

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΒΔΟΥΛΑ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΤΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΟΛΙΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΡΑΚΑΣΙΛΙΩΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος: Συγκριτική μελέτη του αναπνευστικού μικροβιώματος και του νίγομε σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και ινωτική πνευμονίτιδα υπερευαισθησίας.

Εισαγωγή-Στόχος-Τρέχουσες γνώσεις

Πολυάριθμες μελέτες του αναπνευστικού μικροβιώματος στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF) έχουν αναφέρει συσχετίσεις μεταξύ αλλαγών στο βακτηριακό φορτίο, τους μικροβιακούς πληθυσμούς, την εξέλιξη της νόσου και τη θνησιμότητα.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια αναζωπύρωση σχετικά με το ρόλο του μικροβιώματος και του νίγομε στον τομέα των διάμεσων πνευμονοπαθειών (Idiopathic Interstitial Lung Diseases, ILDs). Ο τομέας της επιστήμης του μικροβιώματος των πνευμόνων έχει επεκταθεί μέσω της εισαγωγής ανεξάρτητων τεχνικών καλλιέργειας – μια ικανότητα αναγνώρισης βακτηρίων με την αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA, ενός εξαιρετικά διατηρημένου γονιδίου μέσα στο βακτηριακό γονιδίωμα.

Οι περισσότερες από τις γνώσεις μας μέχρι σήμερα σχετικά με τον αντίκτυπο του μικροβιώματος των πνευμόνων στις ILDs προέρχονται από μελέτες κυρίως στην IPF, όπου περιβαλλοντικά αίτια/εκθέσεις, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και μικροβιακοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση παθολογικής θεραπευτικής απόκρισης. Οι προαναφερόμενοι παράγοντες μπορούν επίσης να επηρεάζουν την ποιότητα και ποσότητα του μικροβιώματος.

Οι ασθενείς με IPF έχουν σημαντικά υψηλότερο βακτηριακό φορτίο σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Στο πλαίσιο της IPF, ένα υψηλότερο βακτηριακό φορτίο συνδέεται με σημαντικά μειωμένο χρόνο επιβίωσης και επιταχυνόμενη εξέλιξη της νόσου, ανεξάρτητα από την ηλικία και την καπνιστική συνήθεια [1].

Ο Han και συν. έδειξαν ότι τα είδη *Veillonella*, *Prevotella* και *Cronobacter* ήταν τα πιο διαδεδομένα σε ασθενείς με IPF. Επιπλέον, η παρουσία άφθονων ακολουθιών Στρεπτόκοκκου ή Σταφυλόκοκκου συσχετίστηκε με επιταχυνόμενη εξέλιξη της νόσου [2]. Σε μια άλλη μελέτη στο μικροβίωμα των πνευμόνων ασθενών με IPF επικράτησαν συγκεκριμένα είδη, συμπεριλαμβανομένων των *Aιμόφιλος sp.*, *Neisseria sp.*, *Streptococcus sp.*, και *Veillonella sp.* [3]. Εκτός από το βακτηριακό φορτίο, η βακτηριακή ποικιλομορφία παίζει σημαντικό προγνωστικό ρόλο. Η μειωμένη ποικιλομορφία του πνευμονικού μικροβιώματος προβλέπει σχετίζεται με την εξέλιξη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης [4].

Σε άλλες συνήθειες ILDs, όπως ινωτική πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας (f-HP), τα δεδομένα για το μικροβίωμα είναι σπάνια. Η IPF και η f-HP είναι τα δύο νοσήματα που κυριαρχούν στη διαφορική διάγνωση των ινωτικών ILDs [5,6,7,8]. Η ακριβής διάγνωση δεν είναι πάντα εύκολη και υπάρχει διαγνωστική διχογνωμία ακόμη και μεταξύ εμπειρογνομόνων συμμετεχόντων σε διεπιστημονικές ομάδες. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η το βακτηριακό φορτίο σε ασθενείς με f-HP ήταν πολύ χαμηλότερο σε σύγκριση με ασθενείς με IPF. Επιπλέον, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ βακτηριακής επιβάρυνσης και επιβίωσης στην f-HP [9]. Ωστόσο, δεν υπάρχει επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων σε άλλες κοόρτες.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο ρόλος του *virome* σε ινωτικές ILDs είναι ακόμη λιγότερο μελετημένος. Ο Yin και συν. διερεύνησε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ IPF και ιογενούς έκφρασης RNA χρησιμοποιώντας αλληλουχία επόμενης γενιάς για 740 ιούς σε 28 δείγματα βιοψίας πνεύμονα ασθενών IPF και σε 20 μάρτυρες. Εντοπίστηκαν σποραδικές χαμηλής βεβαιότητας ενδείξεις ιογενών λοιμώξεων στα δείγματα πνευμονικών ιστών, αλλά δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά στην έκφραση οποιουδήποτε ιού, μεταξύ της IPF και των πνευμόνων ελέγχου [10].

Στόχος μας είναι να μελετήσουμε το ρόλο του μικροβιώματος, αλλά και του *virome* σε ασθενείς με IPF και f-HP. Συγκεκριμένα θα μελετηθεί το φορτίο και η ποικιλομορφία του μικροβιώματος και του *virome* σε ασθενείς με IPF και f-HP και θα συσχετισθεί με τη βαρύτητα και την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, θα μελετηθούν διαφορές του μικροβιώματος και του *virome* μεταξύ των δύο νοσημάτων, Τέλος, θα μελετηθούν τυχόν διαφορές με μελέτες μικροβιώματος που ήδη έχουν πραγματοποιηθεί.

Υπόθεση

Υπάρχουν διαφορές στο φορτίο καθώς και στη σύσταση του μικροβιώματος και του *virome* στους χαμηλότερους αεραγωγούς των ασθενών με IPF σε σύγκριση με υγιή άτομα και f-HP.

DOCTORAL THESIS

AVDOULA ELENI

SUPERVISOR: STEIROPOULOS PASCHALIS, ASSOCIATE PROFESSOR IN PULMONOLOGY

GEORGE KOLIOS: PROFESSOR OF PHARMACOLOGY

KARAKASILIOTIS IOANNIS: ASSISTANT PROFESSOR OF MEDICAL BIOLOGY-MOLECULAR VIROLOGY

Title: Comparative study of the respiratory microbiome and virome in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis and fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis.

Introduction-Aim-Current knowledge

Numerous studies of the respiratory microbiome in IPF have reported associations between changes in bacterial burden, microbial communities, disease progression and mortality.

In recent years there is a resurgence regarding the role of microbiome and virome in the field of Interstitial Lung Diseases (ILDs). The field of lung microbiome science has expanded through the introduction of culture independent techniques – an ability to identify bacteria by sequencing of the 16S rRNA gene, a highly conserved gene within the bacterial genome.

Most of our knowledge to date regarding the lung microbiome impact on ILDs mainly relates to the idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), where environmental exposures, gastro-esophageal reflux, and microbial agents have been hypothesized to initiate the aberrant healing response. The above mentioned factors can also have an effect on microbiome warranting further investigation.

Patients with IPF have significantly higher bacterial burden compared to normal controls. In the context of IPF, a higher bacterial load is associated with a significantly reduced progression-free survival time, independent of age and smoking status [1].

Han and colleagues showed that *Veillonella*, *Prevotella*, and *Cronobacter* species were the most prevalent in IPF patients; furthermore, the presence of abundant *Streptococcus* or *Staphylococcus* sequences was associated with a clinically significant reduction in progression-

free survival time [2]. In another study the lung microbiome reported in patients with IPF was predominated by several species including *Haemophilus sp.*, *Neisseria sp.*, *Streptococcus sp.*, and *Veillonella sp.* [3]. Besides bacterial burden, bacterial diversity plays an important prognostic role. Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis [4].

In other common ILDs, as fibrotic hypersensitivity pneumonitis (f-HP), data on microbiome are scarce. IPF and f-HP are two major components in the differential diagnosis of fibrotic ILDs [5,6,7,8]. Accurate diagnosis is not always straightforward and there is diagnostic debate even among expert multidisciplinary teams. Recently it has been demonstrated that the bacterial burden in f-HP subjects was far lower than those with IPF and there was no association between bacterial burden and survival in f-HP [9]. However, no validation of these results exists in other cohorts.

It is interesting that the role of virome in fibrotic ILDs is even less studied. Yin et al investigated the possible association between IPF and viral RNA expression using next-generation sequencing for 740 viruses in 28 IPF patient lung biopsy samples and 20 controls. They identified sporadic low-level evidence of viral infections in our lung tissue specimens, but did not find a statistical difference for expression of any virus, between IPF and control lungs [10].

Our aim is to study the role of microbiome and also virome in patients with IPF and f-HP and investigate possible differences with studies so far, correlations in bacterial burden and diversity with baseline disease severity and progression of disease and differences between these two diseases.

Hypothesis

There are differences in the bacterial and viral burden and composition in the lower airways of patients with IPF compared to healthy individuals and f-HP.