
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Rolul microbiomului în apariția și evoluția patologiei interstițiale pulmonare

Doctorand **Maria-Victoria Șuteu (Ruța)**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Carmen Monica Pop**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Boli pulmonare interstițiale	17
1.1. Pneumopatii interstițiale idiopatice (IIP)	19
1.1.1. Fibroza pulmonară idiopatică (IPF)	19
1.1.2. Pneumopatia interstițială nespecifică (NSIP)	21
1.1.3. Pneumopatii interstițiale idiopatice nediferențiate	22
1.2. Boli interstițiale pulmonare secundare afecțiunilor autoimune	22
1.2.1. Patologie interstițială secundară bolilor de țesut conjunctiv (CTD) sau bolilor de colagen	23
1.3. Patologie interstițială secundară bolilor granulomatoase-Sarcoidoza	24
1.4. Pneumonita de hipersensibilitate	25
2. Bolile pulmonare interstițiale și evaluarea inflamație periferice și pulmonare	27
2.1. NRL și SII în sângele periferic al pacienților cu patologie interstițială pulmonară	28
2.2. NRL în lavajul bronșiolo-alveolar al pacienților cu patologie interstițială pulmonară	28
3. Bolile pulmonare interstițiale și compoziția microbiomului pulmonar	31
3.1. Microbiomul pulmonar în context de fibroză pulmonară idiopatică (IPF)	32
3.2. Microbiomul pulmonar în patologia interstițială secundară (ILDs)	34
3.3. Microbiomul pulmonar în Sarcoidoză	34
3.4. Microbiomul pulmonar în pneumonita de hipersensibilitate	35
3.5. Microbiomul pulmonar în bolile interstițiale pulmonare neclasificabile (ILD neclasificabil)	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1 – Raportul neutrofile/limfocite (NRL) și indexul imuno inflamator sistemic (SII)-biomarkeri din sângele periferic pentru patologia interstițială pulmonară	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	46
3.3. Material și metodă	46
3.4. Rezultate	47
3.5. Discuții	50

3.6. Concluzii	53
4. Studiul 2 – Utilitatea raportului neutrofile/limfocite din lavajul bronșioalo-veolar (bNRL) în evaluarea statusului inflamator pulmonar la pacienții cu patologii interstițiale difuze	55
4.1. Introducere	55
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	56
4.3. Material și metodă	56
4.4. Rezultate	57
4.5. Discuții	60
4.6. Concluzii	62
5. Studiul 3 – Evaluarea microbiomului din fibroza pulmonară idiopatică (IPF), pneumonita de hipersensibilitate (HP) și boli interstițiale pulmonare neclasificabile (ILD neclasificabile)	63
5.1. Introducere	63
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	64
5.3. Material și metodă	64
5.4. Rezultate	66
5.5. Discuții	71
5.6. Concluzii	75
6. Discuții generale	77
7. Concluzii generale	79
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	81
REFERINȚE	83
ANEXE	99

Cuvinte cheie: patologie interstițială pulmonară, inflamație, lavaj bronșioalo-veolar, neutrofile, limfocite, microbiom.

INTRODUCERE

Patologia interstițială pulmonară (ILD) este un termen generic folosit pentru a descrie o serie de tulburări care afectează spațiul interstițial pulmonar, definit de spațiul existent între epiteliul alveolar și endoteliul vascular, spațiile din jurul alveolelor, vaselor de sânge și căilor respiratorii mici.

ILD au manifestărilor clinice, radiologice sau fiziopatologice similare, asociate de asemenea, cu alterarea extinsă a arhitecturii anatomice locale.

Această extindere și dezorganizare a structurilor pulmonare rezultă dintr-o interacțiune complexă gazdă-mediul și pot apărea secundar unui precipitant cunoscut, cum ar fi medicamentele, boli autoimune, boli granulomatoase (sarcoidoza) hipersensibilitatea triggeri inhalatori, în timp ce altele, pneumoniile interstițiale idiopatice (PII), nu au o cauză identificabilă.

Din cauza similitudinilor sunt dificil de diferențiat, căci nu există semne patognomonice de diagnostic, iar prognosticul și tratamentul este esențial diferit. Pentru diagnostic sunt necesare investigații complexe, unele invazive, dar mai ales integrarea informațiilor într-o discuție multidisciplinară.

Tomografia computerizată de înaltă rezoluție (HRCT) este gold standardul de evaluare a suspiciunii ILD.

Biomarkerii sunt indicatori ce trebuie măsurați în mod obiectiv, de la diagnostic și pe parcursul evolutiv al proceselor fiziopatologice, cu o serie de aplicații, inclusiv diagnostice, prognostice și de monitorizare a răspunsului la tratament.

Raportul neutrofile/limfocite (NRL) poate fi un marker rapid și ușor de obținut după o hemoleucogramă complexă care și-a dovedit utilitatea în diferite boli (cardio-vasculare, neoplazice, etc).

Bolile interstițiale pulmonare sunt consecința unui răspuns exagerat al organismului la un trigger extern, intern sau neidentificat, care declanșează o reacție reparatorie la nivelul țesutului pulmonar.

S-a ridicat suspiciunea că mecanismele inflamatorii și fibrogenza pot fi secundare unei disbioze pulmonare.

Studierea microbiomului pulmonar este dificilă, deoarece pentru acuratețea rezultatelor probele se extrag din lavaj bronșioalo-alveolar obținut prin bronhoscopie, evitând pasajul oro-faringian, populat cu un număr important de germeni.

În contextul în care ILD sunt încă subdiagnosticate și subtratate, identificarea unor factori predictivi de progresie ar putea să îmbunătățească managementul acestor pacienți.

Tehnologii bazate pe secvențierea genei ARNr 16S, au revoluționat semnificativ cunoștințele noastre în domeniu, dovedind că plămânii adăpostesc o gamă largă de specii microbiene diferite care sunt importante pentru menținerea stării de sănătate.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea de contribuție personală cuprinde trei studii, observaționale, prospective, desfășurate în spitalul de Pneumoftiziologie „Leon Daniello” Cluj-Napoca.

Patologia interstițială pulmonară este evaluată din prisma inflamației și prin compoziția microbiomului.

Lucrarea de față își propune să aducă o caracterizare mai profundă a acestor patologii, o identificare precoce a anumitor factori de risc suplimentari, cu posibile implicații terapeutice în viitor.

Scopul principal a fost obținerea unei amprente microbiene specifice fiecărui subtip de patologie interstițială.

Obiectivele principale ale cercetării au constat în:

- A. Evaluarea corelațiilor unor markeri inflamatori din sângele periferic, markeri noi (NRL și SII), la pacienții cu fibroză pulmonară idiopatică, forma cea mai agresivă din punct de vedere evolutiv, comparativ cu categoria de pacienți cu afectare interstițială secundară unor boli cunoscute (boală de sistem, autoimun, expunere, etc). Scopul este dovedirea eficienței acestora comparativ cu biomarkeri clasici dovediți care caracterizează progresia ILD (vârstă, sex, FVC, DLCO) (studiul 1)
- B. Evaluarea și compararea unor markeri inflamatori periferici (NRL_p) și locali (NRL -neutrofile/limfocite raport din lavaj bronșiolo-alveolar bNRL) atât la pacienții cu IPF cât și non IPF (ILD cu caracter fibrozant) (studiul 2)
- C. Identificarea amprente specifice microbiene pulmonare în momentul diagnosticului anumitor bolilor interstițiale respiratorii, anterior oricărei intervenții terapeutice medicamentoase. Aceasta este esența cercetării de față, abordată în studiul 3

Studiu 1. Raportul neutrofile/limfocite (NRL) și indexul imuno inflamator sistemic (SII)-biomarkeri din sângele periferic pentru patologia interstițială pulmonară

Introducere și obiective: Raportul neutrofile-limfocite (NLR) este un marker al inflamației subclinice în multe boli pulmonare precum cancerul, BPOC-ul, astmul, bronșiectaziile, apneea obstructivă de somn, obezitatea și multe boli cardiace (cardiopatie ischemică, infarct miocardic). Pacienții cu o valoare NLR mai mare au un număr relativ scăzut de limfocite și un număr mare de neutrofile și se urmărește indirect starea inflamatorie, precum și imunitatea mediată celular.

Indicele imuno-inflamator sistemic (SII), un nou indice legat de inflamație, este o combinație cuprinzătoare bazată pe numărul de limfocite periferice, neutrofile și trombocite. Se calculează astfel: $SII = \text{numărul de trombocite} \times \text{numărul de neutrofile/limfocite}$.

Conform studiilor anterioare, SII poate avea o valoare prognostică la pacienții cu cancer, iar un SII pretratament crescut este asociat cu rezultate slabe de supraviețuire.

SII a fost evaluat în alte boli pulmonare, în special în cancerul pulmonar, dar date despre valoarea lui prag sau implicații în contextul patologiei interstițiale pulmonare, n-au fost studiate.

Scopul studiului este de a evalua valoarea și valoarea limită a raportului neutrofile-limfocite (NRL) și a indicelui imuno-inflamator sistemic (SII) ca marker inflamator la pacienții cu IPF în comparație cu alte boli interstițiale secundare și lotul control de sănătoși. De asemenea, a fost analizat pe scurt rolul lor posibil ca factor de prognostic.

Material și metodă: NRL- definit ca număr absolut de neutrofile împărțit la numărul absolut de limfocite.

Indicele imuno-inflamator sistemic a fost calculat după formula existentă: $SII = \text{trombocite} \times \text{neutrofile/limfocite}$. Limita absolută a numărului de neutrofile a fost stabilită în funcție de limitele acceptate în România, între: (1,8-7,3/* 103/uL) neutrofile,

limfocite (1,5–4/* 103/uL), trombocite (140–440) /* 103/uL), VSH (6–11 mm/1 h), CRP (0–6 mg/L) și LDH (230–460/U/L), valori de referință conform laboratorului spitalului.

Valoarea medie de NLR și SII stabilită pentru subiecții sănătoși a fost 0,78 până în 3,53 conform literaturii și, respectiv, 569,73 ($\pm 326,67$), iar pentru SII pragul a fost stabilit prin media statistică la populația sănătoasă, fără a putea avea corespondent în literatură pentru ILD.

Rezultate: Populația analizată a avut peste 18 ani și a fost împărțită în două loturi: 42 de pacienți cu patologie interstițială confirmată și 50 de pacienți lot martor. În grupul de control, media NRL a fost 2,00 ($\pm 1,05$), având o valoare medie mai mică comparativ cu lotul de fibroze. Nu am putut identifica nicio diferență statistică a markerului SII între pacienții cu ILD și subiecții sănătoși ($p = 0,13$).

Concluzii: Valorile medii decelate, NLR de 2,8 și SII ≥ 600 la pacienții cu boală pulmonară interstițială neexacerbată sunt markeri distinctivi ai inflamației subclinice, urmând a fi integrate în intervale de referință pe grupuri de boli.

Studiu 2. Utilitatea raportului neutrofile limfocite din lavajul bronșiolo-alveolar (bNLR) în evaluarea statusului inflamator pulmonar la pacienții cu patologii interstițiale difuze

Introducere și obiective: Lavajul bronșiolo-alveolar este un instrument util în diagnosticul pneumopatiilor interstițiale difuze. Modificări ale numărului relativ sau absolut al diferitelor celule din lavaj pot ghida diagnosticul diferențial. Conform ATS/ERS, BAL se recomandă atunci când nu există un aspect de UIP tipic pe HRCT sau dacă există un grad crescut de incertitudine în ceea ce privește patologia interstițială difuză.

Evaluarea inflamației pulmonare prin determinarea NLR din BAL la pacienții cu ILD (IPF și non-IPF), stabile.

Identificarea unei valori prag a NRL în BAL care să ofere orientări diagnostice între diferite tipuri de ILD (idiopatice sau secundare).

Material și metodă: Studiu de cohortă prospectiv care s-a desfășurat între anii 2018-2019 în cadrul spitalului de Pneumoftiziologie “Leon Daniello” Cluj-Napoca.

Diagnosticul a fost pus conform ghidurilor în vigoare după evaluare clinică, imagistică, lavaj și discuția cazurilor în comisia multidisciplinară și fără a periclita stabilitatea clinică și biologică a cazurilor alese.

Pacienții au fost împărțiți ulterior în două grupuri cei cu fibroză pulmonară idiopatică (IPF) și cei cu alte ILD (non-IPF). Grupul de non-IPF a inclus pacienți cu pneumonită de hipersensibilitate, sarcoidoză și ILD nediferențiate.

Rezultate: Valoarea medie a bNLR găsită fost $2.73 + 1.14$ în grupul de non-IPF și 2.98 ± 1.72 la pacienții cu IPF, $p=0,65$.

Nu s-au găsit nicio corelație între NLR din lavaj și funcția pulmonară evaluate prin CVF sau DLCO.

Concluzii: Evaluarea inflamației locale pulmonare din BAL, prin variabila bNLR poate oferi minime informații diagnostice diferențiale cu valori mai crescute în IPF și HP.

Paradoxal bNRL prezintă valori mai crescute la grupul de pacienți cu boli idiopatice, ceea ce susține și mai mult teoria inflamatorie în patogeniza și întreținerea IPF.

Studiu 3. Evaluarea microbiomului din fibroza pulmonară idiopatică (IPF), pneumonita de hipersensibilitate (HP) și boli interstițiale pulmonare neclasificabile (ILD neclasificabile)

Introducere și obiective: Cunoașterea microbiomului pulmonar și impactul asupra apariției și evoluției bolilor pulmonare are un mare potențial în prevenirea și gestionarea acestora.

Microbiomul reprezintă o comunitate microbială, care interacționează reciproc și caracteristică unui habitat bine definit. Nu se referă doar la microorganismele implicate, ci cuprinde și spectrul lor de activitate, ceea ce are ca rezultat formarea unor nișe ecologice specifice, un micro-ecosistem dinamic și interactiv, predispus la schimbare în timp

Încărcătura bacteriană cât și compoziția comunității bacteriene au fost corelate cu evoluția ulterioară a bolii.

Obiectivul principal a fost caracterizarea microbiomului pulmonar, din punct de vedere al încărcăturii bacteriene, compoziției și diversității la pacienții cu anumite tipuri de ILD.

Al doilea obiectiv al studiului a fost de a efectua o analiză comparativă a microbiotei patologiilor cu diagnostic clar (IPF, HP) cu ILD neclasificabil.

Material și metodă: Este un studiu prospectiv, observațional, desfășurat în spitalul de Pneumoftiziologie „Leon Daniello” Cluj-Napoca, perioada 2019-2022, iar tuturor pacienților evaluați pentru lotul de microbiom li s-a efectuat fibrobronhoscopie, cu recoltarea de 2x2 ml BAL și depozitat la -80 grd, până la analiza de *secvențiere 16s rARN*.

Rezultate: În urma analizei secundare cu softul Ion Reporter v5.18 am obținut informații despre profilul microbial al fiecărui pacient în parte și am reușit să obținem informații până la nivel de specie.

Probele de IPF prezintă o comunitate bacteriană mai bogată comparativ cu HP și ILD nedeterminat, atât la nivel de familie cât și la nivel de gen. Evaluând media la toate cele 3 eșantioane se observă o componentă microbială asemănătoare, dominată de cele mai abundente familii: Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes și cu o medie redusă de Fusobacterii la toate eșantioanele, excepție ILD nediferențiat, unde media de Fusobacterii identificate este mai mare.

Concluzii: În timpul bolilor pulmonare interstițiale, microbiota se transformă într-o floră restrânsă dominată de familia Firmicutes, care include majoritatea microorganismelor potențial patogene, în paralel cu un declin al Bacteroides.

Aceste modificări perturbă foarte mult continuitatea modelului bacterian observat de la orofaringe spre arborele bronșic și plămân, cu posibil impact pe evoluția și severitatea bolilor pulmonare interstițiale.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Bolile interstițiale pulmonare reprezintă un subiect incomplet elucidat și-n plină dezvoltare, fiind pe trendul ascendent al cercetărilor internaționale actuale.

Datorită diagnosticului tardiv și alambicat, confuzia cu alte patologii pulmonare este frecventă, iar marea majoritate a pacienților sunt eronat încadrați în boli obstructive și urmează cel puțin un tratament inhalator anterior confirmării.

Având în vedere provocările diagnostice, lucrarea de față își propune identificarea și suplimentarea tehnicilor de diagnostic, prin metode noi și actuale.

Din multitudinea deILD, am selecționat categoriile cele mai frecvente, dar și cu impactul cel mai marcant asupra evoluției imprevizibile.

Prima contribuție este confirmarea unui aspect inflamator subexistent.

A doua contribuție originală este analiza inflamației pulmonare locale și aprecierea acesteia print-un raport de celule, NRL din BAL, o posibilă variabilă inflamatorie locală. NRL evaluat din BAL, poate reprezenta un semn precoce de infiltrație inflamatorie locală, fără corespondent macroscopic, dar care poate anticipa evoluția și facilitează administrarea unei terapii precoce și țintite.

Contribuția inovatoare a tezei este evaluarea microbiomului pulmonar, din punct de vedere al compoziției, diversității și încărcăturii bacteriene cu scopul de a identifica o amprentă bacteriană unică și specifice bolilor interstițiale pulmonare. Am cercetat microbiota pulmonară în momentul diagnosticului de subclasaILD, în context deIPF, HP șiILD neclasificat.

Conținutul lucrării se bazează pe ultimele cunoștințe internaționale în privința bolilor interstițiale care necesită viitoare verificări în viața reală a practicii pneumologice.

Originalitatea generală constă în deschiderea a noi perspective spre îmbunătățirea asistenței medicale individualizate, fiind foarte promițătoare pentru tratamentul și prevenirea bolilor.

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

Role of the microbiome in the development and progression of pulmonary interstitial pathology

PhD Candidate **Maria-Victoria Şuteu (Ruţa)**

PhD Supervisor **Prof. dr. Carmen Monica Pop**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Interstitial lung diseases	17
1.1. Idiopathic interstitial lung diseases (IIP)	19
1.1.1. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)	19
1.1.2. Non-specific interstitial lung disease (NSIP)	21
1.1.3. Undifferentiated idiopathic interstitial lung diseases	22
1. 2. Interstitial lung diseases secondary to autoimmune diseases	22
1.2.1 Interstitial disease secondary to connective tissue diseases (CTD) or collagen diseases	23
1.3. Interstitial pathology secondary to granulomatous diseases-Sarcoidosis	24
1.4. Hypersensitivity pneumonitis	25
2. Interstitial lung diseases and evaluation of peripheral and pulmonary inflammation	27
2.1. NRL and SII in peripheral blood of patients with pulmonary interstitial disease	28
2.2. NRL in bronchiolo-alveolar lavage of patients with pulmonary interstitial disease	28
3. Interstitial lung diseases and the composition of the lung microbiome	31
3.1. Lung microbiome in the context of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)	32
3.2. Lung microbiome in secondary interstitial lung disease (ILDs)	34
3.3. Lung microbiome in sarcoidosis	34
3.4. Lung microbiome in hypersensitivity pneumonitis	35
3.5. Lung microbiome in unclassifiable pulmonary interstitial diseases (unclassifiable ILDs)	35

PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	39
2. General methodology	41
3. Study 1 – Neutrophil/lymphocyte ratio (NRL) and systemic inflammatory immune index (SII)-biomarkers in peripheral blood for pulmonary interstitial pathology	45
3.1. Introduction	45
3.2. Working hypothesis/objectives	46
3.3. Material and method	46
3.4. Results	47
3.5. Discussion	50
3.6. Conclusions	53
4. Study 2 - Usefulness of the bronchioloalveolar lavage neutrophil/lymphocyte ratio (bNRL) in the assessment of pulmonary inflammatory status in patients with diffuse interstitial pathologies	55
4.1. Introduction	55
4.2. Working hypothesis/objectives	56
4.3. Material and method	56
4.4. Results	57
4.5. Discussion	60
4.6. Conclusions	62
5. Study 3 – Microbiome assessment in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), hypersensitivity pneumonitis (HP) and unclassifiable interstitial lung disease (ILD)	63
5.1. Introduction	63
5.2. Working hypothesis/objectives	64
5.3. Material and method	64
5.5. Results	66
5.5. Discussion	71
5.6. Conclusions	75
6. General discussion	77
7. General conclusions	79
8. Originality and innovative contributions of the thesis	81
REFERENCES	83
ANNEXES	99

Key words: pulmonary interstitial pathology, inflammation, bronchiolo-alveolar lavage, neutrophils, lymphocytes, microbiome.

INTRODUCTION

Interstitial lung disease (ILD) is an umbrella term used to describe a range of disorders affecting the interstitial lung space, defined as the space between the alveolar epithelium and the vascular endothelium, the spaces around the alveoli, blood vessels and small airways.

ILD have similar clinical, radiological or pathophysiological manifestations, also associated with extensive alteration of local anatomical architecture.

This enlargement and disorganization of lung structures results from a complex host-environment interaction and may occur secondary to a known precipitant such as drugs, autoimmune diseases, granulomatous diseases (sarcoidosis) hypersensitivity inhalant triggers, while others, idiopathic interstitial pneumonias (IIPs), have no identifiable cause.

Because of the similarities they are difficult to differentiate, as there are no pathognomonic diagnostic signs, and the prognosis and treatment is essentially different. Diagnosis requires complex investigations, some invasive, but above all integration of information in a multidisciplinary discussion.

High resolution computed tomography (HRCT) is the golden standard for assessing suspected ILD.

Biomarkers are indicators to be measured objectively, from diagnosis and throughout the course of pathophysiological processes, with a range of applications, including diagnostic, prognostic and monitoring response to treatment.

The neutrophil/lymphocyte ratio (NRL) can be a quick and easy marker to obtain after a complex haemoleucogram which has proven useful in various diseases (cardiovascular, neoplastic, etc.).

Pulmonary interstitial diseases are the consequence of an exaggerated response of the body to an external, internal or unidentified trigger that sets off a reparative reaction in the lung tissue.

It has been suspected that inflammatory mechanisms and fibrogenesis may be secondary to pulmonary dysbiosis.

The study of the lung microbiome is difficult because for accuracy of results, samples are extracted from bronchiolo-alveolar lavage obtained by bronchoscopy, avoiding the oropharyngeal passage, which is populated with a large number of germs.

In the context that ILDs are still underdiagnosed and undertreated, the identification of predictors of progression could improve the management of these patients.

Technologies based on 16S rRNA gene sequencing have significantly revolutionised our knowledge in this field, proving that the lungs harbour a wide range of different microbial species that are important for maintaining health.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contribution part includes three prospective, observational studies carried out in the "Leon Daniello" Pneumophthisiology Hospital in Cluj-Napoca.

Pulmonary interstitial pathology is evaluated in terms of inflammation and microbiome composition.

The present work aims to bring a deeper characterization of these pathologies, an early identification of some additional risk factors, with possible therapeutic implications in the future.

The main aim was to obtain a specific microbial fingerprint for each subtype of interstitial pathology.

The main objectives of the research were to:

- D. To evaluate the correlations of some peripheral blood inflammatory markers, novel markers (NRL and SII), in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, the most evolutionarily aggressive form, compared to the category of patients with interstitial involvement secondary to known diseases (systemic disease, autoimmune, exposure, etc.). The aim is to prove their efficacy compared to proven classical biomarkers characterizing ILD progression (age, sex, FVC, DLCO) (study 1)
- E. Evaluation and comparison of peripheral (NRLp) and local inflammatory markers (NRL -neutrophil/lymphocyte ratio from bronchiolo-alveolar lavage bNRL) in both IPF and non-IPF (fibrosing ILD) patients (study 2)
- F. Identification of the specific lung microbial fingerprint at the time of diagnosis of certain respiratory interstitial diseases, prior to any therapeutic drug intervention. This is the essence of the present research, addressed in study 3

Study 1. Neutrophil/lymphocyte ratio (NRL) and systemic inflammatory immune index (SII)-biomarkers in peripheral blood for pulmonary interstitial pathology

Introduction and Aims: Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) is a marker of subclinical inflammation in many lung diseases such as cancer, COPD, asthma, bronchiectasis, obstructive sleep apnea, obesity and many cardiac diseases (ischemic heart disease, myocardial infarction). Patients with a higher NLR value have a relatively low lymphocyte count and a high neutrophil count, and the inflammatory state is indirectly followed, as well as cell-mediated immunity.

The Systemic Immuno-Inflammatory Index (SII), a new inflammation-related index, is a comprehensive combination based on the number of peripheral lymphocytes, neutrophils and platelets. It is calculated as follows: $SII = \text{platelet count} \times \text{neutrophil/lymphocyte count}$.

According to previous studies, SII may have prognostic value in cancer patients, and an increased pre-treatment SII is associated with poor survival outcomes.

SII has been evaluated in other lung diseases, particularly lung cancer, but data on its threshold value or implications in the context of lung interstitial pathology have not been studied.

The aim of the study is to assess the value and cut-off value of neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and systemic immune-inflammatory index (SII) as an inflammatory marker in patients with IPF compared to other secondary interstitial diseases and healthy controls. Their possible role as a prognostic factor was also briefly analyzed.

Material and method: NRL- defined as the absolute number of neutrophils divided by the absolute number of lymphocytes.

Systemic immune-inflammatory index was calculated according to the existing formula: $SII = \text{platelets} \times \text{neutrophils} / \text{lymphocytes}$. The absolute limit of neutrophil count was established according to the accepted limits in Romania, between: (1.8-7.3/* 103/uL) neutrophils, lymphocytes (1.5-4/* 103/uL), platelets (140-440/* 103/uL), ESR (6-11 mm/1 h), CRP (0-6 mg/L) and LDH (230-460/U/L), reference values according to the hospital laboratory.

The mean NLR and SII values established for healthy subjects were 0.78 to 3.53 according to the literature and 569.73 (± 326.67), respectively, and for SII the threshold was established by statistical mean in the healthy population, with no literature correspondence for ILD.

RESULTS: The analyzed population was over 18 years old and was divided into two groups: 42 patients with confirmed ILD and 50 patients control group. In the control group, the mean NRL was 2.00 (± 1.05), having a lower mean value compared to the fibrosis group. We could not identify any statistical difference in IBS marker between ILD patients and healthy subjects ($p = 0.13$).

Conclusions: The detected mean values, NLR of 2.8 and $SII \geq 600$ in patients with non-exacerbated ILD are distinctive markers of subclinical inflammation and should be integrated into reference intervals by disease groups.

Study 2. Usefulness of bronchioloalveolar lavage neutrophil lymphocyte ratio (bNLR) in assessing lung inflammatory status in patients with diffuse interstitial pathology

Introduction and Aims: Bronchiolo-alveolar lavage is a useful tool in the diagnosis of diffuse interstitial lung disease. Changes in the relative or absolute number of different cells in the lavage can guide the differential diagnosis. According to ATS/ERS, BAL is recommended when there is no typical UIP appearance on HRCT or if there is a high degree of uncertainty regarding diffuse interstitial pathology.

Assessment of lung inflammation by determination of NLR from BAL in patients with ILD (IPF and non-IPF), stable.

Identify a threshold value of NLR in BAL that provides diagnostic guidance between different types of ILD (idiopathic or secondary).

Material and method: Prospective cohort study conducted between 2018- 2019 in the Pneumophthisiology Hospital "Leon Daniello" Cluj-Napoca.

Diagnosis was made according to current guidelines after clinical evaluation, imaging, lavage and discussion of cases in the multidisciplinary committee and without jeopardizing the clinical and biological stability of the selected cases.

Patients were further divided into two groups those with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and those with other ILDs (non-IPF). The non-IPF group included patients with hypersensitivity pneumonitis, sarcoidosis and undifferentiated ILDs.

Results: The mean bNLR found was $2.73 + 1.14$ in the non-IPF group and 2.98 ± 1.72 in patients with IPF, $p=0.65$.

No correlation was found between NLR from lavage and lung function assessed by FVC or DLCO.

Conclusions: Assessment of local lung inflammation in BAL by the bNLR variable may provide minimal differential diagnostic information with higher values in IPF and PH. Paradoxically bNRL shows higher values in the idiopathic disease group, which further supports the inflammatory theory in the pathogenesis and maintenance of IPF.

Study 3. Microbiome assessment in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), hypersensitivity pneumonitis (HP) and unclassifiable interstitial lung disease (ILD)

Introduction and objectives: Knowledge of the lung microbiome and its impact on the development and progression of lung diseases has great potential in their prevention and management.

The microbiome represents a microbial community, interacting with each other and characteristic of a well-defined habitat. It does not only refer to the micro-organisms involved, but also encompasses their spectrum of activity, resulting in the formation of specific ecological niches, a dynamic and interactive micro-ecosystem, prone to change over time.

Both the bacterial load and the composition of the bacterial community have been correlated with the subsequent evolution of the disease.

The main objective was to characterize the lung microbiome in terms of bacterial load, composition and diversity in patients with specific types of ILD.

The second objective of the study was to perform a comparative analysis of the microbiota of pathologies with a clear diagnosis (IPF, HP) with unclassifiable ILD.

Material and method: This is a prospective, observational study, conducted in the Pneumophthisiology Hospital "Leon Daniello" Cluj-Napoca, period 2019-2022, and all patients evaluated for microbiome batch underwent a fibrobronchoscopy, with collection of 2x2 ml BAL and stored at -80 grd, until 16s rRNA sequencing analysis.

Results: Following secondary analysis with the Ion Reporter v5.18 software, we obtained information on the microbial profile of each patient and were able to obtain information down to the species level.

IPF samples show a richer bacterial community compared to HP and undetermined ILD, both at family and genus level. Evaluating the average across all 3 samples shows a similar microbial composition, dominated by the most abundant families: Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes and with a low average of Fusobacteria in all samples except ILD undifferentiated, where the average of Fusobacteria identified is higher.

Conclusions: During interstitial lung disease, the microbiota transforms into a restricted flora dominated by the Firmicutes family, which includes the majority of potentially pathogenic microorganisms, in parallel with a decline of Bacteroides.

These changes greatly disrupt the continuity of the bacterial pattern observed from the oropharynx to the bronchial tree and lung, with possible impact on the progression and severity of interstitial lung diseases.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Pulmonary interstitial diseases are an incompletely elucidated and rapidly developing topic and are on the upward trend of current international research.

Due to late and confusing diagnosis, confusion with other lung pathologies is frequent, and the vast majority of patients are misclassified as obstructive diseases and undergo at least one inhalation treatment prior to confirmation.

Given the diagnostic challenges, this paper aims to identify and complement diagnostic techniques with new and current methods.

From the multitude of ILDs, we have selected the most common categories, but also with the most marked impact on the unpredictable evolution.

The first contribution is the confirmation of an underlying inflammatory aspect.

The second original contribution is the analysis of local lung inflammation and its assessment by a cell report, NRL from BAL, a possible local inflammatory variable. NRL assessed from BAL, may represent an early sign of local inflammatory infiltration, without macroscopic correspondence, but which can anticipate progression and facilitate early and targeted therapy.

The innovative contribution of the thesis is the evaluation of the lung microbiome in terms of composition, diversity and bacterial load with the aim of identifying a unique bacterial fingerprint specific to pulmonary interstitial diseases. We investigated the lung microbiota at the time of ILD subclass diagnosis in the context of IPF, HP and unclassified ILD.

The content of the paper is based on the latest international knowledge on interstitial diseases that require future verification in real-life pulmonary practice.

The overall originality lies in opening new perspectives towards improving individualized care and is very promising for the treatment and prevention of diseases.