (N=40)	**Kontrolna skupina** (N=40)	**Z[a] Chi-[b]**	**p**
Životna dob (god.)*	26,68±7,74 (25, 18-51)	43,48±15,22 (43,5, 18-72)	5,061[a]	**<0,001**[a]
Spol (m/ž)**	20/20 (50/50)	20/20 (50/50)	0,000[b]	1,000[b]

* $\bar{x}$ ± SD (Med, Min-Max) ** N (%) [a] Mann-Whitney test [b] Hi-kvadrat test df = 1

Bolesnici s ACP-om bili su statistički značajno mlađi nego ispitanici kontrolne skupine, dok razlike po spolu među skupinama nije bilo (Tablica 5.1., Slika 5.1).



Slika 5.1. Usporedba ispitanika dviju ispitivanih skupina prema životnoj dobi.

5.1.2. Lokalizacija ACP-a s obzirom na stranu

25 (62,5%) bolesnika s ACP-om imalo je desnostrani, a 15 (37,5%) lijevostrani polip. Navedena razlika bila je granično značajna (p=0,052).

5.1.3. Proširenost ACP-a

Tablica 5.2. prikazuje proširenost polipa kroz koanu i u orofarinks kod bolesnika s ACP-om. Proširenost polipa kroz koanu bila je statistički značajno veća nego proširenost polipa u orofarinks (p<0,001).

Tablica 5.2. Proširenost polipa kroz koanu i u orofarinks kod bolesnika s ACP-om.

	Kroz koanu (N=40)*	**U orofarinks** (N=40)*	**Chi-**	**p**
Proširenost polipa (ne/da)	15/25 (37,5/62,5)	38/2 (95/5)	84,147	**<0,001**

N (%) Hi-kvadrat test df = 12

5.2. Prisutnost biofilma i patohistološki nalaz uzorka sluznice

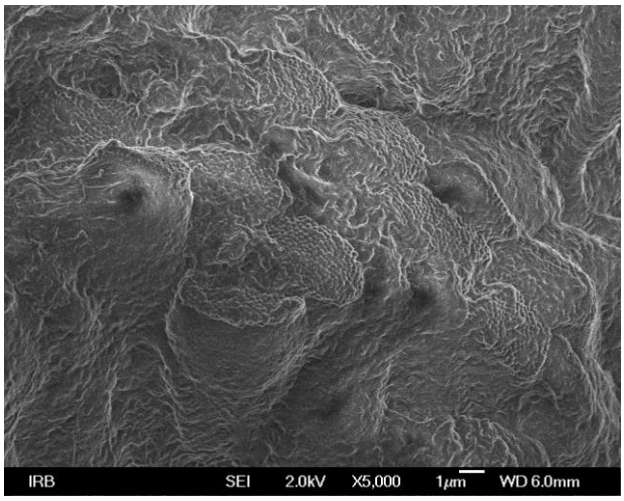
5.2.1. Prisutnost biofilma u ACP-a

Tablica 5.3. prikazuje prisutnost biofilma u ACP-a na njegovom dijelu u maksilarnom sinusu i kavumu kod bolesnika s ACP-om. Prisutnost biofilma ACP-a bila je statistički značajno češća u kavumu nego u sinusu (p=0,016) (Slika 5.2).

Tablica 5.3. Prisutnost biofilma u maksilarnom sinusu i kavumu kod bolesnika s ACP-om.

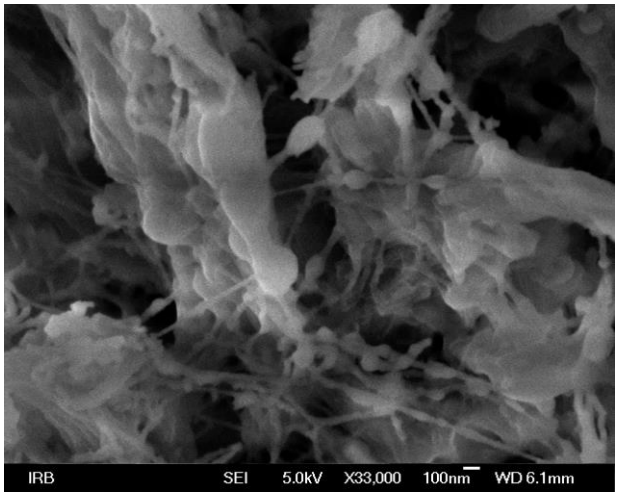
	U sinusu (N=40)	**U kavumu** (N=40)	**Chi-**	**p**
Prisutnost biofilma ACP-a (ne/da)	8/32 (20/80)	3/37 (7,5/92,5)	20,252	**0,016**

N (%) Hi-kvadrat test df = 9



Slika 5.2. Biofilm ACP-a u kavumu s vidljivim vodenim kanalićima (SEM x 5 000).

Biofilm ACP-a značajno je najčešće bio prisutan na obje lokalizacije, u maksilarnom sinusu i kavumu (p=0,021) (Tablica 5.4), a post hoc analiza bez korekcije i s njom pokazala je da je biofilm bio granično češće prisutan samo u maksilarnom sinusu nego samo u kavumu (0,058) (Slika 5.3).



Slika 5.3. Mikrokolonije biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu koje su mrežoliko povezane. Kroz ekstracelularni matriks vidljivi sferični oblici (SEM x 33 000).

Tablica 5.4. Prisutnost biofilma ACP-a samo u maksilarnom sinusu i kavumu, i na obje lokalizacije kod bolesnika s ACP-om.

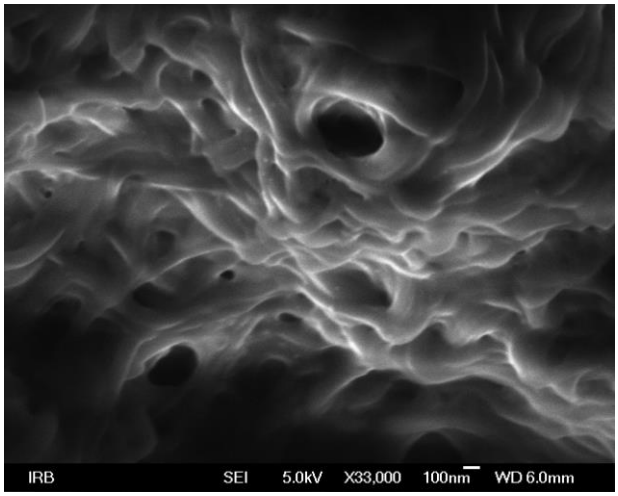
	Samo u sinusu (N=40)	**Samo u kavumu** (N=40)	**U sinusu i kavumu** (N=40)	**Chi-**	**p**
Prisutnost biofilma ACP-a	8 (20)	3 (7,5)	29 (72,5)	19,962	**0,021**

N (%) Hi-kvadrat test df = 3

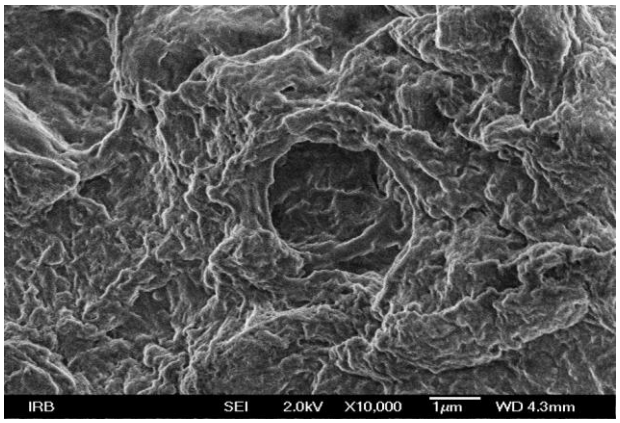
5.2.2. Prisutnost biofilma na sluznici maksilarnog sinusa

Biofilm je na sluznici sinusa bio statistički značajno češće prisutan kod bolesnika s ACP-om nego kod ispitanika kontrolne skupine (57,5% *vs.* 5%; p<0,001), premda je statistički značajna razlika utvrđena samo unutar kontrolne skupine (p<0,001) (Tablica 5.5). Razlika u skupini bolesnika s ACP-om bila je granično

značajna (p=0,051). Prisutnost biofilma u dva ispitanika kontrolne skupine upućuje na to da se biofilm može nalaziti i u zdravih osoba (bez kliničkih i radioloških znakova KRS-a) (slike 5.4. i 5.5).



Slika 5.4. Biofilm na sluznici maksilarnog sinusa u bolesnika s ACP-om, vidljivi vodeni kanalići i pile na površini (SEM x 33 000).



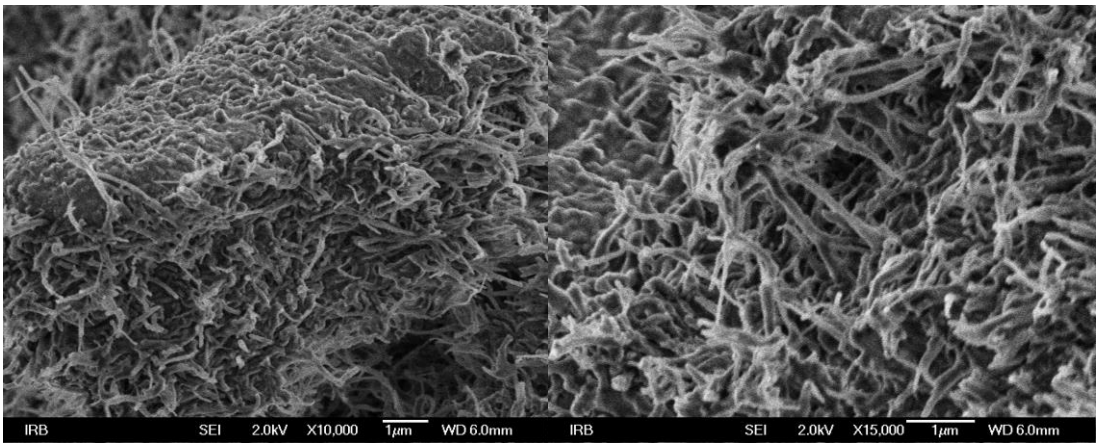
Slika 5.5. Vodeni kanalić biofilma u maksilarnom sinusu ispitanika kontrolne skupine (SEM x 10 000).

Tablica 5.5. Prisutnost biofilma na sluznici sinusa kod ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema prisutnosti/odsutnosti ACP-a.

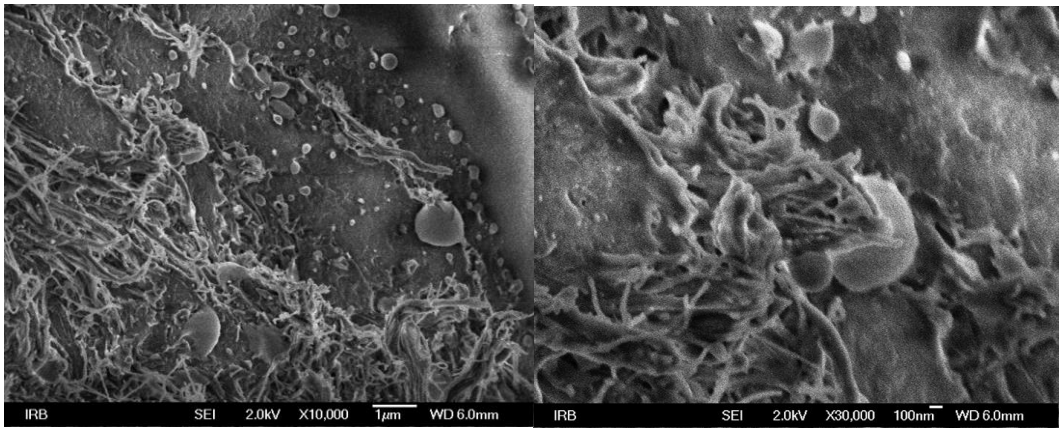
	Bolesnici s ACP-om (N=40)	**Kontrolna skupina** (N=40)	**Chi-[a]**	**p[a]**
Prisutnost biofilma na sluznici sinusa (ne/da)	17/23 (42,5/57,5)	38/2 (95/5)	28,809	**<0,001**
Chi-[b] **p[b]**	7,875 0,051	18,375 **<0,001**		

N (%) [a] Hi-kvadrat test df = 1 [b] McNemar test df = 1

Elektronskomikroskopske morfološke razlike biofilma na tri ispitivane lokalizacije, na dijelu ACP-a u maksilarnom sinusu, u nosnoj šupljini i na sluznici maksilarnog sinusa, nisu nađene (slike 5.6. i 5.7).



Slika 5.6. Prorijeđene i dijelom uništene cilije sluznice maksilarnog sinusa u ispitanika kontrolne skupine, bez znakova biofilma (SEM x 10 000, x 15 000).



Slika 5.7. Razoreni epitel sluznice maksilarnog sinusa u bolesnika s ACP-om s bakterijama od kojih su neke čvrsto uklopljene, početak stvaranja biofilma (SEM x 10 000, x 30 000).

5.2.3. Patohistološki nalaz uzoraka sluznice maksilarnog sinusa

Razlike u patohistološkom nalazu u kronične upale na tri ispitivane lokalizacije, na dijelu ACP-a u maksilarnom sinusu, u nosnoj šupljini i na sluznici maksilarnog sinusa, nisu nađene.

Tablica 5.6. prikazuje podjelu bolesnika s ACP-om i ispitanika kontrolne skupine prema patohistološkim promjenama sluznice maksilarnog sinusa određenima Terrierovom klasifikacijom. Kod bolesnika s ACP-om najčešće patohistološke promjene bile su tip 2 i tip 3, dok je u kontrolnoj skupini najčešći bio nalaz tipa 1. Bonferroni post hoc test čak i s korekcijom pokazao je da su unutar skupine bolesnika s ACP-om statistički značajne bile razlike između učestalosti tipova 1 i 2 ($p=0,003$), tipova 1 i 3 ($p<0,001$), tipova 2 i 4 ($p=0,008$), te tipova 3 i 4 ($p=0,001$). Razlike između tipova 1 i 4 ($p=0,149$) te između tipova 2 i 3 ($p=0,323$) nisu bile značajne. U kontrolnoj skupini značajna razlika utvrđena je jedino između tipa 1 i ostalih tipova ($p<0,001$), dok razlike učestalosti između tipova 2, 3 i 4 nije bilo.

Tablica 5.6. Patohistološke promjene sluznice prema Terrierovoj klasifikaciji kod bolesnika s ACP-om i ispitanika kontrolne skupine.

Terrierova klasifikacija	**Bolesnici s ACP-om** (N=40)	**Kontrolna skupina** (N=40)	**Chi-[a]**	**p[a]**
Tip 1	2 (5)	37 (92,5)	47,478	**<0,001**
Tip 2	13 (32,5)	2 (5)	18,356	**0,028**
Tip 3	22 (55)	1 (2,5)	39,127	**<0,001**
Tip 4	3 (7,5)	0 (0)	1,458	0,143
Chi-[b] **p[b]**	29,568 **<0,001**	61,651 **<0,001**		

N (%) [a] Hi-kvadrat test df = 1 [b] McNemar test df = 3

5.3. Nalaz mikrobiološkog obriska i uzročnika

5.3.1. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u kavumu

Pozitivan mikrobiološki obrisak kavuma utvrđen je u statistički značajno većem broju bolesnika s ACP-om nego u ispitanika kontrolne skupine (p<0,001) (Tablica 5.7).

Tablica 5.7. Nalaz mikrobiološkog obriska u kavumu kod ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema prisutnosti/odsutnosti ACP-a.

	Bolesnici s ACP-om (N=40)	**Kontrolna skupina** (N=40)	**Chi-**	**p**
Mikrobiološki obrisak u kavumu (neg./poz.)	6/34 (15/85)	34/6 (85/15)	42,076	**<0,001**

N (%) Hi-kvadrat test df = 1

Od ukupno 34 pozitivna nalaza obriska kavuma, u 9 (22,5%) bolesnika s ACP-om utvrđena su dva uzročnika u kavumu, dok je u preostalih 31 (77,5%) bio prisutan samo jedan uzročnik. Najčešće otkriveni uzročnik u kavumu bio je *Staphylococcus aureus* (17/40, 42,5%), dok su ostali bili rjeđe zastupljeni (Tablica 5.8).

Tablica 5.8. Vrste mikrobioloških uzročnika u kavumu kod bolesnika s ACP-om.

	Staphylococcus aureus (N=40)	**Pseudomonas aeruginosa** (N=40)	**Moraxella catarrhalis** (N=40)	**Streptococcus pneumoniae** (N=40)
Bolesnici s poz. nalazom N (%)	17 (42,5)	7 (17,5)	4 (10)	3 (7,5)

Od 6 ispitanika kontrolne skupine s pozitivnim nalazom obriska kavuma kod jednoga su utvrđena dva uzročnika, a kod preostalih samo jedan. Najčešći uzročnik bio je *Staphylococcus aureus* (3/40, 7,5%), potom *Staphylococcus epidermidis* (2/40, 5%) i *Streptococcus pneumoniae* (1/40, 2,5%).

5.3.2. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u maksilarnom sinusu

Pozitivan mikrobiološki obrisak sinusa utvrđen je u statistički značajno većem broju bolesnika s ACP-om nego u ispitanika kontrolne skupine (p<0,001), premda je značajna razlika utvrđena samo unutar kontrolne skupine (p<0,001) (Tablica 5.10). Razlika unutar skupine bolesnika s ACP-om nije bila statistički značajna (p=0,082).

Tablica 5.10. Nalaz mikrobiološkog obriska u maksilarnom sinusu kod ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema prisutnosti/odsutnosti ACP-a.

	Bolesnici s ACP-om (N=40)	**Kontrolna skupina** (N=40)	**Chi-[a]**	**p[a]**
Mikrobiološki obrisak u sinusu (neg./poz.)	14/26 (35/65)	37/3 (95/5)	31,648	**<0,001**
Chi-[b] **p[b]**	3,025 0,082	30,625 **<0,001**		

N (%) [a] Hi-kvadrat test df = 1 [b] McNemar test df = 1

Od ukupno 26 pozitivnih nalaza obriska, u 2 (5%) bolesnika s ACP-om utvrđena su dva uzročnika u maksilarnom sinusu, u 26 (65%) samo jedan uzročnik, a u preostalih 12 (30%) nije nađen ni jedan patogeni uzročnik. Najčešće otkriveni uzročnik u sinusu bio je *Staphylococcus aureus* (13/28, 46,4%), dok su ostali bili rjeđe zastupljeni (Tablica 5.11).

Tablica 5.11. Vrste mikrobioloških uzročnika u maksilarnom sinusu kod bolesnika s ACP-om.

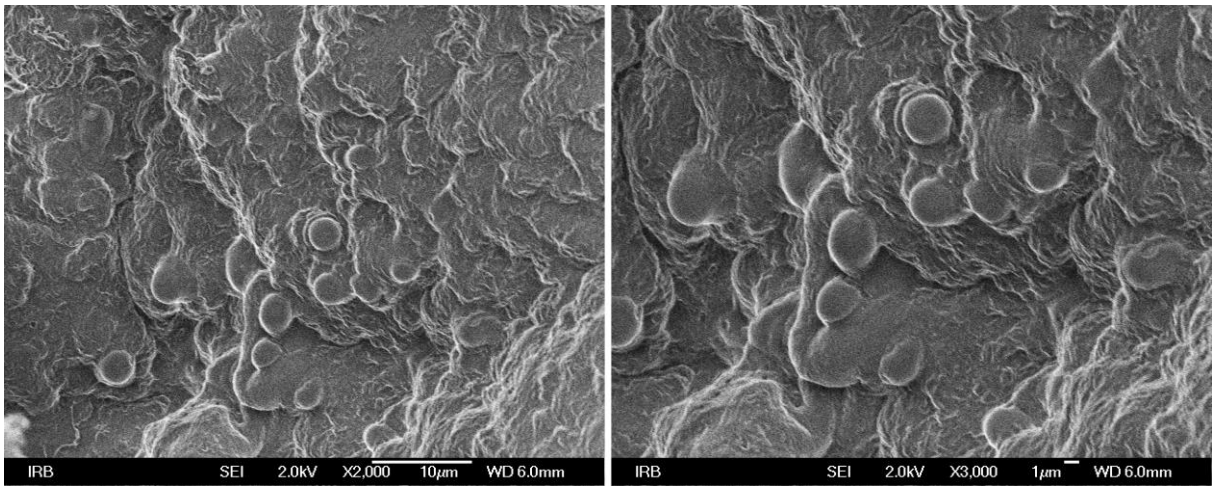
	Staphylococcus aureus (N=28)	**Moraxella catarrhalis** (N=28)	**Streptococcus pneumoniae** (N=28)
Bolesnici s poz. nalazom N (%)	13 (46,4)	2 (7)	3 (10,7)

Kod sva 3 ispitanika kontrolne skupine s pozitivnim nalazom obriska maksilarnog sinusa utvrđen je samo jedan uzročnik, i to *Staphylococcus aureus* kod dvojice (5%) a *Staphylococcus epidermidis* kod jednog ispitanika (2,5%).

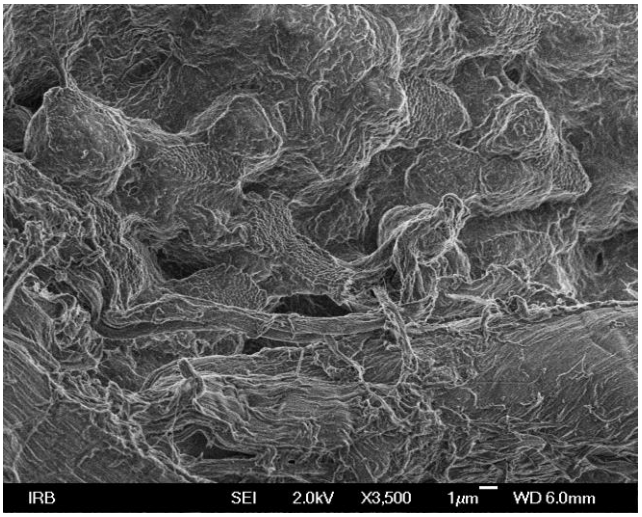
5.4. Korelacije nalaza biofilma s patohistološkim promjenama

5.4.1. Korelacije nalaza biofilma kod bolesnika s ACP-om

U Tablici 5.12. prikazane su korelacije nalaza biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu, te biofilma na sluznici sinusa s patohistološkim promjenama sluznice kod bolesnika s ACP-om. Ni u jednom slučaju nije utvrđena statistički značajna povezanost između triju lokalizacija biofilma i patohistološkog nalaza sluznice (slike 5.8. i 5.9).



Slika 5.8. Trodimenzionalna građa biofilma sluznice maksilarnog sinusa u ispitanika kontrolne skupine sa sferičnim elementima koji nalikuju bakterijama koka unutar matriksa (SEM x 2 000, x 3 000).



Slika 5.9. Trodimenzionalna građa biofilma sluznice maksilarnog sinusa u ACP-a, vidljivi tornjevi i vodeni kanalići (SEM x 3 500).

Tablica 5.12. Korelacije nalaza biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu i biofilma na sluznici sinusa s patohistološkim promjenama u bolesnika s ACP-om.

Terrierova klasifikacija		**Tip 1**	**Tip 2**	**Tip 3**	**Tip 4**
Biofilm ACP-a u sinusu	Spearman R t(N-2) p	-0,172 -1,076 0,288	0,065 0,404 0,689	-0,075 -0,465 0,644	-0,095 -0,588 0,560
Biofilm ACP-a u kavumu	Spearman R t(N-2) p	0,213 1,347 0,185	-0,208 -1,309 0,198	0,124 0,770 0,446	0,081 0,501 0,619
Biofilm na sluznici sinusa	Spearman R t(N-2) p	-0,036 -0,215 0,831	0,057 0,350 0,728	0,036 0,219 0,827	-0,139 -0,866 0,392

5.4.2. Korelacije nalaza biofilma kod ispitanika kontrolne skupine

Tablica 5.13. prikazuje korelacije nalaza biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s patohistološkim promjenama sluznice kod ispitanika kontrolne skupine.

Tablica 5.13. Korelacije nalaza biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s patohistološkim promjenama u ispitanika kontrolne skupine.

Terrierova klasifikacija		**Tip 1**	**Tip 2**	**Tip 3**	**Tip 4**
Biofilm na sluznici sinusa	Spearman R t(N-2) p	-0,562 -4,192 **<0,001**	0,698 6,008 **<0,001**	0,027 0,158 0,875	0,000 0,000 1,000

Statistički značajna negativna povezanost utvrđena je između biofilma na sluznici maksilarnog sinusa i nalaza tipa 1 (-4,192, p<0,001), a još izraženija pozitivna povezanost između istog biofilma i nalaza tipa 2 (6,008, p<0,001). Povezanost između biofilma i tipa 3 bila je pozitivnog predznaka, no nije dosezala statističku značajnost, a povezanosti biofilma s tipom 4 uopće nije bilo budući da ni jedan ispitanik nije imao nalaz toga tipa. Na temelju ovih korelacija moguće je

pretpostaviti da na histološki potpuno normalnoj sluznici nema nikakvih tragova biofilma, a da se on povećava s patohistološkim promjenama sluznice. No ovdje treba naglasiti da bi povećanje uzorka tipa 3 i tipa 4 pokazalo je li opažena tendencija povezanosti statistički značajna.

5.5. Korelacije nalaza biofilma s mikrobiološkim uzročnicima

5.5.1. Korelacije nalaza biofilma s mikrobiološkim uzročnicima u kavumu

U Tablici 5.14. prikazane su korelacije nalaza biofilma ACP-a u sinusu i kavumu, te biofilma na sluznici sinusa s patogenim uzročnicima u kavumu u bolesnika s ACP-om. Statistički značajna pozitivna povezanost utvrđena je samo između uzročnika *Moraxellae catarrhalis* i biofilma ACP-a u kavumu (p=0,003). Povezanosti između drugih patogenih uzročnika i nalaza biofilma nije bilo.

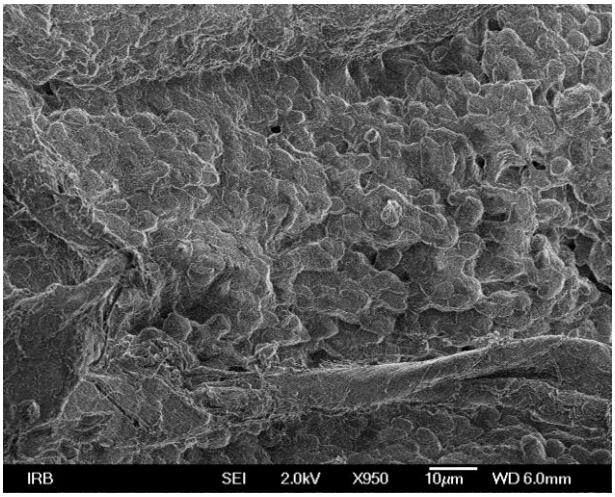
Tablica 5.14. Korelacije nalaza biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu, te biofilma na sluznici maksilarnom sinusa s mikrobiološkim uzročnicima u kavumu u bolesnika s ACP-om.

		Staphylococcus aureus	**Pseudomonas aeruginosa**	**Moraxella catarrhalis**	**Streptococcus pneumoniae**
Biofilm ACP-a u sinusu	Spearman R t(N-2) p	0,051 0,312 0,756	0,066 0,406 0,687	0,095 0,588 0,560	0,142 0,887 0,381
Biofilm ACP-a u kavumu	Spearman R t(N-2) p	0,245 1,556 0,128	0,119 0,737 0,466	0,458 3,179 **0,003**	0,279 1,793 0,081
Biofilm na sluznici sinusa	Spearman R t(N-2) p	0,023 0,142 0,888	0,263 1,679 0,101	0,118 0,733 0,468	0,139 0,867 0,392

Tablica 5.15. prikazuje korelacije nalaza biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s patogenim uzročnicima u kavumu u ispitanika kontrolne skupine. Statistički značajna pozitivna povezanost utvrđena je između uzročnika *Staphylococcus aureus* u kavumu i biofilma na sluznici sinusa (p<0,001), dok je povezanost između ostalih uzročnika i ovog biofilma bila granično značajna (p=0,051; p=0,062) (Slika 5.10).

Tablica 5.15. Korelacije nalaza biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s mikrobiološkim uzročnicima u kavumu u ispitanika kontrolne skupine.

		Staphylococcus aureus	**Staphylococcus epidermidis**	**Streptococcus pneumoniae**
Biofilm na sluznici sinusa	Spearman R t(N-2) p	0,562 4,192 **<0,001**	0,463 2,974 0,051	0,338 2,337 0,062



Slika 5.10. Trodimenzionalna građa biofilma sluznice maksilarnog sinusa u ACP-a, vidljivi tornjevi i vodeni kanalići (SEM x 3 500).

5.5.2. Korelacije nalaza biofilma s mikrobiološkim uzročnicima u maksilarnom sinusu

Korelacije nalaza biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu te biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s patogenim uzročnicima u sinusu u bolesnika s ACP-om prikazane su u Tablici 5.16. Povezanost svih triju uzročnika s biofilmom bila je pozitivnog smjera, no ni u jednom slučaju nije dosezala statističku značajnost. Najbliža graničnoj značajnosti bila je povezanost biofilma ACP-a u kavumu i *Streptococcusa pneumoniae* (p=0,081).

Tablica 5.16. Korelacije nalaza biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu te biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s mikrobiološkim uzročnicima u sinusu u bolesnika s ACP-om.

		Staphylococcus aureus	**Moraxella catarrhalis**	**Streptococcus pneumoniae**
Biofilm ACP-a u sinusu	Spearman R t(N-2) p	0,080 0,495 0,623	0,172 1,077 0,288	0,142 0,887 0,381
Biofilm ACP-a u kavumu	Spearman R t(N-2) p	0,198 1,242 0,221	0,065 0,404 0,689	0,279 1,793 0,081
Biofilm na sluznici sinusa	Spearman R t(N-2) p	0,165 1,029 0,309	0,197 1,240 0,223	0,139 0,867 0,392

Tablica 5.17. prikazuje korelacije nalaza biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s patogenim uzročnicima u sinusu u ispitanika kontrolne skupine. Statistički značajna pozitivna povezanost utvrđena je između uzročnika *Staphylococcus aureusa* u sinusu i biofilma na sluznici maksilarnog sinusa (p<0,001), dok je povezanost između *Staphylococcus epidermidisa* i ovog biofilma bila granično značajna (p=0,054).

Tablica 5.17. Korelacije nalaza biofilma na sluznici maksilarnog sinusa s mikrobiološkim uzročnicima u maksilarnom sinusu u ispitanika kontrolne skupine.

		Staphylococcus aureus	**Staphylococcus epidermidis**
Biofilm na sluznici sinusa	Spearman R t(N-2) p	0,675 6,010 **<0,001**	0,413 2,467 0,054

5.6. Korelacije mikrobioloških uzročnika s patohistološkim promjenama

5.6.1. Korelacije mikrobioloških uzročnika u kavumu s patohistološkim promjenama

Korelacije uzročnika u kavumu s patohistološkim promjenama kod bolesnika s ACP-om prikazane su u Tablici 5.18. Statistički značajna povezanost utvrđena je samo između *Staphylococcus aureusa* i nalaza tipa 4 (p=0,037). Povezanost između *Moraxellae catarrhalis* i tipa 1 bila je granično značajna (p=0,054), ostale nisu dosezale niti graničnu značajnost te nisu prikazane tablično. Ovdje je moguće pretpostaviti da bi povećanje uzorka pokazalo sigurnije rezultate statističke značajnosti.

Tablica 5.18. Korelacije mikrobioloških uzročnika u kavumu s patohistološkim promjenama kod bolesnika s ACP-om.

Terrierova klasifikacija		**Tip 1**	**Tip 2**	**Tip 3**	**Tip 4**
Staphylococcus aureus	Spearman R t(N-2) p	0,197 1,240 0,222	0,168 1,048 0,301	0,273 1,747 0,088	0,331 2,164 **0,037**

Tablica 5.19. prikazuje korelacije uzročnika *Staphylococcus aureusa* u kavumu s patohistološkim promjenama sluznice kod ispitanika kontrolne skupine. Povezanost *Staphylococcus aureusa* sa svim tipovima patohistoloških promjena bila je statistički značajna, i to negativna s tipom 1 (p<0,001), a potom progresivno pozitivna od tipa 2 (p=0,019) do tipa 3 (p<0,001). Povezanosti ostalih uzročnika s promjenama sluznice nisu bile značajne ili ih nije bilo pa nisu prikazane tablično.

Tablica 5.19. Korelacije mikrobioloških uzročnika u kavumu s patohistološkim promjenama u ispitanika kontrolne skupine.

Terrierova klasifikacija		**Tip 1**	**Tip 2**	**Tip 3**	**Tip 4**
Staphylococcus aureus	Spearman R t(N-2) p	-0,639 -5,129 **<0,001**	0,371 2,456 **0,019**	0,562 4,192 **<0,001**	0,000 0,000 1,000

5.6.2. Korelacije mikrobioloških uzročnika u maksilarnom sinusu s patohistološkim promjenama

U Tablici 5.20. prikazane su korelacije uzročnika u maksilarnom sinusu s patohistološkim promjenama kod bolesnika s ACP-om. Statistički značajna povezanost utvrđena je samo između *Moraxellae catarrhalis* i nalaza tipa 2 (p=0,038). Ostale povezanosti nisu bile ni granično značajne pa nisu prikazane tablično. Moguće je također pretpostaviti da bi povećanje uzorka pokazalo sigurnije rezultate statističke značajnosti.

Tablica 5.20. Korelacije mikrobioloških uzročnika u maksilarnom sinusu s patohistološkim promjenama kod bolesnika s ACP-om.

Terrierova klasifikacija		**Tip 1**	**Tip 2**	**Tip 3**	**Tip 4**
Moraxella catarrhalis	Spearman R t(N-2) p	0,053 0,325 0,747	0,331 2,159 **0,038**	0,254 1,616 0,114	0,007 0,404 0,689

Tablica 5.21. prikazuje korelacije uzročnika *Staphylococcus aureusa* u maksilarnom sinusu s patohistološkim promjenama sluznice kod ispitanika kontrolne skupine. Povezanost *Staphylococcus aureusa* u sinusu je sa svim tipovima patohistoloških promjena bila statistički značajna, poput iste u kavumu, i to negativna s tipom 1 (p<0,001), a potom progresivno pozitivna od tipa 2 (p=0,002) do tipa 3 (p<0,001). Usporedbom rezultata iz Tablica 5.19. i 5.21. može se vidjeti da je

povezanost patohistoloških promjena sluznice kod ispitanika kontrolne skupine sa *Staphylococcus aureusom* u sinusu bila značajno veća od povezanosti s istim uzročnikom u kavumu. Povezanosti ostalih uzročnika s promjenama sluznice nisu bile značajne ili ih nije bilo pa nisu prikazane tablično.

Tablica 5.21. Korelacije mikrobioloških uzročnika u maksilarnom sinusu s patohistološkim promjenama u ispitanika kontrolne skupine.

Terrierova klasifikacija		**Tip 1**	**Tip 2**	**Tip 3**	**Tip 4**
Staphylococcus aureus	Spearman R t(N-2) p	-0,806 -8,385 **<0,001**	0,474 3,316 **0,002**	0,698 6,008 **<0,001**	0,000 0,000 1,000

5.6.3. Korelacije mikrobioloških uzročnika dviju lokalizacija

Kod bolesnika s ACP-om utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost između *Staphylococcus aureusa* u kavumu i maksilarnom sinusu (p<0,001), *Moraxellae catarrhalis* u kavumu i sinusu (p<0,001) te *Streptococcus pneumoniae* u kavumu i sinusu (p=0,032) (Tablica 5.22). Povezanost različitih patogenih uzročnika dviju lokalizacija bila je u svim slučajevima negativnog predznaka, no jedina statistički značajna bila je povezanost između *Pseudomonas aeruginosa* u kavumu i *Staphylococcus aureus* u sinusu, premda je moguće da ovaj statistički značajan rezultat negativne povezanosti nema nikakvo kliničko značenje.

Tablica 5.22. Korelacije mikrobioloških uzročnika u kavumu s uzročnicima u maksilarnom sinusu u bolesnika s ACP-om

UZROČNIK U KAVUMU	UZROČNIK U SINUSU	Staphylococcus aureus	Moraxella catarrhalis	Streptococcus pneumoniae
Staphylococcus aureus	Spearman R t(N-2) p	0,699 6,028 **<0,001**	-0,197 -1,240 0,223	-0,245 -1,556 0,128
Pseudomonas aeruginosa	Spearman R t(N-2) p	-0,319 -2,079 **0,044**	-0,106 -0,655 0,516	-0,131 -0,815 0,419
Moraxella catarrhalis	Spearman R t(N-2) p	-0,231 -1,466 0,151	0,688 5,848 **<0,001**	-0,009 -0,588 0,560
Streptococcus pneumoniae	Spearman R t(N-2) p	-0,198 -1,242 0,223	-0,065 -0,404 0,688	0,439 2,867 **0,032**

Kod ispitanika kontrolne skupine utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost samo između *Staphylococcus aureusa* u kavumu i maksilarnom sinusu (p<0,001) (Tablica 5.23), dok ostale povezanosti nisu bile značajne ili ih nije bilo zbog izuzetno malog uzorka.

Tablica 5.23. Korelacije mikrobioloških uzročnika u kavumu s uzročnicima u maksilarnom sinusu u ispitanika kontrolne skupine.

UZROČNIK U KAVUMU	UZROČNIK U SINUSU	Staphylococcus aureus
Staphylococcus aureus	Spearman R t(N-2) p	0,806 8,385 **<0,001**

5.7. Univarijantna i multipla logistička regresija

Kako bi se procijenili rizici nastanka patohistoloških promjena sluznice povezani uz pojedine varijable, podaci su analizirani logističkom regresijom. Rezultati univarijantne i multiple logističke regresije za dihotomiziranu varijablu patohistološke promjene prema Terrierovoj klasifikaciji prikazani su u Tablicama 5.24. do 5.31.

Ispitivana varijabla je u skupini bolesnika s ACP-om dihotomizirana na tip 1 i 2 (nema promjena) te tip 3 i 4 (ima), a u kontrolnoj skupini na tip 1 (nema) te tip 2, 3 i 4 (ima).

Tablica 5.24. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod bolesnika s ACP-om u ovisnosti o demografskim obilježjima.

	OR (95%CI)	**P**	**AOR (95%CI)***	**p***
Životna dob (god.)	0,99 (0,91-1,08)	0,799	/	/
Spol (žene)	1,91 (0,49-3,31)	0,329	1,93 (0,50-3,43)	0,322

* OR standardiziran za dob

Životna dob i spol nisu značajnije utjecali na nastanak patohistoloških promjena sluznice niti u skupini bolesnika s ACP-om (Tablica 5.24) niti u ispitanika kontrolne skupine (Tablica 5.25).

Tablica 5.25. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod ispitanika kontrolne skupine u ovisnosti o demografskim obilježjima.

	OR (95%CI)	**P**	**AOR (95%CI)***	**p***
Životna dob (god.)	0,99 (0,90-1,09)	0,925	/	/
Spol (žene)	2,01 (1,49-3,27)	0,089	1,53 (1,02-3,55)	0,231

* OR standardiziran za dob

Prisutnost biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu te biofilma na sluznici maksilarnog sinusa u skupini bolesnika s ACP-om nije značajnije povećavala rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice (Tablica 5.26).

Tablica 5.26. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod bolesnika s ACP-om u ovisnosti o prisutnosti biofilma ACP-a u maksilarnom sinusu i kavumu te biofilma na sluznici sinusa.

	OR (95%CI)	**p**	**AOR (95%CI)***	**p***
Biofilm ACP-a u sinusu	2,05 (0,34-4,48)	0,420	0,29 (0,04-2,14)	0,213
Biofilm ACP-a u kavumu	0,27 (0,02-3,55)	0,305	0,29 (0,01-4,61)	0,368
Biofilm na sluznici sinusa	1,17 (0,31-4,51)	0,804	1,24 (0,29-5,20)	0,760

* OR standardiziran za dob i spol

Prisutnost biofilma na sluznici maksilarnog sinusa ni u kontrolnoj skupini nije značajnije utjecala na nastanak patohistoloških promjena sluznice (Tablica 5.27).

Tablica 5.27. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod ispitanika kontrolne skupine u ovisnosti o prisutnost biofilma na sluznici maksilarnog sinusa.

	OR (95%CI)	**p**	**AOR (95%CI)***	**p***
Biofilm na sluznici sinusa	1,02 (0,09-2,91)	0,747	1,92 (1,09-3,22)	0,402

* OR standardiziran za dob i spol

Logistička regresija pokazala je da su *Staphylococcus aureus* u kavumu (OR=1,19, 95% CI 0,42-1,92, p=0,032) i *Moraxella catarrhalis* u sinusu (OR=1,32, 95% CI 0,24-3,90, p=0,042) glavni neovisni prediktori nastanka patohistoloških promjena sluznice kod bolesnika s ACP-om. *Staphylococcus aureus* u kavumu je značajno povećavao rizik za nastanak patohistoloških promjena čak i nakon standardizacije rezultata za dob i spol (AOR=1,21, 95% CI 0,43-2,02, p=0,045) (Tablice 5.28. i 5.29).

Tablica 5.28. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod bolesnika s ACP-om u ovisnosti o mikrobiološkim uzročnicima u kavumu.

	OR (95%CI)	p	AOR (95%CI)*	p*
Staphylococcus aureus	1,19 (0,42-1,92)	**0,032**	1,21 (0,43-2,02)	**0,045**
Pseudomonas aeruginosa	1,58 (0,89-3,87)	0,567	1,61 (0,97-3,88)	0,594
Moraxella catarrhalis	1,66 (0,14-2,92)	0,137	1,16 (0,14-2,04)	0,146
Streptococcus pneumoniae	1,27 (0,21-3,55)	0,304	1,22 (0,13-3,64)	0,274

* OR standardiziran za dob i spol

Tablica 5.29. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod bolesnika s ACP-om u ovisnosti o mikrobiološkim uzročnicima u maksilarnom sinusu.

	OR (95%CI)	p	AOR (95%CI)*	p*
Staphylococcus aureus	1,64 (1,15-2,76)	0,542	1,73 (0,16-3,37)	0,683
Moraxella catarrhalis	1,32 (0,24-3,90)	**0,042**	1,09 (0,11-3,24)	0,149
Streptococcus pneumoniae	1,07 (0,02-3,95)	0,305	1,00 (0,15-3,73)	0,274

* OR standardiziran za dob i spol

Povećanje rizika nastanka patohistoloških promjena sluznice u kontrolnoj skupini bilo je statistički značajno povezano s nalazom istog patogenog uzročnika u kavumu i sinusu. *Staphylococcus aureus* u kavumu (OR=2,21, 95% CI 1,42-5,43, p=0,002) i *Staphylococcus aureus* u maksilarnom sinusu (OR=6,01, 95% CI 1,09-12,54, p=0,038) značajno su povećavali rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice, a rezultati su perzistirali i nakon standardizacije za dob i spol (AOR=1,60, 95% CI 1,13-4,78, p=0,005; AOR=5,96, 95% CI 1,93-13,81, p=0,046) (Tablice 5.30. i 5.31).

Tablica 5.30. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod ispitanika kontrolne skupine u ovisnosti o mikrobiološkim uzročnicima u kavumu.

	OR (95%CI)	**p**	**AOR (95%CI)***	**p***
Staphylococcus aureus	2,21 (1,42-5,43)	**0,002**	1,60 (1,13-4,78)	**0,005**

* OR standardiziran za dob i spol

Tablica 5.31. Rizik nastanka patohistoloških promjena sluznice kod ispitanika kontrolne skupine u ovisnosti o mikrobiološkim uzročnicima u maksilarnom sinusu.

	OR (95%CI)	**p**	**AOR (95%CI)***	**p***
Staphylococcus aureus	6,01 (1,09-12,54)	**0,038**	5,96 (1,93-13,81)	**0,046**

* OR standardiziran za dob i spol

6. Rasprava

U ovom istraživanju biofilma u ACP-a analizirani su upalni parametri uporabom triju izrazito različitih tehnika detekcije: skenirajuće elektronske mikroskopije, mikrobiološke kulture bakterija te patohistološke analize. Kod bolesnika s ACP-om te kod zdrave kontrolne skupine analizirana je bakterijska zastupljenost u oba njihova oblika, planktonskom i biofilmu, te postojanje upale sluznice maksilarnog sinusa. Sve veći broj dokaza implicira ulogu biofilma u patofiziologiji KRS-a, a kod ACP-a on nije istraživan (4, 98).

6.1. Demografska obilježja ispitanika

Bolesnici s ACP-om bili su statistički značajno mlađi nego ispitanici kontrolne skupine. Njihova srednja dob iznosila je 26,68 godina. Mlađa životna dob u skladu je s literaturom jer se ACP češće dijagnosticira u mlađe populacije, a jedno istraživanje čak navodi gotovo isti podatak - 27 godina (36, 47).

Statistički značajna razlika u spolu kod ACP-a prema literaturi nije prisutna, a u ovom radu je nije bilo jer je u njega uključeno po 20 bolesnika s ACP-om ženskog spola i 20 bolesnika s ACP-om muškog spola (41, 44).

6.2. Lokalizacija polipa s obzirom na stranu

U ovom istraživanju 25 (62,5%) bolesnika s ACP-om imalo je desnostrani, a 15 (37,5%) lijevostrani polip. Navedena razlika bila je granično značajna (p=0,052). U literaturi su desnostrani ACP-i također nešto češće zastupljeni, 55,5 % i 67%, ali postoji i lijevostrana dominacija od 57,7% (50, 55, 100). U najvećoj seriji ACP-a dostupnoj u literaturi (200 slučajeva ACP-a) nije bilo statistički značajne razlike s

obzirom na stranu (42). Ne postoje radovi koji objašnjavaju pojavnost ACP-a s obzirom na stranu pojavljivanja.

6.3. Proširenost ACP-a

I u maksilarnom sinusu i u nosnom kavumu bilo je lokalizirano 37,7% ACP-a, a 62,5% ACP-a se kroz koanu proširilo u epifarinks, što znači da je većina ACP-a „ulovljena“ u zrelom stadiju i time je bila jednostavnija za dijagnostiku. U samo dva slučaja (5%) ACP-i su svojim rastom dosegnuli i orofarinks, što znači da su bili iznadprosječne veličine.

6.4. Prisutnost biofilma i patohistološki nalaz uzorka sluznice

6.4.1. Prisutnost biofilma u ACP-u

Na sve tri ispitivane lokalizacije, na dijelu ACP-a u maksilarnom sinusu, na dijelu ACP-a u nosnoj šupljini i na sluznici maksilarnog sinusa nađen je biofim te je potvrđena hipoteza ovog istraživanja. Značajno najčešće biofilm je kod ACP-a bio prisutan na obje lokalizacije, u maksilarnom sinusu i u nosnom kavumu, i to u 72,5% bolesnika. Suprotno jednoj studiji u kojoj je opisan trend povećane prevalencije biofilma dublje u sinonazalnim šupljinama, u ovom je radu češće nađen u kavumu nego u maksilarnom sinusu (101).

Više istraživanja izvijestilo je o postojanju biofilma kod KRS-a korištenjem različitih metoda otkrivanja i u različitim tipovima KRS-a. Incidencija biofilma ovisno o istraživanju iznosi od 25% do 100% (4). U kroničnom rinosinuitisu bez nosnih polipa (CRSsNP) ona najčešće iznosi oko 75% (102). Incidencija biofilma u bolesnika s DNP-om je u usporedbi s CRSsNP značajno veća. To ukazuje na ulogu biofilma u patogenezi KRS-a, a posebno u DNP-u (Tablica 6.1) (7, 9, 98, 102).

Tablica 6.1. Incidencija biofilma u DNP-u u različitim studijama.

Studija	Pozitivan biofilm
	Bolesnici N (%)
Tóth i sur. (90)	22/27 (81,5)
Arild Danielsen i sur. (101)	33/34 (97,1)
Ramadan i sur. (67)	5/5 (100)

Incidencija biofilma kod ACP-a do sada nije istraživana pa bi ovim istraživanjem uloga biofilma u patogenezi ACP-a bila bar jednako značajna kao kod DNP-a, tim više što je ACP, za razliku od DNP-a, solitarna bolest koja se javlja na jednom mjestu, u maksilarnom sinusu. Nadalje, biofilm je kod ACP-a najčešće (72,5%) nađen na njegovu dijelu i u sinusu i u kavumu. Prema tome, kako je ACP, uz histološku građu, i po incidenciji biofilma vrlo sličan DNP-u, ne stoji pretpostavka ovog istraživanja da je ACP vrsta kroničnog maksilarnog sinuitisa, a ne podvrsta nosnih polipa. Zanimljivo je da bolesnici operirani zbog ACP-a pokazuju puno značajnije poboljšanje simptoma u odnosu na operirane zbog DNP-a (38)

Elektronskomikroskopske morfološke razlike biofilma na tri ispitivane lokalizacije, na dijelu ACP-a u maksilarnom sinusu, na dijelu u nosnoj šupljini i na sluznici maksilarnog sinusa nisu nađene i to se uklapa u pretpostavku ovog istraživanja. Vjerojatno je razlog tomu vrlo slična podloga (sluznica polipa i upalno promijenjena sluznica maksilarnog sinusa, poglavlje 6.4.3) i lokalizacijom vrlo slični uvjeti u kojima se biofilm razvijao.

6.4.2. Prisutnost biofilma na sluznici maksilarnog sinusa

Biofilm je na sluznici maksilarnog sinusa bio statistički značajno češće prisutan kod bolesnika s ACP-om nego kod ispitanika kontrolne skupine (57,5% vs. 5%). U

ovom istraživanju biofilm je nađen u 2 ispitanika kontrolne skupine sa zdravim sinusima. Prisutnost biofilma u dva ispitanika kontrolne skupine potvrdila je pretpostavku ovog istraživanja da se biofilm može naći i u zdravih osoba tj. u osoba koje nemaju kliničkih, endoskopskih i radioloških znakova KRS-a. Slične rezultate pokazalo je istraživanje Singha i sur. u kojem je biofilm nađen u 8% (4/50) ispitanika kontrolne skupine (78). Da bi se smanjila incidencija prividno zdravih ispitanika, u ovom radu su iz kontrolne skupine isključivani svi bolesnici kojima sluznica endoskopski nije izgledala uredno, imajući na umu podatak da je, kada je klinička sumnja mala (<50%) a endoskopija nosa negativna, vjerojatnost rinosinuitisa vrlo mala (<17%) (104). Nadalje, iz kontrolne su skupine isključivani svi bolesnici kojima je sluznica bila suspektna za uzimanja uzoraka ili su operirani zbog deformacije septuma ili sl., tj. bilo kojeg stanja koje implicira bilo kakvu rinološku ili maksilofacijalnu (uključujući i ortognatsku) problematiku. Međutim, od dva ispitanika kontrolne skupine s pozitivnim biofilmom jedan je prema Terrierovoj klasifikaciji imao hiperplastičnu, a drugi polipodnu sluznicu. Dakle može se reći da njihova sluznica histološki nije bila zdrava, ali to se moglo uvidjeti samo nakon uzimanja uzoraka.

Pozitivan nalaz biofilma u kontrolnim skupinama drugih istraživanja biofilma kod KRS-a varira od 0 do preko 50%. Različiti kriteriji za uključivanje u istraživanje, uzorkovanje, veličina i lokalizacija uzoraka sigurno su neki od razloga koji se mogu pripisati ovako velikoj razlici u incidenciji. Za većinu istraživanja bilo je dovoljno da se radi o bolesnicima koji su istovremeno s uzimanjem uzoraka bili operirani zbog deformacije septuma. Neki su uključivali ispitanike kojima je Lund Mackay zbroj (radiološki sistem stupnjevanja KRS-a) bio nula i/ili su imali uredan nalaz endoskopije nosa. S obzirom na lokalizaciju uzimanja uzoraka može se zaključiti da uzorci iz kavuma imaju veću vjerojatnost da budu pozitivni od onih koji su uzeti iz sinusa (28, 90, 101, 105). Nadalje, bitan je i komorbiditet koji može utjecati na stvaranje biofilma. U literaturi se najčešće spominje alergijski rinitis kod kojeg radi edema sluznice može doći do opstrukcije nosa i sinusa, a u nekim studijama nije bio isključni kriterij (103). Po velikoj raznolikosti pozitivnog nalaza biofilma u kontrolnim skupinama može se reći da one nisu bile dovoljno dobro definirane jer, ako ništa drugo, asimptomatski ispitanici ne moraju biti i zdravi.

Bakterije kao *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, a naročito *Staphylococcus aureus*, mogu smanjiti cilijarnu aktivnost i tako inducirati KRS (106). Sve tri ove bakterije bile su prisutne u maksilarnom sinusu bolesnika s ACP-om, što može objasniti i utvrđenu prisutnost bioflma u maksilarnom sinusu u velikom broju bolesnika s ACP-om, čak nešto većem od broja istih bolesnika bez biofilma.

6.4.3. Patohistološki nalaz uzoraka sluznice maksilarnog sinusa i biofilm

U kontrolnoj skupini najčešći patohistološki nalaz bio je tip 1 prema Terrierovoj klasifikaciji, a on predstavlja normoplastičnu sluznicu, tj. radi se o zdravoj sluznici sinusa i to je bilo očekivano. Zdrava sinonazalna sluznica, sa svojim cilijama i vrčastim stanicama, predstavlja prvu crtu obrane protiv udahnutih čestica i bakterija (107). Vrčaste stanice (20%) proizvode sluz, a cilijarne stanice (80%) svojim koordiniranim pokretima uklanjaju sluz i udahnute toksične agense. U KRS-u dolazi do poremećaja respiratornog epitela, a cilije se prorjeđuju ili čak nestanu pa se mukocilijarni klirens smanjuje (108). Drugim riječima, za normalnu funkciju sinusa, poglavito njihovu drenažu, jako je bitan uredan mukocilijarni klirens. Zna se da je mukocilijarna disfunkcija prisutna u oba fenotipa KRS-a (20, 80). I kod KRS-a povezanog s biofilmom ona pokazuje disfunkciju. U modelu sinuitisa na kunićima, Jia i sur. pratili su stvaranje biofilma nakon bakterijske inokulacije *Staphylococcus aureusom*. Najranije promjene koje su zabilježene već 1 tjedan nakon operacije bile su hiperplazija vrčastih stanica s posljedičnim povećanjem proizvodnje mukusa i istodobnim smanjenjem cilijarne aktivnosti (109). Ostale studije koje su istraživale prisutnost biofilma i oštećenje cilija pokazale su različit stupanj razaranja epitela, u rasponu od cilijarnog poremećaja do potpune odsutnosti cilija (108, 110). Još uvijek nije sasvim jasno prethodi li cilijarna disfunkcija biofilmu ili je ona posljedica njegova stvaranja. U kontrolnoj skupini ovog istraživanja značajna razlika utvrđena je jedino između tipa 1 i ostalih tipova po Terrieru ($p<0,001$), dok razlike učestalosti između ostalih (upalnih) tipova nije bilo. Tipovi 2 i 3, od svakog po jedan, bili su pozitivni na biofillm. Ti podaci podržavaju pretpostavku da stvaranje biofilma ne predstavlja početnu fazu upalnog procesa koji dovodi do djelomičnog oštećenja ili destrukcije

cilija, odnosno da biofilm nastaje na prethodno oštećenoj sluznici. Kako je u ovom istraživanju utvrđena statistički značajna negativna povezanost između biofilma na sluznici sinusa kontrolne skupine i nalaza tipa 1 po Terrieru (-4,192, p<0,001), već i na temelju ovih malih uzoraka time se ona i potvrdila. Drugim riječima, biofilm ne nastaje na histološki potpuno normalnoj sluznici. Međutim, ako cilije na bilo koji način nisu funkcionalne ili ih nema, povećan je rizik od stvaranja biofilma i drugih čimbenika rizika KRS-a, a biofilmovi mogu doprinijeti daljnjem oštećenju respiratornog epitela i naknadnoj hiperplaziji subepitelnog sloja (4, 90).

Kod bolesnika s ACP-om najčešće patohistološke promjene bile su tip 2 i tip 3 po Terrieru (87,5%). Može se reći da je to logičan nalaz i to iz dva razloga. Prvo, kako ACP potječe iz sluznice maksilarnog sinusa, njegovo hvatište za sluznicu treba biti upalno promijenjeno, a to tip 2 i tip 3 po Terrieru jesu. U oba tipa radi se o sluznici s respiratornim epitelom, umjereno do izrazito rahle, edematozne strome, prožete kroničnim upalnim infiltratom. Vrlo slične histološke građe je i ACP, s tim da je upalni infiltrat kod njega nešto manje izražen. Stoga se može zaključiti da je time potvrđena pretpostavka ovog istraživanja da se patohistološki nalazi triju navedenih lokalizacija u smislu kronične upale međusobno ne razlikuju. Drugo, kako ACP po definiciji gotovo u cijelosti ili u cijelosti ispunjava maksilarni sinus, onda je i očekivano da se u njemu teško može razviti isključivo polipozna sluznica jer je lumen sinusa ispunjen ACP-om. Vjerojatno je zato samo u dva slučaja (5%) kod bolesnika s ACP-om nađen tip 4 po Terrieru.

Nadalje, ovo istraživanje pokazalo je još izraženiju pozitivnu povezanost između biofilma u bolesnika s ACP-om i nalaza tipa 2 po Terrieru (6,008, p<0,001), što znači da se vjerojatnost za postojanje biofilma povećava s patohistološkim promjenama sluznice, a može se reći i da se logično nadovezuje na pretpostavku da na histološki potpuno normalnoj sluznici nema nikakvih tragova biofilma.

6.5. Nalaz mikrobiološkog obriska i uzročnika

6.5.1. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u kavumu

Pozitivan mikrobiološki obrisak kavuma utvrđen je u 6 (15%) ispitanika kontrolne skupine s pozitivnim nalazom obrisaka kavuma (i to iz srednjeg nosnog hodnika), kod jednoga su utvrđena dva uzročnika, a kod preostalih samo jedan. Najčešći uzročnik bio je *Staphylococcus aureus* (3/40, 7,5%), potom *Staphylococcus epidermidis* (2/40, 5%) i *Streptococcus pneumoniae* (1/40, 2,5%). Normalna flora tog mjesta najčešće uključuje *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, a *Streptococcus pneumoniae* je potencijalni patogen za akutnu upalu koji se rijetko izolira iz zdravih nosnih kavuma (111). *Staphylococcus aureus* u nosnom se kavumu asimptomatskih osoba smatra samo potencijalnim patogenom (112). Pozitivan mikrobiološki obrisak kavuma utvrđen je u statistički značajno većem broju bolesnika s ACP-om nego u ispitanika kontrolne skupine. U 9 (22,5%) bolesnika s ACP-om utvrđena su dva uzročnika u kavumu, što govori u prilog činjenici da je polimikrobna infekcija češća kod KRS-a, koji je često sinergistička infekcija (111). Najčešće otkriveni uzročnik u kavumu i u ovoj skupini bio je *Staphylococcus aureus* (42,5%), a prema literaturi on je prisutan u oko 50% bolesnika s KRS-om (20, 113). *Staphylococcus aureus* znan je kao značajan patogen u KRS-u i prije nego što je povezan s biofilmom, a njegova se višestruka uloga u patogenezi KRS-a neprestano usavršava (111). To je najčešće kultivirani mikroorganizam u vrijeme operacije, ali i u postoperacijskom razdoblju kod bolesnika s KRS-om (8). *Staphylococcus aureus* posjeduje različita za sluznicu sinusa patobiološka svojstva, uključujući poremećaj epitelne membrane (113). Tako npr. njegovi toksini imaju važnu ulogu u patogenezi KRS-a poglavito ciliostatskim učincima, a može i mijenjati svoj fenotip nakon internalizacije u epitelne stanice, usvajajući virulentniji fenotip, i tako razviti pojačanu otpornost na antibiotike (23, 106).

Iako nije primarni infektivni proces, bakterije su univerzalno prisutne u KRS-u i vjerojatno doprinose njegovoj postojanosti. U KRS-u prisutnost izmijenjenog epitela, cilijarna disfunkcija i hiperplazija sluznice doprinose prekomjernom razvoju bakterija i to, u konačnici, dovodi do stvaranja bakterijskih biofilmova (27).

6.5.2. Mikrobiološki obrisak i vrste uzročnika u maksilarnom sinusu

Podrijetlo mikroorganizama koji se nađu u sinusima u pravilu je nosni kavum, a sljedeći uzrok može biti odontogena infekcija tj. širenje infekcije iz vrhova korijena molara i premolara gornje čeljusti (111). Uzročnika karakterističnih za odontogene maksilarne sinuitise u ovom radu nije bilo.

Ovo je istraživanje pokazalo predominaciju sterilne sluznice maksilarnog sinusa u ispitanika kontrolne skupine. Pozitivan mikrobiološki obrisak u maksilarnom sinusu ispitanika kontrolne skupine nađen je u 3 ispitanika (7,5%). Kod sva 3 utvrđen je samo jedan uzročnik, i to *Staphylococcus aureus* kod dvojice (5%), a *Staphylococcus epidermidis* kod jednog ispitanika (2,5%). Velika prevalencija sterilnih maksilarnih sinusa (82,14%) kod asimptomatskih osoba s endoskopski normalnom sluznicom opisana je i u radu Abou-Hamada i sur. (114). Sukladno prethodnim istraživanjima o sterilnosti, i ovo je pokazalo da zdravi sinusi nisu značajno povezani s mikrobnom zajednicom (144, 115).

Sva 3 ispitanika kontrolne skupine s pozitivnim nalazom obriska sinusa imali su iste uzročnike i u kavumu. Araújo i sur. objavili su da 80% kultura prikupljenih punkcijom maksilarnog sinusa pokazuje rast istih mikroorganizama koji su nađeni i u nosnom kavumu (srednji nosni hodnik). Ti isti autori sugeriraju da je kultura napravljena iz endoskopije srednjeg hodnika jednostavnija alternativa od uzimanja obrisaka iz maksilarnog sinusa jer je neinvazivna i dovoljno učinkovita metoda identifikacije patogena uključenih u KRS (112). Istraživanje koje su proveli Orobello i sur. na bolesnicima pedijatrijske dobi pokazalo je visoku povezanost kultura iz sekreta srednjeg nosnog hodnika u odnosu na sekret prikupljen iz maksilarnog sinusa, a iznosila je 83% (116). Kako se u srednji nosni hodnik drenira maksilarni sinus (i prednji etmoid te frontalni sinus), logično je da bakterijska flora ovog područja odražava mikrobiologiju tog (tih) paranazalnih sinusa. Oba ova istraživanja o povezanosti rezultata iz kultura dobivenih iz srednjeg hodnika nosnog kavuma i maksilarnog sinusa sugeriraju da se antibiogrami kultura iz srednjeg hodnika nosnog kavuma mogu koristiti u rutinskom radu i praćenju bolesnika s KRS-om, naročito

maksilarnim, kako bi se minimalizirao neuspjeh u liječenju i povećala učinkovitost uporabe antibiotika.

Pitanje postoji li bakterijska flora u zdravim sinusima još je kontroverzno. Prema nekim autorima sinusi se smatraju sterilnima kod zdravih pacijenata (1). Komunikacija sinusa s nosnom šupljinom kroz njihova ušća mogla bi omogućiti organizmima koji borave u nosnim šupljinama i nazofarinksu da se šire u sinus. Nakon zatvaranja ostiuma, ove bakterije mogu se uključiti u upalu. Prema drugim autorima patogeni mikroorganizmi jesu izolirani iz zdravih sinusa (28). Često su tim studijama u kontrolnu skupinu uključivani ispitanici koji su operirani zbog deformacije septuma s hipertrofijom donjih školjki ili bez nje, a oba ova stanja mogu pogodovati opstrukciji normalne ventilacije i drenaže sinusa i tako pridonijeti razvoju upale pa je upitno koliko su takvi ispitanici pogodni za uključivanje u kontrolne skupine sa zdravom sluznicom. Nadalje, sva 3 ispitanika kontrolne skupine s pozitivnim nalazom obriska sinusa u ovom istraživanju, uz uredan CT i endoskopski nalaz, nisu imali histološki zdravu sluznicu jer su, po Terrierovoj klasifikaciji, 2 imali hiperplastičnu, a 1 polipodnu sluznicu te je u dvoje njih nađen i biofilm. Svi ostali ispitanici kontrolne skupine, njih 92,5%, imali su normoplastičnu sluznicu te biofilm kod njih nije nađen. Prema tome, da bi se uistinu dokazao pozitivni mikrobiološki obrisak kod zdravih sinusa, pitanje je koliko daleko treba ići u definiranju zdravih sinusa. Teoretski bi trebalo isključiti histološku sliku upale te biofilm.

Nadalje, ovo istraživanje pokazalo je da je učestalost mikroorganizama u maksilarnom sinusu značajno veća kod bolesnika s ACP-om u usporedbi s kontrolnom skupinom, 85% prema 15%. Jedno ispitivanje kronično upaljenih maksilarnih sinusa kod pacijenata s DNP-om pokazalo je da je rast bakterija bio prisutan u 96% (46/48). Prevladavajući aerobni bili su: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Moraxella catarrhalis* (111). Svi oni nađeni su i u maskilarnom sinusu kod ACP-a. Ovi nalazi sugeriraju da je mikrobiološka flora maksilarnog sinusa kod DNP-a vrlo slična onoj u ACP-a, što govori u prilog da je ACP podvrsta nosnih polipa. Višestruko veća učestalost *Staphylococcus aureusa* u bolesnika s ACP-om u odnosu na kontrolnu skupinu u skladu je s literaturom (111).

Ono što uvijek treba imati na umu jest da standardno laboratorijsko kultiviranje ima tendenciju polarizacije detektiranih mikroorganizama, pa tako iskaču brojni, brzorastući aerobni organizmi s povoljnim karakteristikama rasta, kao što je *Staphylococcus aureus* (86). Standardne tehnike kultiviranja uključuju uzorkovanje površine sinonazalne sluznice i zatim uzgoj mikrorganizama na mediju za rast ili u njemu. One su i dalje osjetljive, jeftine i omogućuju *in vitro* određivanje osjetljivosti patogena na antibiotike. Međutim, ove tehnike često ne obuhvaćaju čitavu mikrobnu raznolikost u uzorku, jer kultura ne može osigurati uvjete potrebne za rast mnogih prisutnih organizama. Prethodna uporaba antibiotika i, posebno, teškoća u razlikovanju koje bakterije su kolonizatori i koje su zaista patogeni, predstavljaju dodatni mikrobiološki problem u kliničkoj praksi.

6.6. Korelacije nalaza biofilma s patohistološkim promjenama

Korelacije nalaza biofilma ACP-a u sinusu i kavumu te biofilma na sluznici sinusa s patohistološkim promjenama sluznice kod bolesnika s ACP-om nisu utvrđene. To bi se možda moglo objasniti činjenicom da se biofilm gotovo uvijek (96,1%) nalazio na upalno promijenjenoj sluznici maksilarnog sinusa. Što se tiče DNP-a, iako se smatra da je bolest multifaktorijalne etiologije, trajna kronična upala nesumnjivo je glavna komponenta ove bolesti (98). *Staphylococcus aureus* npr. ne samo da kolonizira sluznicu, već stvara biofilmove koji adheriraju na inflamiranu i oštećenu sluznicu kako bi poslužili kao rezervoar za buduće planktonske bakterije koje će se iz biofilma osloboditi i ponovno inficirati sluznicu (7, 98). I kod ACP-a je slična situacija s obzirom na patohistološke promjene sluznice sinusa.

6.7. Korelacije nalaza biofilma s mikrobiološkim uzročnicima

Veza između biofilma i upalnog odgovora sinusne sluznice još uvijek je slabo razumljiva (28). Bakterijski biofilmovi vjerojatno su ključni modulator refraktorne prirode KRS-a (23). Razne bakterijske vrste povezane su s biofilmovima u KRS-u, uključujući *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* (86, 103). Sve one izolirane su i u ovom istraživanju.

Bakterijski biofilmovi detektirani su na sluznici sinusa do 80% bolesnika s KRS-om (18, 95). Uobičajene vrste identificirane u biofilmovima uključuju *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, a svi ovi uzročnici mikrobiološki su nađeni i u bolesnika s ACP-om.

U kontekstu KRS-a jedan od mogućih mehanizama pomoću kojih biofilmovi mogu djelovati jest oslobađanje planktonskih organizama i proizvodnja superantigena, što može uzrokovati daljnju cilijarnu disfunkciju i inhibiciju mukocilijarnog klirensa (86, 87, 108). *Staphylococcus aureus*, dominantan u većini biofilmova koji se nalaze u sinonazalnim šupljinama, izoliran je u oko 50% uzoraka KRS-a. Pokazano je da ovaj patogen, u *in vitro* studijama, postoji i intracelularno u stanicama sluznice, možda i tako djeluje kao rezervoar za trajnu infekciju (89, 101). Vjerojatno su stoga biofilmovi *Staphylococus aureusa* najpovezaniji s teškim, rekurirajućim slučajevima KRS-a (98, 117). Nadalje, *Staphylococcus aureus* je i najčešći mikroorganizam koji stvara biofilm pronađen na intraoperativnim uzorcima sluznice, a takvi bolesnici nakon ESS-a imaju najlošije subjektivne i objektivne rezultate (25, 117). Jedan od glavnih razloga vjerojatno je činjenica da ESS ne utječe značajno na poboljšanje mukocilijarne funkcije u KRS bolesnika s biofilmom (118). Stoga je danas općeprihvaćeno da je prisutnost *Staphylococcus aureus* biofilma povezana s lošom prognozom bolesti i nepovoljnim kliničkim ishodom, poput perzistentnih simptoma rinosinuitisa i visokim rizikom od ponavljajućih infekcija (103). S druge strane kirurgija može omogućiti pristup eventualnoj lokalnoj terapiji usmjerenoj na bakterijske biofilmove koji su uključeni u postojanost KRS-a (119). Planktonski oblik bakterija uvelike je pomogao poboljšati naše razumijevanje akutnih infekcija. Recentna istraživanja pokazuju važnu ulogu bakterijskih biofilmova u ponavljajućim ili kroničnim infekcijama, uključujući one koje ne reagiraju na antibiotsku terapiju koja odgovara kulturi bakterija. Moguća uloga *Staphylococcus aureusa* u DNP-u sugerirana je brojnim istraživanjima koja su pokazala prisutnost imunoglobulinskih (Ig) E antitijela protiv enterotoksina i upalnih promjena u nosnom

polipu. Ova bakterija, a vjerojatno i druge, proizvodi toksine koji djeluju kao superantigeni i konvencionalni alergeni, vjerojatno pružajući početni okidač za upalu sluznice nosa. Biofilmovi mogu biti rezervoar bakterija odgovornih za kronične i trajne upale (9, 98).

U ovom istraživanju je kod bolesnika s ACP-om *Staphylococcus aureus* bio najčešće izolirani mikroorganizam, po čemu ACP odgovara KRS-u (44, 86).

6.8. Univarijantna i multipla logistička regresija

Jačina i neovisnost povezanosti nastanka patohistoloških promjena sluznice i ispitivanih varijabli procijenjeni su logističkom regresijom. Glavni prediktori i indikatori patohistoloških promjena sluznice kod bolesnika s ACP-om u ovom istraživanju su bili uzročnici *Staphylococcus aureus* u kavumu i *Moraxella catarrhalis* u maksilarnom sinusu, odnosno *Staphylococcus aureus* u kavumu i u maksilarnom sinusu kod ispitanika kontrolne skupine. *Staphylococcus aureus* je u obje ispitivane skupine značajno povećavao rizik za nastanak patohistoloških promjena čak i nakon što su rezultati standardizirani prema dobi i spolu.

Moraxella catarrhalis je isključivo ljudski patogen koji se češće javlja u mlađe populacije te uzrokuje 15-20% akutnih otitisa i oko 20% slučajeva akutnog bakterijskog sinuitisa u dojenčadi i djece (120). U ovom radu dokazana je kod mlađih bolesnika s ACP-om: njihova prosječna dob iznosila je 22,25 godina. Biofilm kod KRS-a povezan s *Moraxellom catarrhalis* u litraturi se iznimno rijetko spominje pa je moguće da ovaj statistički značajan rezultat nema nikakvo kliničko značenje (103). S druge strane, ovi rezultati mogu ukazivati na to da pozitivan mikrobiološki obrisak implicira oštećenje sluznice bakterijama kao što je *Staphylococcus aureus*, koji ima za posljedicu nastanak početnih patohistoloških promjena na kojima nastaje biofilm koji zapravo nije pokretač patohistoloških promjena i zato nije regresijskom analizom utvrđen kao prediktor patohistoloških promjena.

6.9. Kliničke implikacije biofilm pozitivnog kroničnog rinosinuitisa

Kliničke infekcije biofilmom mnogo su veći terapijski problem od infekcija uzrokovanih planktonskim oblikom bakterija. Nadalje, postojani biofilmovi u slučajevima DNP-a mogu biti odgovorni za kirurški neuspjeh i visoku stopu recidiva bolesti (21). Bolesnici s biofilm pozitivnim KRS-om imaju lošije objektivne kliničke pokazatelje bolesti i teže simptome. Tako npr. bolesnici s biofilm pozitivnim KRS-om imaju značajno veći Lund-McKay zbroj (radiološki sistem stupnjevanja KRS-a) nego oni bez biofilma (122). Danas se smatra da je do 50% kandidata za operativni zahvat zbog KRS-a pozitivno na biofilm, a u jednoj studiji je biofilm bio prisutan u čak 80% pacijenata koji su bili podvrgnuti operaciji (ESS) zbog KRS-a (2, 95). U njih su i značajno lošiji rezultati u kvaliteti života nakon ESS-a u usporedbi s biofilm negativnim bolesnicima s KRS-om (122). Uz to, za njih brojne studije pokazuju znatno lošiji objektivni status na postoperacijskoj endoskopiji nosa, više naknadnih posjeta liječniku i dodatnih antibiotskih terapija u usporedbi s biofilm negativnim bolesnicima s KRS-om (25, 28, 80, 87). Tako je npr. multiinstitucionalna prospektivna kohortna studija iz 2010. godine pokazala da 20-30% pacijenata koji su bili podvrgnuti ESS-u nije imalo klinički značajno poboljšanje (123). Kirurgija ne poboljšava značajno mukocilijarnu funkciju sinusa sluznice u kroničnom maksilarnom sinuitisu (113, 118). Kod gotovo 80% bolesnika s DNP-om tijekom 12 godina razvija se barem jedan recidiv nakon potpune operacije svih paranazalnih sinusa i uklanjanja svih polipa. Oko 50% tih bolesnika mora se podvrgnuti barem još jednoj operaciji (7). Prisutnost biofilma u KRS-u također je povezana s većim rizikom od recidiva i revizijskih operacija (4). To se naročito odnosi na biofilm koji sadrži *Staphylococcus aureus* jer takvi bolesnici imaju najsloženiji postoperacijeki tijek (8, 80). Biofilmovi *Staphylococcus aureusa* igraju dominantnu ulogu u negativnom utjecaju na rezultate ESS-a uz postojanost postoperativnih simptoma, tvrdokornu upalu sluznice i infekcije (25). Valja naglasiti i otpornost biofilma na gotovo sve oblike sterilizacije (26).

Dijagnoza infekcija povezanih s biofilmom složena je i trebala bi kombinirati različite pristupe i multidisciplinarnost. Da napredak ipak postoji, govori podatak da je Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti (ESCMID) izdalo

smjernice za pomoć kliničarima u dijagnozi infekcija povezanih s biofilmom. Te smjernice naglašavaju kombinaciju kliničke i laboratorijske dijagnostike. Općenito, klinička dijagnoza može uključivati kliničke znakove, povijest bolesti, neuspjeh antibiotske terapije i trajnu infekciju. Kod KRS-a u dijagnostiku su uključeni elektronska mikroskopija i fluorescentna mikroskopija (124). To znači da se biofilm kod KRS-a još uvijek ne može rutinski dijagnosticirati jer je oprema za te pretrage skupa i rijetka, a traži stručnost i oduzima puno vremena, pa nije moguće istovremeno pregledati mnoge uzorke. Nadalje, postavlja se i pitanje uzimanja uzoraka za dijagnostiku.

Liječenje biofilm pozitivnog KRS-a je teško, terapijske strategije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene, pa ni specifični i standardni modaliteti za liječenje biofilma još nisu dostupni (90). Antibiotici kao što su ceftazidim, piperacilin, ciprofloksacin i vankomicin nisu učinkoviti ako se daju sistemski u tipičnim koncentracijama, a veće koncentracije tih lijekova najčešće nisu klinički sigurne, jer bi za postizanje učinka trebalo povećati dozu 60-1000 puta. Topička terapija je za sada učinkovitija. Pokazano je da mupirocin smanjuje masu biofilma, ali se ne zna koliko je trajan njegov učinak. Makrolidi inhibiraju *quorum sensing* u *Pseudomonas aeruginosa*, a furosemid, koji djeluje kao blokator kationskih kanala, također smanjuje veličinu biofilma. Kortikosteroidi su pokazali određeni učinak na stvaranje biofilma, posebno kod *Staphylococcus aureusa* (4). Kako se naše razumijevanje KRS-a i uloge koju biofilm ima u njegovu razvoju produbljuje, moći ćemo ciljati na specifične uzroke perzistentnih KRS-a sa species i mehanizam specifičnim načinima liječenja.

Liječenje KRS-a, još uvijek primarno u domeni otorinolaringologa, vjerojatno će, i zahvaljujući biofilmu, u budućnosti imati veći timski angažman. Daljnje razumijevanje interakcije biofilma i ponašanja mikroorganizama omogućit će buduće načine liječenja ove bolesti. Kliničari moraju poboljšati svoje znanje o imunologiji kako bi imali dovoljno znanja o dijagnostici i terapiji. Načelo endotipizacije treba integrirati barem u bolesnika s teškim respiratornim bolestima u svakodnevnoj praksi, pročistiti dijagnostiku biomarkerima i razumjeti indikacije i nuspojave biologije u pozadini patofiziologije. Tek tako ćemo našim bolesnicima ponuditi mogućnosti suvremenog liječenja.

6.10. Ograničenja istraživanja

Ova studija ima nekoliko ograničenja. Prvo je ograničenje njegov presječni dizajn. Presječna istraživanja, za razliku od prospektivnih, ne omogućuju procjenu vremenskog slijeda događaja, što onemogućuje zaključke o uzročno-posljedičnoj povezanosti između rizičnih čimbenika i razvoja bolesti. S druge strane ACP je moguće otkriti tek kada se razvije, tj. kada postoji i njegov dio u nosnom kavumu. Čak je i nosna opstrukcija povezana s rastom polipa manja u bolesnika s ACP-om u odnosu na DNP, što znači da ACP vjerojatno sporije raste i da će se bolesnici s ACP-om javiti liječniku kad ACP dosegne značajnu veličinu u kavumu (41). Probir za ovu dijagnozu se ne radi. Moguće ga je raditi samo CT-om ili MR-om, a ukoliko bi se i radio, radiološki bi se ACP ograničen na maksilarni sinus vrlo teško mogao razlikovati od ostalih polipoznih i/ili cističnih promjena u maksilarnom sinusu. Drugo, u ovom istraživanju je broj ispitanika u pojedinim podskupinama Terrierove klasifikacije bio relativno malen, zbog čega je i snaga određenih statističkih analiza bila niska. To se odnosi na tip 1 u skupini bolesnika s ACP-om te tip 3 i tip 4 u kontrolnoj skupini. Međutim, s obzirom na raspodjelu tipova može se pretpostaviti da bi ona bila ista jer je teško očekivati veću učestalost tipa 1 u bolesnika s ACP-om zbot toga što on podrazumijeva zdravu sluznicu, a ACP je podtip KRS-a. Obrnuto, veća učestalost tipa 3 i tipa 4 podskupine Terrierove klasifikacije u kontrolnoj skupini također se ne može očekivati jer oni podrazumijevaju histološki najizraženije promjene sluznice maksilarnog sinusa. Vrlo je malen broj studija u literaturi koje su imale veći broj slučajeva ACP-a od ovog istraživanja, koje je pokazalo neke važne karakteristike mikrobioma ACP-a. Daljnje istraživanje funkcije biofilma i njegove uloge u etiopatogenezi ACP-a omogućit će bolju kvalitetu liječenja kako ACP-a tako i KRS-a.

7. Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Biofim je nađen u ACP-a i to na sve tri ispitivane lokalizacije, na dijelu ACP-a u maksilarnom sinusu, na dijelu ACP-a u nosnoj šupljini i na sluznici maksilarnog sinusa.

2. Elektronskomikroskopske morfološke razlike biofilma na tri ispitivane lokalizacije, na dijelu ACP-a u maksilarnom sinusu, dijelu u nosnoj šupljini i na sluznici maksilarnog sinusa, nisu nađene.

3. Patohistološki nalazi triju navedenih lokalizacija u smislu kronične upale međusobno se ne razlikuju.

4. S obzirom na incidenciju biofilma i histološku građu, ACP je podvrsta nosnih polipa, a ne vrsta kroničnog maksilarnog sinuitisa.

5. Biofilm se može naći i u zdravih osoba tj. onih bez kliničkih i radioloških znakova KRS-a.

8. Sažetak

Biofilm ima važan utjecaj u patofiziologiji kroničnog rinosinuitisa (KRS). Antrokoanalni polip (ACP) predstavlja izolirani entitet koji pripada u KRS.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je utvrditi ima li elektronskomikroskopskih znakova biofilma u ACP-u te u maksilarnom sinusu kod bolesnika s ACP-om i ispitanika kontrolne skupine. Nadalje, postojanje biofilma na navedenim lokalizacijama uspoređeno je s patohistološkim nalazom uzoraka sluznice kako bi se utvrdilo stanje sluznice na kojoj se biofilm javlja. Analizirana je i mikrobiološka flora u nosnom kavumu i u maksilarnom sinusu.

Nacrt studije

Presječno istraživanje.

Materijal i metode

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 80 osoba obaju spolova životne dobi iznad 18 godina: 40 bolesnika s ACP-om i 40 ispitanika kontrolne skupine (bolesnici koji su kroz zdrave sinuse operirani zbog drugog patološkog supstrata). Analizirana je bakterijska zastupljenost u oba njihova oblika, planktonskom i biofilmu, te postojanje upale sluznice maksilarnog sinusa. Uzorci tkiva dijela ACP-a u maksilarnom sinusu, dijela ACP-a u nosnom kavumu te sluznice maksilarnog sinusa analizirani su patohistološki i skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Nalazi patohistološke analize razvrstani su u skupine prema Terrierovoj klasifikaciji kronične upale sluznice maksilarnog sinusa. Svim je ispitanicima uzet mikrobiološki obrisak nosnog kavuma i maksilarnog sinusa.

Rezultati

Provedenim istraživanjem biofilm je utvrđen na sve tri lokalizacije kod bolesnika s ACP-om i na sluznici maksilarnog sinusa kod ispitanika kontrolne skupine, ali statistički značajno rjeđe, u 5% ispitanika, i nikad u tipu 1 po Terrieru. Pozitivan mikrobiološki obrisak utvrđen je u statistički značajno većem broju bolesnika s ACP-om nego u ispitanika kontrolne skupine i u kavumu i u maksilarnom sinusu. Najčešće otkriveni uzročnik na obje lokalizacije bio je *Staphylococcus aureus*, najčešći i najvažniji patogen u KRS-u.

Zaključak

Kod ACP-a postoji značajna prevalencija biofilma: potvrđen je u 95% slučajeva. Na tri ispitivane lokalizacije nisu nađene elektronskomikroskopske morfološke razlike biofilma, kao ni razlike patohistoloških nalaza u smislu kronične upale. Biofilm je utvrđen i u zdravih osoba, tj. onih bez kliničkih i radioloških znakova KRS-a. U ispitanika kontrolne skupine prevladavao je nalaz sterilne sluznice maksilarnog sinusa.

Ključne riječi: antrokoanalni polip; biofilm; kronični rinosinuitis

9. Summary

Biofilm in anthrocoanal polyps

Biofilm has an important role in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis (CRS). The anthrocoanal polyp (ACP) is a distinct entity within the CRS.

Objectives

The aim of the study was to determine whether there were electron-microscopic signs of biofilm in ACP and in the maxillary sinus in the patients with ACP and in the control group. Furthermore, the existence of the biofilm at the above mentioned localizations was compared with the histopathological findings of the mucosal specimens, to determine status of the mucosa on which the biofilm occurs. Microbial flora in the nasal cavum and in the maxillary sinus was also analyzed. kako bi se utvrdilo stanje sluznice na kojoj se biofilm javlja

Study Design

Cross-sectional study.

Material and Methods

A total of 80 individuals of both sexes over the age of 18 were included in the study: 40 patients with ACP and 40 control group members (patients undergoing surgery through healthy sinuses, for another pathological substrate). The bacterial distribution in both their planktonic and biofilm forms and the presence of mucosal inflammation of the maxillary sinus were analyzed. Tissue samples of the ACP part in the maxillary sinus, the ACP part in the nasal cavum and the mucosa of the maxillary sinus were analysed pathohistologically and by scanning electron-microscopic examination. The findings of the pathohistological analysis were grouped according to the Terrier classification of chronic mucosal inflammation of the maxillary sinus. A

microbiological swab of the nasal cavum and maxillary sinus was collected from all the patients.

Results

The research resulted in finding the biofilm in all three localizations in ACP patients and in the mucosa of the maxillary sinus of the control group but statistically significantly less frequently, in 5% of the control group and never in Terrier type 1. The positive microbial swab was found in the statistically significantly greater number of patients with ACP, than in the control group, in both the cavum and the maxillary sinus. The most commonly detected microorganism in both localizations was *Staphylococcus aureus*, the most common and the most important pathogen in CRS.

Conclusion

ACP has a significant prevalence of biofilm, confirmed in 95% of cases. Neither the electron-microscopic morphological differences of the biofilm at the three investigated localizations, nor the pathohistological findings of the three mentioned localizations in terms of chronic inflammation differ from each other. Biofilm was also found in control group, i.e. those without clinical and radiological signs of CRS. Furthermore, the study showed the predominance of sterile maxillary sinus mucosa in the control group.

Keywords: anthrocoanal polyp; biofilm; chronic rhinosinuitis

10. Literatura

1 Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, i sur. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. J Allergy Clin Immunol. 2004;114(6 Suppl):155-212.

2 Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH, Smith TL, Alt JA, Baroody FM, i sur. International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis. Int Forum Allergy Rhinol. 2016;6Suppl1:S22-209.

3 Rosenfeld RM, Andes D, Bhattacharyya N, Cheung D, Eisenberg S, Ganiats TG, i sur. Clinical practice guideline: adult sinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg. (2007) 137, S1-S31.

4 Maina IW, Patel NN, Cohen NA. Understanding the role of biofilms and superantigens in chronic rhinosinusitis. Curr Otorhinolaryngol Rep. 2018;6(3):253-62.

5 Smith TL, Litvack JR, Hwang PH, Loehrl TA, Mace JC, Fong KJ, i sur. Determinants of outcomes of sinus surgery: a multi-institutional prospective cohort study. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;142(1):55-63.

6 Chowdhury NI, Mace JC, Smith TL, Rudmik L. What drives productivity loss in chronic rhinosinusitis? A SNOT-22 subdomain analysis. Laryngoscope. 2018 Jan;128(1):23-30.

7 Bachert C, Holtappels G. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis, pharmaceutical therapy options. GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg. 2015;14:Doc09.

8 Foreman A, Wormald PJ. Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. Laryngoscope. 2010;120:1701-6.

9 Cantone E, Negri R, Roscetto E, Grassia R, Catania MR, Capasso P, i sur. In vivo biofilm formation, gram-negative infections and TAS2R38 polymorphisms in CRSw NP patients. Laryngoscope. 2018;128(10):E339-E45.

10 Bachert C, Van Bruaene N, Toskala E, Zhang N, Olze H, Scadding G, i sur. Important research questions in allergy and related diseases: 3-chronic rhinosinusitis and nasal polyposis - a GALEN study. Allergy. 2009;64(4):520-33.

11 Tomassen P, Newson RB, Hoffmans R, Lötvall J, Cardell LO, Gunnbjörnsdóttir M, i sur. Reliability of EP3OS symptom criteria and nasal endoscopy in the assessment of chronic rhinosinusitis-a GA² LEN study. Allergy. 2011;66(4):556-61.

12 Cohen NA, Widelitz JS, Chiu AG, Palmer JN, Kennedy DW. Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease. Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;134(4):601-4.

13 Rudmik L. Economics of Chronic Rhinosinusitis. Curr Allergy Asthma Rep. 2017;17(4):20.

14 Bhattacharyya N, Orlandi RR, Grebner J, Martinson M. Cost burden of chronic rhinosinusitis: a claims-based study. Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;144(3):440-5.

15 Foreman A, Jervis-Bardy J, Wormald PJ. Do biofilms contribute to the initiation and recalcitrance of chronic rhinosinusitis? Laryngoscope. 2011;121(5):1085-91.

16 Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, i sur. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. Rhinol Suppl. 2012;(23):1-298.

17 Marple BF. FDA Guidance on sinusitis and its potential impact on treatment. ENT Today. 2008;13:3-4.

18 Foreman A, Boase S, Psaltis A, Wormald PJ. Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. Curr Allergy Asthma Rep. 2012;12(2):127-35.

19 Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, Hamilos DL, Jacobs M, Kennedy DW, i sur. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. Otolaryngol Head Neck Surg 2003;129S:S1-S32.

20 Lam K, Schleimer R, Kern RC. The etiology and pathogenesis of chronic rhinosinusitis: a review of current hypotheses. Curr Allergy Asthma Rep. 2015;15(7):41.

21 Ragab A, Essa N, El-Raghy N, Zahran W, El Borolsy A. Evaluation of bacterial adherence and biofilm arrangements as new targets in treatment of chronic rhinosinusitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2012;269(2):537-44.

22 Lin YH, Chang TS, Yao YC, Li YC. Increased risk of chronic sinusitis in adults with gastroesophgeal reflux disease: a nationwide population-based cohort study. Medicine (Baltimore). 2015;94(39):e1642.

23 Fastenberg JH, Hsueh WD, Mustafa A, Akbar NA, Abuzeid WM. Biofilms in chronic rhinosinusitis: pathophysiology and therapeutic strategies. World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg. 2016;2(4):219-29.

24 Bhattacharyya N. Incremental health care utilization and expenditures for chronic rhinosinusitis in the United States. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011;120:423-7.

25 Singhal D, Foreman A, Jervis-Bardy J, Wormald PJ. Staphylococcus aureus biofilms: Nemesis of endoscopic sinus surgery. Laryngoscope. 2011;121(7):1578-83.

26 Smith KA, Pulsipher A, Gabrielsen DA, Alt JA. Biologics in chronic rhinosinusitis: an update and thoughts for future directions. Am J Rhinol Allergy. 2018;32(5):412-23.

27 Kennedy JL, Borish L. Chronic rhinosinusitis and antibiotics: the good, the bad, and the ugly. Am J Rhinol Allergy. 2013;27(6):467-72.

28 Bezerra TF, Padua FG, Gebrim EM, Saldiva PH, Voegels RL. Biofilms in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;144(4):612-6.

29 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. 2014;37(3):871-9.

30 Cho SH, Kim DW, Gevaert P. Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps. J Allergy Clin Immunol Pract. 2016;4(4):575-82.

31 Pearlman AN, Chandra RK, Conley DB, Kern RC. Epidemiology of nasal polyps. U: Onerci TM, Freguson BJ, ur. Nasal polyposis - pathogenesis, medical and surgical treatment. Berlin Heidelberg: Springer, 2010; str. 9-15.

32 Wallace DV, Dykewicz MS. The diagnosis and management of rhinitis: An updated practice parameter. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:S1-84.

33 Peters AT, Spector S, Hsu J, Hamilos DL, Baroody FM, Chandra RK, i sur. Diagnosis and management of rhinosinusitis: a practice parameter update. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014;113(4):347-85.

34 Anon J. Report of the Rhinosinusitis Task Force Committee Meeting. Alexandria, Virginia, August 17, 1996. Otolaryngol Head Neck Surg. 1997;117(3Pt 2):S1-68.

35 Bhattacharyya N, Lee LN. Evaluating the diagnosis of chronic rhinosinusitis based on clinical guidelines and endoscopy. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;143(1):147-51.

36 Larsen PL, Tos M. Origin of nasal polyps. Laryngoscope. 1991;101(3):305-12.

37 Stamrnberger H. Surgical treatment of nasal polyps: past, present and future. Allergy 1999;54:7-11.

38 Dalziel K, Stein K, Round A, Garside R, Royle P. Systematic review of endoscopic sinus surgery for nasal polyps. Health Technol Assess. 2003;7(17):iii, 1-159.

39 Iziki O, Rouadi S, Abada RL, Roubal M, Mahtar M. Bilateral antrochoanal polyp: report of a new case and systematic review of the literature. J Surg Case Rep. 2019;3:1-3.

40 Ozcan C, Apa DD, Pata YS, Görür K, Akbaş Y. Expression of inducible nitric oxide synthase in antrochoanal polyps. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2003;67:383-8.

41 Składzień J, Litwin JA, Nowogrodzka-Zagórska M, Wierzchowski W. Morphological and clinical characteristics of antrochoanal polyps: comparison with chronic inflammation-associated polyps of the maxillary sinus. Auris Nasus Larynx. 2001;28:137-41.

42 Frosini P, Picarella G, De Campora E. Antrochoanal polyp: analysis of 200 cases. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2009;29(1):21-6.

43 Killian G. The origin of choanal polypi. 1906;168:81-2.

44 Maldonado M, Martínez A, Alobid I, Mullol J. The antrochoanal polyp. Rhinology. 2004;42(4):178-82.

45 Chaiyasate S, Roongrotwattanasiri K, Patumanond J, Fooanant S. Antrochoanal polyps: how long should follow-up be after surgery? Int J Otolaryngol. 2015;2015:ID 297417. 5 stranica.

46 Ertugrul S. Origin of polyps and accompanying sinonasal pathologies in patients with antrochoanal polyp: Analysis of 22 patients. North Clin Istanb. 2018;6(2):166-70.

47 Islas FAE, González JLT, Camarillo JMM. Antrochoanal polyp: a literature update. J Otolaryngol Rhinol 2018;4:049.

48 Pagella F, Emanuelli E, Pusateri A, Borsetto D, Cazzador D, Marangoni R, i sur. Clinical features and management of antrochoanal polyps in children: Cues from a clinical series of 58 patients. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2018;114:87-91.

49 Zheng H, Tang L, Song B, Yang X, Chu P, Han S, i sur. Inflammatory patterns of antrochoanal polyps in the pediatric age group. Allergy Asthma Clin Immunol. 2019;15:39-46.

50 Kurukahvecioğlu S, Yardimci S, Uzun H, Akman E. Antrochoanal polyps: Analysis of 18 cases. KBB-Forum. 2006;5(4):155-7.

51 Min YG, Chung JW, Shin JS, Chi JG. Histologic structure of antrochoanal polyps. Acta Otolaryngol. 1995;115(4):543-7.

52 Towbin R, Dunbar JS, Bove K. Antrochoanal Polyps. AJR Am J Roentgenol. 1979;132:27-31.

53 Ozdek A, Samim E, Bayiz U, Meral I, Şafak MA, Oğuz H. Antrochoanal polyps in children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2002;65:213-8.

54 Kirtsreesakul V. Update on Nasal Polyps: etiopathogenesis. J Med Assoc Thai. 2005;88(12):1966-72.

55 Lee TJ, Huang SF. Endoscopic sinus surgery for antrochoanal polyps in children. Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;135:688-92.

56 Bakshi SS, Vaithy KA. Antrochoanal polyp. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017;5(3):806-7.

57 Pruna X, Ibañez JM, Serres X, Garriga V, Barber I, Vera J. Antrochoanal polyps in children: CT findings and differential diagnosis. Eur Radiol. 2000;10(5):849-51.

58 Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, Jones NS, Drake-Lee AB, Ryan D, i sur. BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. Clin Experimental Allergy. 2007;38:260-75.

59 Mantilla E, Villamor P, De La Torre C, Álvarez-Neri H. Combined approach for paediatric recurrent antrochoanal polyp: a single-centre case series of 27 children. J Laryngol Otol. 2019;133(7):627-31.

60 Sanosi AA. Endoscopic Excision of the Antrochoanal Polyp. Kuwait Med J. 2005;37:182-4.

61 Lee KC, Lee SC, Ban JH, Park SO, Jin SM, Lee YB. Outcomes of transnasal endoscopic sinus surgery in 62 cases of antrochoanal polyp. J Rhinol. 1999;6(1):47-52.

62 Galluzzi F, Pignataro L, Maddalone M, Garavello W. Recurrences of surgery for antrochoanal polyps in children: a systematic review. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2018;106:26-30.

63 Hekmatnia A, Shirvani F, Mahmoodi F, Hashemi M. Association of anatomic variations with antrochoanal polyps in paranasal sinus computed tomography scan. J Res Med Sci. 2017;22:3.

64 Choudhury N, Hariri A, Saleh H, Sandison A. Diagnostic challenges of antrochoanal polyps: A review of sixty-one cases. Clin Otolaryngol. 2018;43(2):670-4.

65 Mehrotra A. Bacterial biofilms. Pediatr Asthma Allergy Immunol. 2007;20(3):191-5.

66 Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):95-108.

67 Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. Otolaryngol Head Neck Surg. 2005;132:414-7.

68 Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, i sur. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. Clin Microbiol Rev. 2018;31(3):e00084-16.

69 Vraneš J, Leskovar V. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. Med Glas. 2009;6(2):147-64.

70 Soler-Arango J, Figoli C, Muraca G, Bosch A, Brelles-Mariño G. The Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix and cells are drastically impacted by gas discharge plasma treatment: A comprehensive model explaining plasma-mediated biofilm eradication. PLoS One. 2019;14(6):e0216817.

71 Hoggard M, Wagner Mackenzie B, Jain R, Taylor MW, Biswas K, Douglas RG. Chronic rhinosinusitis and the evolving understanding of microbial ecology in chronic inflammatory mucosal disease. Clin Microbiol Rev. 2017;30(1):321-48.

72 Galli J, Ardito F, Calò L, Mancinelli L, Imperiali M, Parrilla C, i sur. Recurrent upper airway infections and bacterial biofilms. J Laryngol Otol. 2007;121:341-4.

73 Zhang Z, De-min H. The microbiology of chronic rhinosinusitis. J Chin Clin Med. 2008;3:463-9.

74 Trémoulet F, Duché O, Namane A, Martinie B, Labadie JC. A proteomic study of Escherichia colli O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. FEMS Microbiol Lett. 2002;215:7-14.

75 Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends Microbiol. 2005;13:7-10.

76 Aparna MS, Sarita Y. Biofilms: Microbes and Disease. BJID 2008;12(6):526-30.

77 Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature. 2004;2:95-108.

78 Singh P, Mehta R, Agarwal S, Mishra P. Bacterial biofilm on the sinus mucosa of healthy subjects and patients with chronic rhinosinusitis (with or without nasal polyposis). J Laryngol Otol. 2015;129:46-9.

79 Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001;358(9276):135-8.

80 Hamilos DL. Host-microbial interactions in patients with chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2013 Apr;131(4):1263-4.

81 Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control. 2019;16(8):76.

82 Macassey E, Dawes P. Biofilms and their role in otorhinolaryngological disease. J Laryngol Otol. 2008;122:1273-8.

83 Palmer J. Bacterial biofilms: do they play a role in chronic sinusitis? Otolaryngol Clin North Am. 2005;38:1193-201.

84 Zuliani G, Carron M, Gurrola J, Coleman C, Haupert M, Berk R, i sur. Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2006;70:1613-7.

85 Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of Pseudomonas aeruginosa biofilms. Appl Environ Microbiol. 2002;68:4457-64.

86 Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, i sur. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. BMC Infect Dis. 2013;13:210-9.

87 Wood AJ, Fraser J, Swift S, Amirapu S, Douglas RG. Are biofilms associated with an inflammatory response in chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol. 2011;1:335-9.

88 Singhal D, Boase S, Field J, Jardeleza C, Foreman A, Wormald PJ. Quantitative analysis of in vivo mucosal bacterial biofilms. Int Forum Allergy Rhinol. 2012;2:57-62.

89 Oncel S, Pinar E, Sener G, Calli C, Karagoz U. Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;39(1):52-5.

90 Tóth L, Vajas A, Csomor P, Berta A, Sziklai I, Karosi T. Optical coherence tomography for biofilm detection in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013;270(2):555-63.

91 Tan NC, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Vreugde S, Wormald PJ. Intracellular Staphylococcus aureus: the Trojan horse of recalcitrant chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol. 2013;3(4):261-6.

92 Gu X, Keyoumu Y, Long L, Zhang H. Detection of bacterial biofilms in different types of chronic otitis media. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2014;271(11):2877-83.

93 Terrier G, Baumann RP, Pidoux JM, Chaux-de-Fonds L. Endoscopic and histopathological observations of chronic maxillary sinusitis. Rhinology. 1976;14(3):129-32.

94 Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2004;66(3):155-8.

95 Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. Laryngoscope. 2005;115:578-82.

96 Wysong P. Strategies for Improving FESS Outcomes. ENT Today. 2007;9:22.

97 Madeo J, Frieri M. Bacterial biofilms and chronic rhinosinusitis. Allergy Asthma Proc. 2013;34(4):335-41.

98 Zernotti ME, Angel Villegas N, Roques Revol M, Baena-Cagnani CE, Arce Miranda JE, Paredes ME, i sur. Evidence of bacterial biofilms in nasal polyposis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2010;20(5):380-5.

99 Gallaher TK, Wu S, Webster P, Aguilera R. Identification of biofilm proteins in non-typeable Haemophilus Influenzae. BMC Microbiol. 2006 Jul 19;6:65.

100 El-Sharkawy AA. Endoscopic management of paediatric antrochoanal polyp: our experience. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2013;33(2):107-11.

101 Arild Danielsen K, Eskeland Ø, Fridrich-Aas K, Cecilie Orszagh V, Bachmann-Harildstad G, Burum-Auensen E. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis; distribution and prevalence. Acta Otolaryngol. 2016;136(1):109-12.

102 Tatar EÇ, Tatar I, Ocal B, Korkmaz H, Saylam G, Ozdek A, i sur. Prevalence of biofilms and their response to medical treatment in chronic rhinosinusitis without polyps. Otolaryngol Head Neck Surg. 2012;146(4):669-75.

103 Marcinkiewicz J, Stręk P, Strus M, Głowacki R, Ciszek-Lenda M, Zagórska-Świeży K. Staphylococcus epidermidis and biofilm-associated neutrophils in chronic rhinosinusitis. A pilot study. Int J Exp Pathol. 2015;96(6):378-86.

104 Kolethekkat AA, Paul RR, Kurien M, Kumar S, Al Abri R, Thomas K. Diagnosis of adult chronic rhinosinusitis: can nasal endoscopy predict intrasinus disease? Oman Med J. 2013;28(6):427-31.

105 Psaltis AJ, Ha KR, Beule AG, Tan LW, Wormald PJ. Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. Laryngoscope. 2007;117(7):1302-6.

106 Min YG, Oh SJ, Won TB, Kim YM, Shim WS, Rhee C, i sur. Effects of staphylococcal enterotoxin on ciliary activity and histology of the sinus mucosa. Acta Otolaryngol. 2006;126(9):941-7.

107 Biedlingmaier JF, Trifillis A. Comparison of CT scan and electron microscopic findings on endoscopically harvested middle turbinates. Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;118(2):165-73.

108 Galli J, Calò L, Ardito F, Imperiali M, Bassotti E, Passali GC, i sur.Damage to ciliated epithelium in chronic rhinosinusitis: what is the role of bacterial biofilms? Ann Otol Rhinol Laryngol. 2008;117(12):902-8.

109 Jia M, Chen Z, Du X, Guo Y, Sun T, Zhao X. A simple animal model of Staphylococcus aureus biofilm in sinusitis. Am J Rhinol Allergy. 2014; 28(2):115-9.

110 Dlugaszewska J, Leszczynska M, Tatarska A, Pastusiak T, Szyfter W. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016;273:1989-94.

111 Brook I. Microbiology of sinusitis. Proc Am Thorac Soc. 2011;8(1):90-100.

112 Araujo E, Palombini BC, Cantarelli V, Pereira A, Mariante A. Microbiology of middle meatus in chronic rhinosinusitis. Am J Rhinol. 2003;17:9-15.

113 Al-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011;11(1):18-23.

114 Abou-Hamad W, Matar N, Elias M, Nasr M, Sarkis-Karam D, Hokayem N, i sur. Bacterial flora in normal adult maxillary sinuses. Am J Rhinol Allergy. 2009;23:261-3.

115 Larson DA, Han JK. Microbiology of sinusitis: Does allergy or endoscopic sinus surgery affect the microbiologic flora? Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;19:199-203.

116 Orobello PW, Park RI, Belcher LJ, Eggleston P, Lederman HM, Banks

117 Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald PJ. Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. Am J Rhinol Allergy. 2009;23(6):556-61.

118 Toskala E, Rautiainen M. Effects of surgery on the function of maxillary sinus mucosa. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2005;262:236-40.

119 Peters AT, Spector S, Hsu J, Hamilos DL, Baroody FM, Chandra RK, i sur. Diagnosis and management of rhinosinusitis: a practice parameter update. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014t;113(4):347-85.

120 Murphy TF, Parameswaran GI. Moraxella catarrhalis, a human respiratory tract pathogen. Clin Infect Dis. 2009;49(1):124-31.

121 Karosi T, Csomor P, Sziklai I. Tumor necrosis factor-α receptor expression correlates with mucosal changes and biofilm presence in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. Laryngoscope. 2012;122(3):504-10.

122 Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. Am J Rhinol. 2008;22(1):1-6.

123 Smith TL, Litvack JR, Hwang PH, Loehrl TA, Mace JC, Fong KJ, i sur. Determinants of outcomes of sinus surgery: a multi-institutional prospective cohort study. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;142:55-63.

124 Hall-Stoodley L, Holá V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, i sur. ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. Clin Microbiol Infect. 2015;21:S1-S25.

11. Životopis

Gorazd Poje

Osobni podatci

- datum i mjesto rođenja: 10. veljače 1970., Zagreb
- zanimanje: liječnik, specijalist otorinolaringologije, uža specijalizacija iz plastične kirurgije glave i vrata
- zaposlen u Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb
- bračni status: oženjen, supruga Lahorka Plejić Poje - profesorica na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, djeca Martin (20), Šimun (17) i Andrija (17)
- e-mail: gpoje@kbc-zagreb.hr

Zaposlenje

- 1996. - 1998., Klinički bolnički centar Zagreb, liječnik pripravnik
- 1998. - 2000., Dom zdravlja Vrbovec, liječnik hitne pomoći
- 2000. - danas, Klinika za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb:
    - specijalizant
    - odjelni liječnik
    - pročelnik Zavoda za rinosinusologiju
    - voditelj Odjela za rinosinusologiju i kirurgiju baze lubanje
    - voditelj Odjela za otorinolaringološke operacije

Kvalifikacije i edukacija

- 1988. završio Klasičnu gimnaziju u Zagrebu
- 1989. - 1996. studij medicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu
    - 1995. Rektorova nagrada za najbolji studentski rad
- 1996. - 1998. znanstveni poslijediplomski studij biomedicine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
- 1996. - 1998. pripravnički staž u KBC Zagreb, položio državni ispit

- 2000. - 2004. specijalizacija iz otorinolaringologije na Klinici za bolesti, uha, nosa i grla KBC Zagreb
- 2001. - 2002. stručni poslijediplomski studij iz otorinolaringologije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu
- 2008. magistrirao na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
- 2009. uža specijalizacija iz plastične kirurgije glave i vrata
- 2010. naslovni asistent Katedre za otorinolaringologiju s audiologijom i fonijatrijom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
- 2014. primarijus
- 2015. asistent Katedre za otorinolaringologiju s audiologijom i fonijatrijom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
- aktivno se služi engleskim jezikom, a pasivno njemačkim i talijanskim

Prikaz znanstvenog i stručnog rada

- polaznik 132 stručna ili znanstvena skupova
- 110 radova na kongresima i tečajevima
- 32 puta pozvani predavač na međunarodnim skupovima
- 7 puta operater na skupovima („live surgery“)
- 6 puta instruktor na „hands on“ skupovima (kadaveri i animalni modeli)
- član 17 organizacijskih odbora međunarodnih skupova
- član 18 znanstvenih odbora međunarodnih skupova
- direktor CIRAS-a - *Croatian International Rhinosurgical Advanced School*

- radovi
  - 28 radova, od kojih 12 indeksiranih u Current Contents i Science Citation Index bazama podataka, 16 indeksiranih u drugim bazama podataka
  - 17 sažetaka radova, od kojih 7 indeksiranih u Current Contents bazi podataka, 10 indeksiranih u drugim bazama podataka
  - 10 poglavlja u knjigama

- konzultant operater KBC Crne Gore za rinosinusologiju te za kirurgija nosa, sinusa i lubanjske osnovice
- predsjednik Hrvatskog rinološkog društva
- 2014.-2016. član Upravnog vijeća Poliklinike SUVAG
- 2016.-2017. predsjednik Upravnog vijeća Poliklinike SUVAG
- član Etičkog povjerenstva Poliklinike SUVAG
- član Zdravstvene komisije Hrvatskog ragbi saveza (bivši kadetski, juniorski i seniorski reprezentativac)

- edukacija studenata, pripravnika, specijalizanata te liječnika primarne zdravstvene zaštite:
  - predavač na dodiplomskom studiju otorinolaringologije Medicinskog fakulteta u Zagrebu za studij na hrvatskom i engleskom jeziku
  - predavač na poslijediplomskim studijima Medicinskog fakulteta u Zagrebu iz:
    - otorinolaringologije
    - oftalmologije
    - neurologije
    - hitne medicine
  - 28 puta predavač poslijediplomskim tečajevima stalnog medicinskog usavršavanja

- članstvo u stručnim društvima:
  - Hrvatsko društvo za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata
  - Hrvatsko društvo za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata
  - Hrvatsko društvo za lubanjsku osnovicu (jedan od osnivača)
  - Hrvatsko rinološko društvo (jedan od osnivača)
  - Hrvatsko društvo za tumore glave i vrata
  - Europsko rinološko društvo

12. Prilozi

12.1. Obrazac namijenjen potencijalnim ispitanicima, odnosno njihovim pravnim zastupnicima

12.2. Informirani pristanak

12.1. Obrazac namijenjen potencijalnim ispitanicima, odnosno njihovim pravnim zastupnicima

Obrazac namijenjen potencijalnim ispitanicima, odnosno njihovim pravnim zastupnicima

Poštovani/poštovana,

pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju kojem bi se istražio biofilm u antrokoanalnih polipa. To istraživanje se provodi u sklopu izrade doktorske disertacije Biofilm u antrokoanalnih polipa. Doktorsku disertaciju izradio bi mr. sc. Gorazd Poje pod mentorstvom prof. dr. sc. Drage Prgometa.

Što je biofilm? Biofilm predstavlja zajednicu bakterija zarobljenih u tzv. polisaharidni matriks. Naša su pilotska istraživanja uz pomoć elektronske mikroskopije pokazala da su bolesnici s nosnom polipozom imali znakove postojanja biofilma na površini samih polipa, ali nismo našli tragove biofilma na onim dijelovima nosa i sinusa koji su imali naoko zdravu sluznicu, tj. sluznicu bez polipoznih promjena. U ovom istraživanju bi utvrdili postoji li povezanost biofilma i antrokoanalnog polipa.

Vaše sudjelovanje u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva istraživanja i načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za Vas kao ispitanika. Stoga Vas molimo da, prije donošenja odluke, pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest, a ako u njoj naiđete na bilo kakve nejasnoće ili nepoznate riječi i izraze da o tome pitate istraživača ili njegovog mentora koji u istraživanju sudjeluju i dužni su Vam i spremni odgovoriti na svako pitanje.

Cilj i svrha ovog istraživanja jest utvrditi postojanje biofilma u antrokoanalnih polipa. Nadalje, utvrditi je li biofilm posljedica, a ne uzrok kroničnoj infekciji, je li biofilm podržavajući faktor kronične upale sinusa te je li povezan s nastankom antrokoanalnih polipa.

Vaše sudjelovanje u istraživanju apsolutno ne bi mijenjalo ili remetilo Vaše liječenje niti biste Vi u vezi s njim gubili dodatno vrijeme (radili dodatne preglede, testove, pretrage ili slično). **Tkivo koje se kod Vaše operacije i inače odstranjuje te baca u biološki otpad upotrijebilo bi se u ovom istraživanju, a radi se o samo nekoliko kubičnih milimetara tkiva. Ovo istraživanje apsolutno ne utječe na tijek Vašeg liječenja, tj. cijeli postupak vašeg liječenja je istovjetan kao u bolesnika koji nisu uključeni u ovo istraživanje.**

Rizici sudjelovanja u istraživanju apsolutno ne postoje jer se Vaše liječenje provodi na identičan način kao i da niste sudionik istraživanja. Niste izloženi nikakvim dodatnim rizicima zbog ovog istraživanja jer se tkivo koje bi se uzimalo za istraživenje i inače odstranjuje, samo što bi se jedan dio, umjesto da se baci u biološki otpad, upotrijebio u znanstvene svrhe.

Svi Vaši osobni podaci bit će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a u istraživanju bi se u potpunosti poštivali propisani postupci za zaštitu osobnih podataka. U naše baze podataka Vi ćete biti uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju pregledavat će samo voditelj istraživanja, a Vaše ime

nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Podaci dobiveni u ovom znanstvenom istraživanju mogu biti korisni u kliničkoj praksi jer nove spoznaje o povezanosti biofilma i upala sinusa mogu pomoći u učinkovitijem liječenju upala sinusa, kao i u svrhu daljnjeg razvoja i unapređenja znanosti. Stoga se očekuje da se ti podaci objave u odgovarajućim znanstvenim časopisima i publikacijama pri tome će Vaš identitet ostati u potpunosti anoniman i zaštićen.

Vi u potpunosti slobodno i samostalno odlučujete hoćete li u ovom istraživanju sudjelovati ili ne. Vaše sudjelovanje je dragovoljno i u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, imate se pravo bez ikakvih posljedica povući iz istraživanja. U tom slučaju ćete se nastaviti dalje liječiti onako kako je uobičajeno za Vašu bolest. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje u istraživanju, lijepo Vas molimo da o tome na vrijeme obavijestite voditelja projekta i njegove suradnike.

Kako se Vaše liječenje provodi identično kao i u bolesnika koji nisu uključeni u istraživanje za Vas nema dodatnih pregleda ili troškova.

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući «Osnove dobre kliničke prakse» i «Helsinšku deklaraciju».

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite voditelju istraživanja (dr. Gorazd Poje) ili njegovu mentoru (prof. dr. sc. Drago Prgomet).

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost Vašeg sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest sastavljena je u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Voditelj istraživanja:	Mentor:
Mr. sc. Gorazd Poje	Prof. dr. sc. Drago Prgomet

12.2. Informirani pristanak

1. Izjavljujem da sam pismeno i usmeno dobio sve obavijesti u svezi sudjelovanja u predloženom istraživanju te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za moje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici.
4. Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.
5. Dobio/dobila sam mogućnost ostvarivanja direktnog kontakta u slučaju potrebe za dodatnim pojašnjenjima i/ili intervencijama.

Ime i prezime ispitanika: (upisati štampanim slovima)_____
Vlastoručni potpis: (potpisati)_____
Mjesto i datum: (upisati)_____

Ime i prezime istraživača koji je vodio postupak obavijesti za ispitanika i pristanka za sudjelovanje (upisati štampanim slovima): _____

Ime i prezime mentora: (upisati štampanim slovima)_____
Vlastoručni potpis: (potpisati)_____
Mjesto i datum: (upisati)_____