

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу , бр 01-10274/3-7 од 28.11 2012. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Александра Перића под називом:

**„ПРОЦЕНА ЕФЕКТА ПРЕОПЕРАТИВНЕ ПРИМЕНЕ
КЛАРИТРОМИЦИНА У ЛЕЧЕЊУ НОСНО-СИНУСНЕ ПОЛИПОЗЕ „**

Чланови комисије су :

- 1. проф др Љубица Живић** , председник, ванредни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу, за ужу научну област Оториноларингологија
- 2. проф др Данило Војводић**, члан, ванредни професор Војномедицинске академије у Београду , за ужу научну област Имунологија
- 3. доц др Ненад Балетић** , члан , доцент Војномедицинске академије у Београду , за ужу научну област Оториноларингологија

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат др Александар Перић испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета Медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1 Кратка биографија кандидата

Др Александар Перић је рођен 21.05.1971. у Шапцу, где је завршио основну и средњу школу. Медицински факултет у Београду је завршио у децембру 1996. године са просечном оценом 9,53. Од јануара 2002. био је на специјализацији из оториноларингологије у Војномедицинској академији. Специјалистички испит је положио у децембру 2005. са одличном оценом. Од децембра 2005. ради на Одељењу ринологије Клинике за оториноларингологију Војномедицинске академије.

Ужа област интересовања му је ринологија, а у оквиру ње ринохирургија, патофизиологија и имунологија носа. Од 2010. године учествује у реализацији научно-истраживачког пројекта Института за медицинска истраживања ВМА под називом „Процена имуномодулаторних ефеката терапије макролидним антибиотиком у болесника са носном полипозом“ (ВМА/11-14/Б.6). Аутор је већег броја научних и стручних радова објављених у међународним и домаћим часописима ранга М 22, М 23 и М 24. Учествовао је на већем броју конгреса и симпозијума у земљи и иностранству, на којима је, као предавач по позиву или у редовном програму, излагао своје радове. Био је на усавршавањима из области функционалне ендоскопске хирургије параназалних синуса, као и реконструктивне и естетске хирургије носа у Грацу и Београду. Члан је Европског ринолошког друштва и ОРЛ секције Српског лекарског друштва. Од 2008. је рецензент у неколико међународних часописа.

Говори енглески језик, а служи се француским.

Од октобра 2011. године је студент на Докторским академским студијама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на изборном подручју Клиничка и експериментална хирургија. У јулу 2012. је положио усмени докторски испит са оценом 10 (десет)

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „ПРОЦЕНА ЕФЕКТА ПРЕОПЕРАТИВНЕ ПРИМЕНЕ КЛАРИТРОМИЦИНА У ЛЕЧЕЊУ НОСНО-СИНУСНЕ ПОЛИПОЗЕ „

Предмет: Ова студија ће се бавити проценом клиничких ефеката дејства дуготрајне, нискодозиране примене кларитромицина у неалергичних и алергичних болесника са носно- синусном полипозом..

Хипотезе:

- Преоперативна примена кларитромицина значајно успорава поновни раст носних полипа након хируршког лечења.
- Примена кларитромицина смањује величину носних полипа и у алергичних и у неалергичних пацијената са носном полипозом
- Терапија кларитромицином значајно редукује концентрације хемокина IL-8 у носном секрету и у алергичних и у неалергичних пацијената са носном полипозом, мада је та разлика статистички значајнија у групи неалергичних болесника
- Лечење кларитромицином снижава концентрације проинфламаторних Th1 цитокина TNF- α и IL-1 β у носном секрету у обе групе испитаника, мада је разлика статистички значајнија у групи неалергичних испитаника
- Дуготрајна, нискодозирана терапија кларитромицином не утиче на концентрације Th2 проинфламаторних цитокина (IL-4, IL-5 и IL-6).
- Лечење кларитромицином има слабије ефекте у пацијената са израженијом еозинофилном инфилтрацијом ткива полипа
- Хируршко лечење носне полипозе има боље ефекте него лечење искључивом пероралном применом кларитромицина

2.1 Подобност кандидата

Кандидат је објавио 22 рада, од којих 2 рада у целини у међународном часопису ранга М 22 од којих је у једном први аутор, 15 радова у часописима категорије М 23, од којих је први аутор у 14 радова, 5 радова у часописима категорије М 52, где је у 4 рада први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

Радови у часописима

1. *Baletić N, Malićević H, Petrović Ž, Marinković-Erić J, Perić A.* Advantages and limitations of the autofluorescent diagnostics of the laryngeal cancer and precancerosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267 (6): 925-31. **M 22 - 5 бодова**
2. *Perić A, Matković-Jožin S, Vukomanović-Đurđević B.* Fibroepithelial polyp arising from the inferior nasal turbinate. *J Postgrad Med* 2009; 55(4): 288-9. **M22 – 5 бодова**
3. *Perić A, Vojvodić D, Matković-Jožin S.* Effect of long-term low-dose clarithromycin on T helper 2 cytokines, eosinophilic cationic protein and the 'regulated on activation, normal T cell expressed and secreted' chemokine in the nasal secretions of patients with nasal polyposis. *J Laryngol Otol* 2012; 126(5): 495-502. **M23 – 3 бода**
4. *Perić A, Vojvodić D, Vukomanović-Đurđević B.* Influence of allergy on clinical, immunological and histological characteristics of nasal polyposis. *B-ENT* 2012; 8(1): 25-32. ISSN 0001-6497 **M23 – 3 бода**
5. *Perić A, Vojvodić D, Vukomanović-Đurđević B, Baletić N.* Eosinophilic inflammation in allergic rhinitis and nasal polyposis. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011; 62(2): 341-8. **M23 – 3 бода**
6. *Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Vukomanović-Đurđević B, Miljanović O.* Correlation between cytokine levels in nasal fluid and eosinophil counts in nasal polyp tissue in asthmatic and non-asthmatic patients. *Allergol Immunopathol* 2011; 39(3): 133-9. **M23 – 3 бода**
7. *Perić A, Vojvodić D, Vukomanović-Đurđević B.* Nasal polyps with more intense epithelial eosinophil infiltration respond worse to long-term low-dose treatment by clarithromycin. *Adv Clin Exp Med* 2011; 20(3): 325-34. ISSN 1899-5276 **M23 – 3 бода**
8. *Perić A, Vojvodić D, Baletić N, Perić AV, Miljanović O.* Immunomodulatory and clinical effects of long-term low-dose macrolide treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J Med Biochem* 2011; 30(1): 45-50. **M23 – 3 бода**
9. *Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Vukomanović-Đurđević B, Perić AV, Miljanović O.* Proinflammatory cytokine levels in nasal fluid as indicators of severity of nasal polyposis. *Acta Clin Croat* 2010; 49(4): 395-403. **M23 – 3 бода**
10. *Perić A, Vojvodić D, Baletić N, Perić A, Miljanović O.* Influence of allergy on the immunomodulatory and clinical effects of long-term low-dose macrolide treatment of nasal polyposis. *Biomedical Papers - Olomouc* 2010; 154(4): 327-34. ISSN 1213-8118 **M23 – 3 бода**

11. **Perić A, Baletić N, Sotirović J.** A case of an uncommon anatomic variation of the middle turbinate associated with headache. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2010; 30(3): 156-9. **M23 – 3 бода**
12. **Milojević M, Avramović S, Kostić B, Sotirović J, Perić A.** Endoscopic dacryocystorhinostomy. *Vojnosanit Pregl* 2010; 67(6): 463-7. **M23 – 3 бода**
13. **Perić A, Perić A.** Polyp inside the concha bullosa: unusual manifestation of chronic rhinosinusitis. *Mil Med* 2008; 173(9): 930-3. **M23 – 3 бода**
14. **Perić A, Baletić N, Cerović S, Vukomanović-Durđević B.** Middle turbinate angiofibroma in an elderly woman. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(7): 583-6. **M23 – 3 бода**
15. **Perić A, Milojević M, Ljubičić A, Sotirović J.** Endoscopic middle meatal antrostomy in treatment of maxillary sinus mucoceles. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(3): 207-11. **M23 – 3 бода**
16. **Perić A, Gaćeša D.** Etiology and pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65(9): 699-702. **M23 – 3 бода**
17. **Perić A, Sotirović J, Baletić N, Kozomara R, Bijelić D, Rašić D.** Concha bullosa and the nasal middle meatus obstructive syndrome. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65(3): 255-8. **M23 – 3 бода**
18. **Perić A, Vojvodić D, Zolotarevski L, Perić A.** Nasal polyposis and fungal *Schizophyllum commune* infection: a case report. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2011; 54(2): 83-6. **M52 -1,5 бодова**
19. **Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Miljanović O.** Cytokine levels in nasal secretions in asthmatic nad nonasthmatic patients with nasal polyposis. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2010; 20(3): 111-7. **M52 – 1,5 бодова**
20. **Rašić D, Perić A, Vukomanović-Durđević B.** A case of an unilateral tonsillar hypertrophy caused by actinomycosis. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2010; 53(1): 31-3. **M52 – 1,5 бодова**
21. **Perić A, Matković-Jožin S, Baletić N.** Large doubly septated concha bullosa: an unusual anatomic variation. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2009; 52(3): 129-31. **M52 – 1,5 бодова**
22. **Perić A, Baletić N, Vukomanović-Durđević B, Kozomara R, Jović M.** Mucocele of the maxillary sinus. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(5): 361-4. **M52 – 1,5 бодова**

2.2 Преглед стања у подручју истраживања

Носно-синусна полипоза (хронични полипоидни риносинуситис) је хронично запаљенско обољење слузокоже носа и параназалних синуса које се карактерише пролапсом едематозне слузокоже, најчешће пореклом из предњег етмоида, у носну шупљину, што доводи до отежаног дисања на нос, појачане носне секреције, ослабљеног чула мириса, главобоље и нарушавања квалитета живота. Ткивна еозинофилија је основна хистолошка карактеристика овог обољења, мада се у ламини проприји налазе и друге инфламаторне ћелије, као што су лимфоцити, неутрофили, мастоцити и др. Патогенеза хроничне хиперееозинофилије у носно-синусној полипози није позната. Новије хипотезе говоре о повећаној трансендотелијалној миграцији еозинофилних гранулоцита, привучених и активираних од стране хемокина CCL5 (RANTES), еотаксина 1, 2 и 3, као и CCL7 и CCL13. Активирани еозинофили и мастоцити су углавном под утицајем IL-5 и IL-6, Th2 проинфламаторних цитокина који им продужавају живот одлагањем програмиране ћелијске смрти-апоптозе. Такви, хиперактивни гранулоцити су способни да сами луче нове и веће количине хемокина и цитокина, којим се привлаче и активирају нове гранулоцитне ћелије, чиме се одржава хронични запаљенски процес у ткиву. Са друге стране они продукују велике количине ензима (неутрофили мијелопероксидазу-MPO, еозинофили еозинофилни катјонски протеин-ЕCP, а мастоцити триптазу-TRY), који оштећују ћелије псеудослојевитог респираторног епитела, доводе до задебљања базалне мембране, ексудације и трансудације крвне плазме, настанка едема ламине проприје и пратеће пролиферације фибробласта и хиперпродукције везивних влакана.

Хируршко лечење хроничног хиперпластичног риносинуситиса и носно-синусне полипозе може се класификовати на класично и ендоскопско. Ендоскопски приступ у лечењу носне полипозе данас преузима примат у свим деловима света. Функционална ендоскопска синусна хирургија (*functional endoscopic sinus surgery-FESS*) омогућава значајно побољшање симптома уз веома мали ризик за настанак компликација. Основни циљ је да се уз најмању могућу трауму ткива и чување здраве слузокоже, постигне максимална вентилација и дренажа параназалних синуса. Мада је хирургија била дуги низ година једина терапија хиперпластичног хроничног риносинуситиса и носне полипозе, промене у лечењу ових болести у новије време иду у смеру примене лекова, као што су интраназални кортикостероиди и антибиотици. Током последње декаде се у литератури појавило више студија које показују ефикасност дуготрајне, нискодозиране примене макролидних антибиотика у лечењу ових болести. На пример, дванаестонедељна примена кларитромицина у дневној дози од 200 мг, комбиновано са карбоцистеином у дози од 1500 мг/дан је довела до побољшања симптома и риноскопског налаза у 64,2% оболелих од хроничног риносинуситиса. Рокситромицин, примењен у дози од 150 мг дневно током осам недеља, довео је до смањења величине носних полипа у 52% пацијената. Кларитромицин, даван у дози од 400 мг/дан током осам до дванаест недеља, смањио је величину полипа у 40% пацијената. Макролидни антибиотици могу да делују на продукцију медијатора запаљенске реакције, побољшавају мукоцилијарни транспорт, смањују лучење муцина, супримирају продукцију IL-8 и IL-1 β , инхибирају пролиферацију фибробласта у носним полипима. Примена кларитромицина током 14 дана, два пута на дан у дози од 500 мг значајно смањује експресију IL-8 и TNF- α у ткиву носних полипа, како у епителу, тако и у ламини проприји. Ефикасност макролида је знатно нижа у случајевима удружености носне полипозе са бронхијалном астмом и преосетљивошћу на нестероидне

антиинфламаторне аналгетике. Једна *in vitro* студија је показала да примена рокситромицина не само да блокира пролиферацију фибробласта изолованих из ткива носних полипа, већ да инхибира и продукцију IL-6 и хемокина CCL5 (RANTES) у овим ћелијама. Такође, својим антиоксидативним ефектом макролиди могу да инхибирају продукцију колагена у фибробластима. С обзиром на дуготрајну примену ових лекова, поставило се питање бактеријске резистенције на макролиде. Међутим, резултати истраживања које су, након 12-месечне примене макролидног антибиотика објавили *Cervin* и сар. говоре да је ризик од резистенције мали. У малом броју пацијената, након терапије овим антибиотцима, бактеријске културе су биле позитивне, мада то није корелирало са интензитетом носних симптома. То је објашњено чињеницом да макролиди имају и бактериостатски ефекат и да могу смањити вируленцију бактерија без њихове ерадикације. С обзиром да из етичких разлога није било могуће узорковати ткиво носних полипа за имунолошка испитивања пре завршене терапије кларитромицином, поставило се питање како доћи до јасних података који ће указати на ефикасност макролидног антибиотика. Носни секрет је прва линија одбране слузокоже носа, у којој леукоцити са својим производима, а у садејству са мукоцилијарним транспортом и биохемијском заштитом мукуса, играју своју протективну улогу. У њему су растворени различити медијатори запаљенске реакције, које продукују епителне и жлездане ћелије, а у ламини проприји фибробласти. С обзиром да састав носног секрета може верно да одсликава стање запаљења у носној слузокожи, одређивање концентрације медијатора нам може пружити драгоцене податке о имуномодулаторним својствима макролидних антибиотика. Један део досадашњих испитивања је вршен у *in vitro* условима. Тако је показано да макролиди редукују продукцију Th2 цитокина IL-6, једног од главних маркера хроничног запаљења у фибробластима и проинфламаторног цитокина TNF- α у моноцитима.

2.5 Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљ

Циљ ове студије је да изврши процену ефеката преоперативне примене кларитромицина у лечењу носно синусне полипозе

Значај

Значај ове студије се огледа у томе што ће бити могуће дефинисати везу између преоперативне примене макролидног антибиотика кларитромицина и редукацију продукције Th2 цитокина IL-6, једног од главних маркера хроничног запаљења у фибробластима и проинфламаторног цитокина TNF- α у моноцитима, однос алергије на квалитет клиничког одговора при примени кларитромицина као и утицај на поновни раст полипа после хирушког третмана.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Макролидни антибиотици могу да делују на продукцију медијатора запаљенске реакције, побољшавају мукоцилијарни транспорт, смањују лучење муцина, супримирају продукцију IL-8 и IL-1 β , инхибирају пролиферацију фибробласта у носним полипима. Примена кларитромицина током 14 дана, два пута на дан у дози од 500 мг значајно смањује експресију IL-8 и TNF- α у ткиву носних полипа, како у епителу, тако и у ламини проприји. Ефикасност макролида је знатно нижа у случајевима удружености носне полипозе са бронхијалном астмом и преосетљивошћу на нестероидне антиинфламаторне аналетике. Једна *in vitro* студија је показала да примена рокситромицина не само да блокира пролиферацију фибробласта изолованих из ткива носних полипа, већ да инхибира и продукцију IL-6 и хемокина CCL5 (RANTES) у овим ћелијама. Такође, својим антиоксидативним ефектом макролиди могу да инхибирају продукцију колагена у фибробластима. С обзиром на дуготрајну примену ових лекова, поставило се питање бактеријске резистенције на макролиде. Међутим, резултати истраживања које су, након 12-месечне примене макролидног антибиотика објавили *Cervin* и сар.говоре да је ризик од резистенције мали. У малом броју пацијената, након терапије овим антибиотицима, бактеријске културе су биле позитивне, мада то није корелирало са интензитетом носних симптома. То је објашњено чињеницом да макролиди имају и бактериостатски ефекат и да могу смањити вируленцију бактерија без њихове ерадикације.

Носни секрет је прва линија одбране слузокоже носа, у којој леукоцити са својим продукцима, а у садејству са мукоцилијарним транспортом и биохемијском заштитом мукуса, играју своју протективну улогу. У њему су растворени различити медијатори запаљенске реакције, које продукују епителне и жлездане ћелије, а у ламини проприји фибробласти. С обзиром да састав носног секрета може верно да одсликава стање запаљења у носној слузокожи, одређивање концентрације медијатора нам може пружити драгоцене податке о имуномодулаторним својствима макролидних антибиотика.

Један део досадашњих испитивања је вршен у *in vitro* условима. Тако је показано да макролиди редукују продукцију Th2 цитокина IL-6, једног од главних маркера хроничног запаљења у фибробластима и проинфламаторног цитокина TNF- α у моноцитима.

2.7 Методе истраживања

А. Врста студије

Проспективна, кохортна, клиничка опсервациона студија

Б. Популација која се истражује

Истраживањем ће бити обухваћено 80 болесника са носном полипозом, 42-оје неалергичних и 38-оро алергичних. Истраживање ће бити спроведено у периоду 01. мај 2010.- 01. мај 2013. године, у Институту за медицинска истраживања и Клиници за оториноларингологију Војномедицинске академије, а на основу одобрења Етичког одбора Војномедицинске академије од 28.04.2010.год.

В. Узорковање

Основни критеријум за укључење у студију ће бити дијагноза носно-синусне полипозе, а критеријум за разврставање по групама ће бити присуство/одсуство преосетљивости на стандардне инхалационе алергене, као и облик лечења. Наиме, у прву групу ће бити укључени болесници са носном полипозом који ће примарно бити лечени кларитромицином, а накнадно оперисани, док ће у другој групи бити само болесници који ће бити на хируршком лечењу. Дијагноза носне полипозе, која представља компликовану форму хроничног риносинуситиса, биће постављена на основу анамнезе, клиничке слике, основног физикалног прегледа (предње и задње риноскопије), ендоскопије носа и компјутеризоване томографије (СТ) параназалних синуса урађене у короналним и аксијалним пресецима, а у складу са важећим Водичем који је објавило Европско ринолошко удружење (*European Rhinologic Society*). Критеријуми за искључивање из студије биће: опструкција доњих дисајних путева, бронхијална астма, преосетљивост на нестероидне антиинфламаторне аналгетике, антрохоанални полипи, цистична фиброза, примарна цилијарна дискинезија, системске болести везивног ткива, акутне респираторне инфекције, лечење системским и интраназалним кортикостероидима, антибиотицима и антихистаминицима у периоду унутар три недеље пре започињања клиничке студије.

Тестирање на алергије биће спроведено код свих испитаника и то на 18 стандардних инхалационих алергена: *Alternaria alternata*, *Artemisia vulgaris*, *Aspergillus fumigatus*, бубашваба, *Candida albicans*, *Cladosporium herbarum*, *Cupressus arizonica*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, епител мачке, епител пса, *Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Penicillium notatum*, *Plantago lanceolata*, *Platanus acerifolia*, полек корова, *Salsola kali*). Резултат теста биће сматран позитивним уколико најмање једна од индурација на површини коже буде минимално за 3 мм већег пречника у односу на негативну контролу.

Лечење кларитромицином. У групи болесника који ће бити лечени кларитромицином, сваки од испитаника ће добијати по једну дневну дозу кларитромицина од 500 мг током осам недеља. Никаква друга медикаментна терапија неће бити коришћена током студије. Критеријуми за искључивање за дуготрајну, нискодозирану терапију кларитромицином биће: трудноћа, дојење, преосетљивост на макролидне антибиотике, млађи од 18 година, поремећаји функције јетре и дигестивног система.

Хируршко лечење. Биће примењено код свих пацијената код којих након лечења кларитромицином будемо установили присуство полипа у носу. У другој групи испитаника, ово ће бити једини начин лечења. Примениће се метода функционалне ендоскопске синусне хирургије (FESS), а хируршка техника ендоскопска етмоидектомија. Све пацијенте ће оперисати исти хирург и код свих ће бити примењен исти хируршки поступак. Увођење болесника у општу ендотрахеалну анестезију и постизање контролисане хипотензије вршиће се применом две комбинације анестетика, у зависности од тренутне доступности истих у установи. У обе комбинације кренуће се са применом ремифентанила у дози од 3 нг/мл. У првој комбинацији, након постизања наведене концентрације ремифентанила у крвној плазми, биће примењен севофлуран (2,0 мг/кг), док ће се у другој комбинацији примењивати пропофол (иницијална жељена концентрација у плазми 4,0 μ г/мл). Током индукције ће пацијенти бити вентилирани 100%-тним кисеоником. Након губитка пупиларног рефлекса и могућности вербалне комуникације, сви ће пацијенти добијати рокуронијум у дози од 0,7 мг/кг, у циљу изазивања мишићне

релаксације. Деконгестија слузокоже носне шупљине биће постигнута комадићима вате, натопљеним 5%-тним раствором кокаина са адреналином у разблажењу 1:5000. Средња носна шкољка ће бити медијализована-померена ка носном септуму. Након уклањања већих полипозних маса из заједничког носног ходника, структуре средњег носног ходника ће бити прегледане применом ригидних ендоскопа, са угловима посматрања од 0° и 30°. Прво ће бити уклоњени полипи из средњег носног ходника. Након засецања сабљастог наставка (*processus uncinatus*), исти ће бити одстрањен применом Блекслијевог (*Blakesley-type*) форцепса. Тако ће се урадити инфундибулотомија и одстранити патолошки садржај из инфундибулума. Применом истог инструмента биће отворена и одстрањена етмоидна була (*bulla ethmoidalis*). На тај начин ће бити одстрањени полипи из предњег етмоида, као и патолошки садржај из фронталног рецесуса (*recessus frontalis*). Након отварања базалне плочице (*lamina basalis*), ући ћемо у задњи етмоид, одакле ће такође бити одстрањен патолошки садржај. Ушће максиларног синуса ће бити прегледано употребом ригидног ендоскопа под углом од 30°. Уколико буду постојала сужења на нивоу максиларног ушћа, иста ће бити хируршки одстрањена, као и патолошки садржај из синуса. Исти ће поступак бити примењен и на другој страни носне шупљине. Након тога ће у сваки од средњих носних ходника бити постављен по један мали тампон, направљен од малог прста рукавице, напуњен комадом сунђера. У циљу превенције бактеријских инфекција, пацијенти ће током 7 дана након операције добијати амоксицилин-клавуланат у дози од 1000 мг, два пута на дан. Алергични на пеницилин ће добијати током 7 дана рокситромицин у дози од 150 мг, два пута дневно. Тампони ће бити уклоњени из носа након 5 дана. У постоперативном периоду, у циљу бржег опоравка слузокоже, сви пацијенти ће користити физиолошки раствор, који ће укапавати у нос 4-5 пута на дан, у трајању од месец дана.

Контроле након хируршког лечења. Сви оперисани испитаници ће бити амбулантно контролисани на свака 2-3 месеца. Биће направљена два пресека у праћењу болесника, након 6 и након 12 месеци, када ће им бити урађени ендоскопски прегледи носа. Биће направљена процена да ли полипи уопште постоје, а уколико су присутни, у ком се стадијуму налазе (за процену величине полипа објашњење се налази у даљем тексту).

Г. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: терапија кларитромицином, хируршко лечење, присуство/одсуство алергијског ринитиса.

Зависне варијабле:

Носни симптом скор:

Од сваког од испитаника биће тражено да процени тежину својих симптома удружених са носном полипозом (носна опструкција, ослабљено чуло мириса, секреција из носа, свраб у носу, кијање) на дан укључења у студију и унутар седам дана након лачења кларитромицином, односно након хируршког лечења и да их класификује, методом по *Tsicopoulos*-у и сар. (13). Класификовање ће се вршити на следећи начин: 0 за одсуство симптома, 1 за лакше симптоме, 2 за средње тешке симптоме и 3 за тешке симптоме. Максимални носни симптом скор биће 15.

Ендоскопски скор:

Ендоскопски преглед носа ће бити рађен у седећем положају, уз употребу ригидног ендоскопа 0° и 30° (*Storz, Tuttlingen, Germany*) и то од стране истог лекара ринолога. Деконгестивне капи и анестетици неће бити употребљавани. Ендоскопски налаз пре и

унутар седам дана након лечења кларитромицином, односно након хируршког лечења, биће класификован методом по *Lildholdt*-у и сар. Проширеност носне полипозе је класификована у односу на анатомске детаље у носној шупљини на четири степена: 0 = без полипозе, 1 = лакша полипоза (мали полипи који не допиру до горње ивице доње носне шкољке), 2 = средње тешка полипоза (полипи средње величине који допиру до растојања између горње и доње ивице доње носне шкољке), 3 = тешка полипоза (велики полипи који допиру испод доње ивице доње носне шкољке). Максимални ендоскопски скор ће бити 6, посматрано обострано. Резултати лечења биће подељени на две категорије: *побољшање* и *без побољшања*. Под *побољшањем* ћемо подразумевати смањење величине носних полипа за више од једног степена након лечења кларитромицином, односно након хируршке терапије.

Концентрације цитокина и хемокина:

Узорци носног секрета биће узети од свих испитаника који су били на лечењу макролидним антибиотиком, пре и унутар седам дана након лечења кларитромицином, применом апсорпционе технике. Дрвени штапићи са ватом на врху ће се урањати у носни секрет у непосредној близини средњег носног ходника током 60 секунди. Затим ће сваки од узорака бити уроњен у *Eppendorf* епрувету која ће садржати по 1 мл „трансфер медијума“ (фосфатно пуферисани физиолошки раствор са 50 микрограма/мл гентамицина, 340 микрограма /мл пеницилина Г и 500 микрограма/мл фунгизона), током 30 минута, колико је потребно за дифузију цитокина/хемокина у „трансфер медијум“. Затим ће узорци бити центрифугирани на 1000 g током 10 минута, како би дошло до одвајања супернатанта од талога. Након тога ће супернатанти бити замрзнути на -70°C и чувани до детекције медијатора. Концентрације Th1 цитокина IL-2, IL-12 и IFN- γ , Th2 цитокина IL-4, IL-5 и IL-6, проинфламаторних цитокина TNF- α , TNF- β , IL-1 β , антиинфламаторног цитокина IL-10, и хемокина IL-8 биће мерене у сваком од узорака методом проточне цитофлуориметрије, коришћењем комерцијалног *flow* цитометријског кита (*Flow Cytomix, Bender MedSystems, USA*) на апарату проточном цитофлуориметру (*Beckman Coulter XL-MCL, USA*), који ће бити повезан са *BMS Flow Cytomix Pro 2.2 Software*-ом.

Број еозинофила у узорцима ткива носних полипа:

Узорци ткива носних полипа биће узети код свих испитаника код којих, након лечења кларитромицином, полипи буду нађени ендоскопским прегледом. Такође, свим пацијентима који ће бити хируршки лечени, биће узети узорци носних полипа. Узорци полипа ће бити фиксирани у 10%-тном формалину, уроњени у парафин, сечени микротомом на комадиће дебљине 5 микрометара и бојени хематоксилин-еозин техником. Патохистолошка анализа биће рађена на дигиталном оптичком микроскопу (*Nikon Coolscope*), повезаном са компјутеризованим системом анализе слика пресека ткива, уз коришћење *Image J software*-а. Еозинофили ће бити бројани при увећању $\times 400$. Поља посматрања ће бити оријентисана целом дужином уз епителијалну базалну мембрану. Да би се одредио средњи број еозинофила, биће прегледано 10 случајно изабраних поља на сваком од пресека ткива. Еозинофили ће бити бројани на сваком од пресека, одвојено у епителу и ламини проприји, након чега ће бити одређен њихов средњи број.

Праћење нежељених дејстава кларитромицина:

Сва нежељена дејства примењеног лека, укључујућу мучнину, дијареју, метални укус у устима, осипе по кожи, притисак испод десног ребарног лука и др. биће забележена. Непосредно пре примене кларитромицина, на крају првог и на крају другог месеца, свим пацијентима ће бити рађене анализе крви, са посебним освртом на крвну слику и индикаторе функције јетре (*AST, ALT, ALP, LDH*). Сваки испитаник код кога буду уочени

јачко изражени симптоми или поремећаји у лабораторијским налазима биће искључен из студије.

Интраоперативне и постоперативне компликације хируршког лечења:

Током сваке хируршке интервенције биће процењен интензитет крварења и то у односу на налаз у носној шупљини (величина полипа, присуство анатомских варијација носног септума и латералног зида носне шупљине, слузаво-гнојави секрет као знак бактеријске инфекције, оток и црвенило слузокоже носа као знак запаљења) као и у односу на примењену комбинацију два главна анестетика (севофлуран/ремифентанил или пропофол/ремифентанил) односно степен постизања контролисане хипотензије. Такође, биће забележено присуство компликација у постоперативном периоду, и то: крварење, слузаво-гнојава секреција из носа, настанак прираслица између оштећених површина слузокоже као и риноликвореја.

Д. Снага студије и величина узорка

Снага студије треба да буде минимално 80%, а вероватноћа грешке првог типа (α) износи 0,05. Значајност разлика између вредности процената болесника који ће након 12 месеци од завршене терапије, на основу објективног клиничког налаза (ендоскопског прегледа) испољити појаву полипа у носу, утврђиваће се применом χ^2 теста. Процена је да ће у групи пацијената који ће бити само хируршки лечени, 12 месеци након лечења, полипи ендоскопски бити верификовани у око 60% испитаника. Полазећи од претпоставке да ће очекивана разлика учесталости појаве полипа у носу између испитаника који ће прво добијати кларитромицин, а затим бити оперисани и оних који ће бити само хируршки лечени бити најмање 35%, произилази да је потребан број испитаника укупно 79. Дакле, у свакој испитиваној групи неопходно је учешће 40 болесника. За процену броја испитаника у групама користили смо програм *G*Power* 3.1.2.

Ђ. Статистичка обрада података

- Парна поређења унутар група вршиће се коришћењем непараметарског *Wilcoxon*-овог теста.
- Поређења међу различитим групама биће вршена применом непараметарског *Mann-Whitney U* теста, као и χ^2 теста.
- Разлике ће бити сматране статистички значајним уколико је p мањи или једнак од 0,05.
- За процену статистичке повезаности међу различитим параметрима користимо *Pearson*-ов тест корелације.
- Резултати ће бити представљени као средња вредност \pm стандардна девијација ($X \pm SD$)
- Сви статистички прорачуни биће урађени коришћењем *SPSS software-a* (*Statistical Package for the Social Sciences, version 11.0, SPSS Inc., Chicago, USA*).

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће дуготрајна, нискодозирана примена кларитромицина показати боље клиничке ефекте у неалергичних болесника са носним полипима. Такође, очекује се снижење концентрације хемокина IL-8 након терапије у неалергичних пацијената. Даље, очекује се снижење концентрације проинфламаторних Th1 цитокина TNF- α и IL-1 β у обе групе испитаника. Не очекује се смањење концентрација Th2 цитокина у носном секрету нити у једној од група испитаника. Очекује се значајна повезаност између снижења концентрација IL-8 у носном секрету и смањивања величине носних полипа у обе групе испитаника. Очекује се да ће примена кларитромицина имати мање изражене ефекте у пацијената са већим бројем еозинофила у узорцима ткива носних полипа, конкретно у оних са гушћом еозинофилном инфилтрацијом епителног слоја носне слузокоже. На крају, очекује се да ће у групи преоперативно лечених кларитромицином, 12 месеци након хируршког лечења, бити значајно мање испитаника којима ће ендоскопским прегледом бити уочено поновно присуство полипа у носу, у односу на испитанике који ће бити лечени само хируршки.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Основни циљ ове докторске дисертације је да дефинише ефекте преоперативне примене макролидних антибиотика (кларитромицина) у лечењу носно-синусне полипозе на клиничке симптоме и смањење величине полипа, а на основу промене медијатора запаљењских процеса, код алергичних и неалергичних болесника.

2.10 Име потенцијалног ментора

Проф. др сц мед. Данило Војводић,

Институт за медицинска истраживања, Одељење клиничке и експерименталне имунологије, Војномедицинска академија, Медицински факултет Универзитета одбране, Црнотравска 17, 11000 Београд, Србија; E-mail: vojvodic.danilo@gmail.com

2.11 Научна област дисертације

Медицина. Ужа научна област Оториноларингологија

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Љубица Живић, председник, ванредни професор
Факултета Медицинских наука Универзитета Крагујевцу, за ужу научну
област Оториноларингологија

2. Проф. др Данило Војводић, члан, ванредни професор Војномедицинске
академије у Београду, за ужу научну област Имунологија

3. Доц. др Ненад Балетић, члан, доцент Војномедицинске академије у
Београду, за ужу научну област Оториноларингологија
