



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της σύστασης του μικροβιώματος σε υγρό
βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης (BAL) ασθενών με
χρόνιες αναπνευστικές ασθένειες**

Τσολακίδου Μαρία του Αποστόλου

A.E.M.: 01629

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

University of Thessaly

Department of Biochemistry & Biotechnology

Undergraduate Thesis

**Study of lung microbiome composition in
bronchoalveolar lavage fluid (BAL) of chronic lung
disease patients**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Ευχαριστίες..... | 6 |
| Περίληψη..... | 7 |
| Abstract | 8 |
| 1. Το μικροβίωμα του πνεύμονα | 9 |
| 1.1 Γενικά..... | 9 |
| 1.2 Οικολογικοί παράγοντες που καθορίζουν τη σύσταση του πνευμονικού μικροβιώματος | 11 |
| 1.3 Το μικροβίωμα του πνεύμονα στην υγεία..... | 12 |
| 1.3.1 Η λειτουργική επίδραση του μικροβιώματος των πνευμόνων στην υγεία του ανθρώπου | 16 |
| 1.4 Το μικροβίωμα του πνεύμονα στις πνευμονοπάθειες | 18 |
| 1.4.1 Υποθέσεις για τον ρόλο του μικροβιώματος στην παθογένεση..... | 20 |
| 1.5 Χρόνιες αναπνευστικές ασθένειες..... | 20 |
| 1.5.1 Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση | 20 |
| 1.5.1.1 Το μικροβίωμα των πνευμόνων σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση..... | 23 |
| 1.5.2 Σαρκοείδωση..... | 27 |
| 1.5.2.1 Το μικροβίωμα του πνεύμονα σε ασθενείς με Σαρκοείδωση | 29 |
| 1.6 Σκοπός της μελέτης | 31 |
| 2. Δειγματοληψία υγρού βροχοκυψελιδικής έκπλυσης..... | 33 |
| 2.1 Απομόνωση DNA από το υγρό βροχοκυψελιδικής έκπλυσης (BAL)..... | 33 |
| 2.2 Προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση | 35 |
| 2.2.1 Ποσοτικοποίηση του DNA με Qubit..... | 35 |
| 2.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων και της περιοχής ITS των μυκήτων με PCR (1 ^η αντίδραση) | 36 |
| 2.2.3 PCR εσωτερικής ένθεσης για την προσθήκη της ειδικής για κάθε δείγμα αλληλουχίας δείκτη (2 ^η αντίδραση) | 38 |
| 2.3. Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση | 41 |
| 2.3.1. Πρωτόκολλο βιοπληροφορικών και στατιστικών αναλύσεων | 41 |
| 2.3.2. Ορισμοί – επεξηγήσεις..... | 42 |
| 3. Αποτελέσματα | 44 |
| 3.1 Ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων αλληλούχισης | 44 |
| 3.2 Ανάλυση της α-ποικιλότητας βακτηρίων και μυκήτων..... | 45 |
| 3.3 Ανάλυση της β-ποικιλότητας βακτηρίων και μυκήτων..... | 48 |
| 3.3.1 Non-metric Multidimensional Scaling ανάλυση..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Πολυπαραγοντική ανάλυση Canonical Correspondence..... | 50 |
| 3.4 Ανάλυση παραλλακτικότητας της αφθονίας των βακτηρίων και των μυκήτων | 52 |
| 3.5 Σύθεση της μικροβιακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου, οικογένειας και γένους | 58 |
| 4. Συμπεράσματα - συζήτηση | 67 |
| Βιβλιογραφία | 71 |

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τα μέλη του Εργαστηρίου και την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συνεργασία.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Δρ. Καρά Παναγιώτη για τη βοήθεια και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να ολοκληρωθούν η πειραματική διαδικασία και η βιοπληροφορική ανάλυση.

Περίληψη

Πολυάριθμες επιστημονικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν την τελευταία δεκαετία επιβεβαιώνουν την παρουσία μικροβιακών κοινοτήτων στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου, τόσο στην υγεία, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η διενέργεια αυτών των ερευνών κατέστη δυνατή εξαιτίας της ανάπτυξης μοριακών τεχνικών ανίχνευσης και αναγνώρισης των μικροοργανισμών και κατάλληλων μεθόδων ανάκτησης αναπνευστικών δειγμάτων. Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των βακτηριακών και μυκηλιακών κοινοτήτων των πνευμόνων ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και πνευμονική σαρκοείδωση. Συνολικά, αξιολογήθηκαν 35 δείγματα υγρού βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης (ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, σαρκοείδωσης και μάρτυρα) με σκοπό τον προσδιορισμό της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας στην κάθε νόσο και την εξέταση των δεικτών οικολογίας α-ποικιλότητας και β-ποικιλότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σύνθεση της κοινότητας μεταξύ των διαφορετικών ομάδων συμμετεχόντων. Από την ανάλυση παραλλακτικότητας της αφθονίας προέκυψαν 26 στατιστικά σημαντικά βακτηριακά ASVs, ενώ για τη μυκηλιακή κοινότητα προέκυψαν 4 στατιστικά σημαντικά ASVs. Τέλος, βρέθηκε πως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση χαρακτηρίζεται από αυξημένη σχετική αφθονία των βακτηριακών γενών *Streptococcus* και *Veillonella*, ενώ η σαρκοείδωση χαρακτηρίζεται από αυξημένη σχετική αφθονία του *Acinetobacter*. Αντίστοιχα, από την ανάλυση της μυκηλιακής κοινότητας προέκυψε αυξημένη σχετική αφθονία των *Saccharomyces*, *Candida* και *Malassezia* και στις δύο νόσους. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με στοιχεία που έχουν δημοσιευτεί στην παγκόσμια επιστημονική βιβλιογραφία.

Λέξεις κλειδιά: βρογχοκυψελιδική έκπλυση, μικροβίωμα, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, σαρκοείδωση, αλληλούχιση νέας γενιάς, 16S rRNA, ITS

Abstract

Numerous scientific studies carried out in the last decade confirm the presence of microbial communities in the lower respiratory tract, both in health and in pathological conditions. These investigations were made possible due to the development of advanced molecular techniques for the detection and identification of microorganisms, and due to the development of appropriate sampling methods. In this undergraduate thesis, a study of the bacterial and fungal communities in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis was conducted. In total, 35 bronchoalveolar lavage fluid samples (idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis and control samples) were evaluated in order to determine the composition of the microbial community in each disease group and to examine the ecology indexes of alpha and beta diversity. No statistically significant differences were found in the composition of the community between the different groups of participants. From the differential abundance analysis 26 statistically significant bacterial ASVs emerged, while 4 emerged for the fungal community. Finally, it was found that idiopathic pulmonary fibrosis is characterized by an increase in the relative abundance of the bacterial genera *Streptococcus* and *Veillonella*, while sarcoidosis is characterized by an increased relative abundance of *Acinetobacter*. Accordingly, analysis of the fungal community revealed an increased relative abundance of *Saccharomyces*, *Candida* and *Malassezia* in both diseases. The findings of the present study are in agreement with data previously published in the global scientific literature.

Key words: bronchoalveolar lavage, microbiome, idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, next generation sequencing, 16S rRNA, ITS

1. Το μικροβίωμα του πνεύμονα

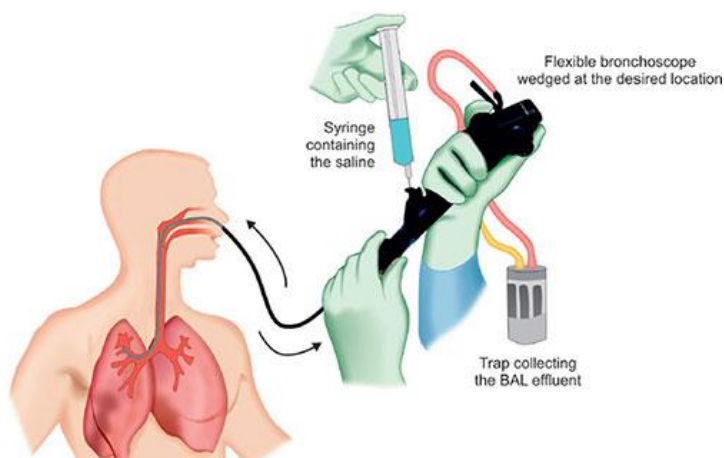
1.1 Γενικά

Ο όρος «μικροβίωμα» ορίστηκε για πρώτη φορά σε επιστημονική δημοσίευση το 2001 (Lederberg & McCray, 2001), ως η οικολογική κοινότητα κοινών, συμβιωτικών και παθογόνων μικροοργανισμών που μοιράζονται τον χώρο του σώματος. Το 2007 ξεκίνησε το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Μικροβιώματος με σκοπό να χαρακτηρίσει την οικολογία των μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με τον άνθρωπο και τις επιδράσεις τους στη φυσιολογία και την προδιάθεση για ασθένειες (Turnbaugh et al., 2007). Στη μελέτη, ωστόσο, δεν συμπεριλήφθηκε το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Αυτή η απόφαση λήφθηκε εξαιτίας της δυσκολίας στη δειγματοληψία και της άποψης πως ο φυσιολογικός πνεύμονας είναι απαλλαγμένος από βακτήρια (Kumar et al., 2015). Η επικράτηση της αντίληψης της στείρωσης των υγιών πνευμόνων οφείλεται πιθανώς στην λανθασμένη εφαρμογή και παρερμηνεία πρωτοκόλλων κλινικής μικροβιολογίας που σχεδιάστηκαν για την αναγνώριση παθογόνων του αναπνευστικού (Dickson et al., 2016).

Η δειγματοληψία στους κατώτερους αεραγωγούς μπορεί να γίνει με αρκετούς τρόπους, διεισδυτικούς και μη. Στις περισσότερες περιπτώσεις προτιμάται η βρογχοκυψελιδική έκπλυση, είτε ως μοναδική μέθοδος δειγματοληψίας, είτε σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο (Carney et al., 2020). Με τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση επιτυγχάνεται η ανάκτηση αναπνευστικών εκκρίσεων για την εξέταση κυτταρικών και μη συστατικών τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς (Meyer & Raghu, 2011). Κατά τη βρογχοσκόπηση, το βρογχοσκόπιο εισέρχεται μέσω της ρινικής ή της στοματικής οδού στους κατώτερους αεραγωγούς, όπου απελευθερώνει φυσιολογικό ορό, τον οποίο στη συνέχεια συλλέγει μαζί με κύτταρα, βλέννα και άλλες ουσίες που βρίσκονται στους πνεύμονες τη στιγμή της δειγματοληψίας (**Εικόνα 1**). Το υγρό που συλλέγεται χρησιμοποιείται για κυτταρολογικές αναλύσεις, χρώση Gram, καλλιέργεια καθώς και για την ανάλυση άλλων βιοδεικτών που συνολικά διευκολύνουν τη διάγνωση (Collins et al., 2014).

Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών ώθησε την έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο τα τελευταία χρόνια καθώς κατέστησε δυνατό τον προσδιορισμό των μικροοργανισμών σε πνευμονικά δείγματα, χωρίς την ανάγκη χρήσης κλασικών μεθόδων μικροβιολογίας όπως οι καλλιέργειες σε τριβλία. Ωστόσο, όπως σε κάθε εκκολαπτόμενο και εξελισσόμενο ερευνητικό πεδίο, δεν υπάρχουν ακόμα καθιερωμένες κατευθυντήριες ή ευρέως

υιοθετημένες πρακτικές, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σημαντικά προβλήματα αναπαραγωγιμότητας και σύνθεσης δεδομένων μεταξύ των μελετών (Carney et al., 2020).



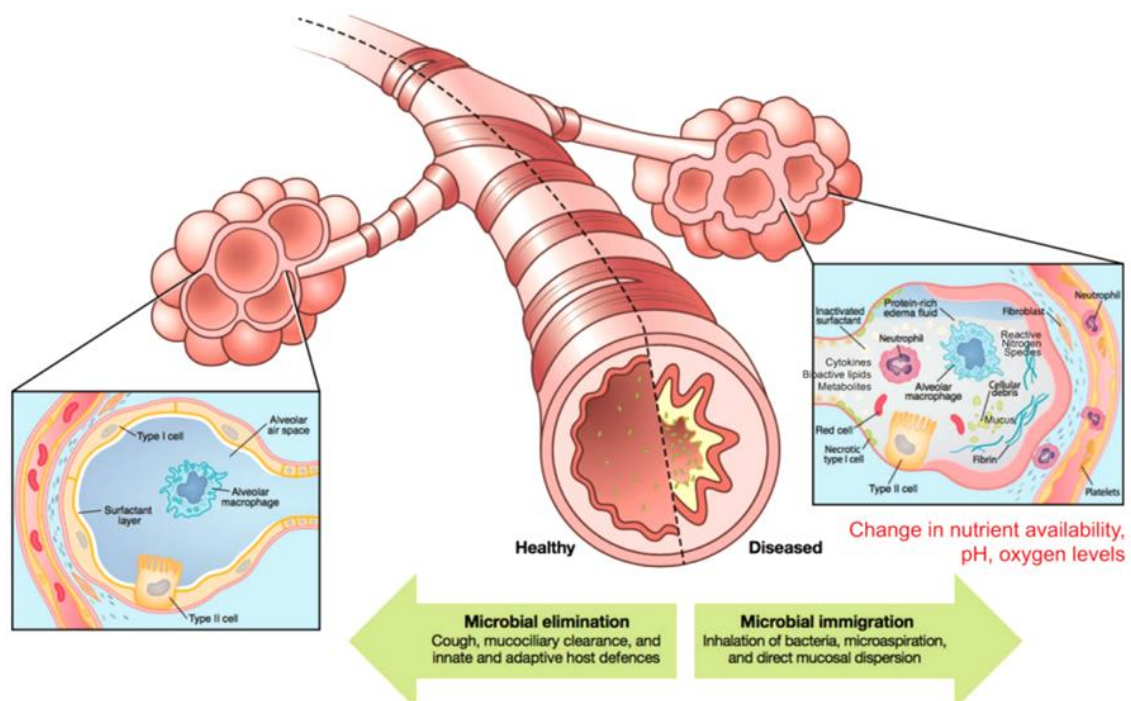
Εικόνα 1: Βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL) είναι μια ήπια επεμβατική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη λήψη εκκρίσεων και κυττάρων για διαγνωστικούς σκοπούς από τους περιφερικούς αεραγωγούς και τις κυψελίδες. Ο εξοπλισμός που απαιτείται περιλαμβάνει το βρογχοσκόπιο, αποστειρωμένο δοχείο συλλογής, σωλήνα αναρρόφησης, αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, σύριγγα και τοπικό αναισθητικό. Η διαδικασία βρογχοκυψελιδικής πλύσης θεωρείται αρκετά ασφαλής και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για ερευνητικούς σκοπούς και κλινική αξιολόγηση ασθενών. Κατά τη βρογχοσκόπηση, το βρογχοσκόπιο εισέρχεται μέσω της ρινικής ή της στοματικής οδού στους κατώτερους αεραγωγούς, όπου απελευθερώνει φυσιολογικό ορό, τον οποίο στη συνέχεια συλλέγει μαζί με κύτταρα, βλέννα και άλλες ουσίες που βρίσκονται στους πνεύμονες τη στιγμή της δειγματοληψίας (Sorino, 2017).

Από το 2010, που έγινε η πρώτη αναφορά για «μικροβίωμα των πνευμόνων» με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Hilty et al., 2010), πολυάριθμες δημοσιεύσεις επιβεβαιώνουν την ύπαρξη βακτηρίων στους κατώτερους αεραγωγούς. Οι περισσότερες αφορούν τα βακτήρια που εντοπίζονται στους πνεύμονες σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ενώ δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για το μικροβίωμα σε υγιείς αλλά και σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και σαρκοείδωση (Carney et al., 2020).

Η βαθύτερη κατανόηση της φύσης και της επίδρασης του μικροβιώματος του πνεύμονα κατά την υγεία και την ασθένεια μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για νέες διαγνωστικές ή και θεραπευτικές προσεγγίσεις (Huffnagle et al., 2017).

1.2 Οικολογικοί παράγοντες που καθορίζουν τη σύσταση του πνευμονικού μικροβιώματος

Η σύσταση του μικροβιώματος στους πνεύμονες καθορίζεται από την ισορροπία τριών οικολογικών παραγόντων, της μικροβιακής μετανάστευσης και αποβολής, και του σχετικού ρυθμού αναπαραγωγής των μικροβίων που βρίσκονται στους αεραγωγούς (Εικόνα 2) (Dickson et al., 2014). Η μικροβιακή μετανάστευση επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της μικρο-αναρρόφησης, δηλαδή της επαναλαμβανόμενης υποκλινικής αναρρόφησης μικρών ποσοτήτων υγρού, αλλά μπορεί να γίνει και άμεσα μέσω της εισπνοής βακτηρίων και της διασποράς βλέννας (Bassis et al., 2015; Dickson et al., 2015). Η μικροβιακή αποβολή επιτυγχάνεται με το αντανακλαστικό του βήχα και τη μηχανική και ανοσολογική κάθαρση των αεραγωγών (Huffnagle et al., 2017). Τέλος, ο ρυθμός αναπαραγωγής των βακτηρίων καθορίζεται από τις τοπικές συνθήκες ανάπτυξης που επικρατούν στους πνεύμονες, όπως είναι η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, οι τιμές της θερμοκρασίας και του pH, αλλά και οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή (Dickson et al., 2014). Οποιαδήποτε μεταβολή στις μικροβιακές κοινότητες του πνεύμονα, σε ένα άτομο ή όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 σε καταστάσεις ασθένειας, πρέπει να είναι το αποτέλεσμα μιας αλλαγής σε έναν από αυτούς τους τρεις παράγοντες (Huffnagle et al., 2017).



Εικόνα 2: Μοντέλο των οικολογικών, μικροβιακών, δομικών και ανοσολογικών παραγόντων που καθορίζουν τη σύσταση του πνευμονικού μικροβιώματος κατά την υγεία και την ασθένεια. Οι τρεις καθοριστικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τη μικροβιακή μετανάστευση, την αποβολή και τον σχετικό ρυθμό αναπαραγωγής των μικροβίων. Η μικροβιακή μετανάστευση επιτυγχάνεται με τη μικρο-αναρρόφηση, την εισπνοή των μικροοργανισμών και με τη διασπορά βλέννας. Η μικροβιακή

αποβολή γίνεται μέσω της μηχανικής και ανοσολογικής κάθαρσης των αεραγωγών και, τέλος, ο ρυθμός αναπαραγωγής των μικροοργανισμών εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στους πνεύμονες, όπως είναι η διαθεσιμότητα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, η θερμοκρασία και το pH. Στους υγιείς αεραγωγούς (αριστερά), η σύσταση του μικροβιώματος επηρεάζεται κυρίως από την ισορροπία μεταξύ μετανάστευσης και αποβολής μικροοργανισμών. Σε περίπτωση πνευμονοπάθειας (δεξιά), η μικροβιακή σύσταση καθορίζεται κυρίως από τις συνθήκες ανάπτυξης, οι οποίες δημιουργούν διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα εντός των πνευμόνων. Η διαστολή των τοιχωμάτων των αεραγωγών και η αυξημένη παραγωγή βλέννας, καθώς και οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή δημιουργούν συνθήκες που ευνοούν ορισμένους μικροοργανισμούς έναντι άλλων (Huffnagle et al., 2017).

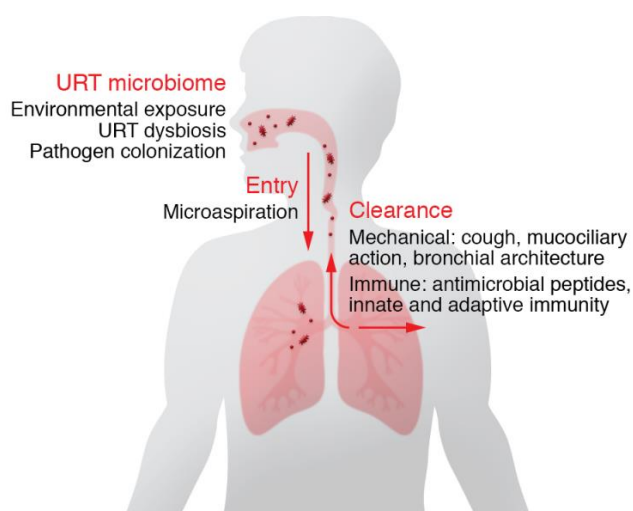
1.3 Το μικροβίωμα του πνεύμονα στην υγεία

Η μικροβιακή κοινότητα των πνευμόνων διαφέρει τόσο σε αφθονία όσο και σε δυναμική από άλλα πιο εδραιωμένα μικροβιώματα του ανθρώπινου σώματος, όπως είναι το εντερικό, το ρινικό και το μικροβίωμα του δέρματος (Whiteside et al., 2021). Ενώ οι πνεύμονες και η γαστρεντερική οδός έχουν κοινή εμβρυολογική προέλευση και αποτελούνται από επιφάνειες που καλύπτονται με βλεννογόνο, τα ανατομικά, μακροσκοπικά, μικροσκοπικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους είναι αρκετά διακριτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα έντονες διαφορές στη σύνθεση και τη αφθονία του μικροβιακού πληθυσμού των αντίστοιχων μικροβιωμάτων (Huffnagle et al., 2017).

Αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως το μικροβίωμα των πνευμόνων μοιάζει περισσότερο με αυτό της ανώτερης αναπνευστικής οδού και συγκεκριμένα της περιοχής της επιγλωττίδας (Morris et al., 2013; Segal et al., 2013; Venkataraman et al., 2015; Marsh et al., 2016). Η βακτηριακή αφθονία, ωστόσο, είναι τάξεις μεγέθους χαμηλότερη στους πνεύμονες (Charlson et al., 2011; Dickson et al., 2015). Η ομοιότητα στη σύνθεση των κοινοτήτων στις δύο αυτές γεινιάζουσες ανατομικές περιοχές και η σημαντική διαφορά στην αφθονία των μικροοργανισμών υποδηλώνει ότι η μικροχλωρίδα του πνεύμονα προέρχεται παθητικά από την ανώτερη αναπνευστική οδό (Bassis et al., 2015; Dickson et al., 2017).

Έχουν διατυπωθεί διαφορετικές απόψεις μεταξύ των ειδικών όσον αφορά τη σχετική αφθονία των εγκαθιδρυμένων βακτηριακών κοινοτήτων στους υγιείς πνεύμονες, που επηρεάζονται άμεσα από τις τοπικές συνθήκες ανάπτυξης, έναντι των παροδικών μελών της κοινότητας, των οποίων η αφθονία καθορίζεται αποκλειστικά από τα ποσοστά της μικροβιακής μετανάστευσης και αποβολής (Dickson et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν πως οι πνεύμονες δεν περιέχουν σταθερό και διακριτό μικροβίωμα, αλλά βακτήρια που αντανakλούν σε μεγαλύτερο βαθμό τις κοινότητες της ανώτερης αναπνευστικής οδού (Charlson et al., 2011; Venkataraman et al., 2015), ενώ

άλλες ερευνητικές ομάδες αναφέρουν την ύπαρξη διακριτού πνευμονικού μικροβιώματος (Erb-Downward et al., 2011; Segal et al., 2013). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν την ιδέα μιας παροδικής μικροβιακής χλωρίδας των αεραγωγών με έναν πιο σταθερό μικροβιακό πυρήνα (Nielsen et al., 2021). Αυτή η προσέγγιση επιβεβαιώνεται από την ερευνητική ομάδα των Dickson et al. (2015) που απέδειξε πως η χωρική διακύμανση της μικροβιακής σύστασης στους πνεύμονες υγιών ατόμων δεν είναι στατιστικά σημαντική, παρά τη διακύμανση των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων. Επομένως, στην υγεία η σύσταση του μικροβιώματος καθορίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τη μικροβιακή μετανάστευση και αποβολή, παρά από τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Οικολογική δυναμική του μικροβιώματος του πνεύμονα. Το μικροβίωμα του πνεύμονα καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ της μετανάστευσης από την ανώτερη αναπνευστική οδό και αποβολής μέσω ανοσολογικών και μηχανικών διεργασιών. Σε υγιείς πνεύμονες, η τοπική μικροβιακή αναπαραγωγή στους αεραγωγούς και στο πνευμονικό παρέγχυμα είναι περιορισμένη. Στην πνευμονική νόσο, οι δομικές διαταραχές και οι αλλαγές στο τοπικό περιβάλλον ευνοούν την ανάπτυξη μικροβίων, η οποία καθορίζει κατά κύριο λόγο τη μικροβιακή σύσταση στον πνεύμονα (Whiteside et al., 2021).

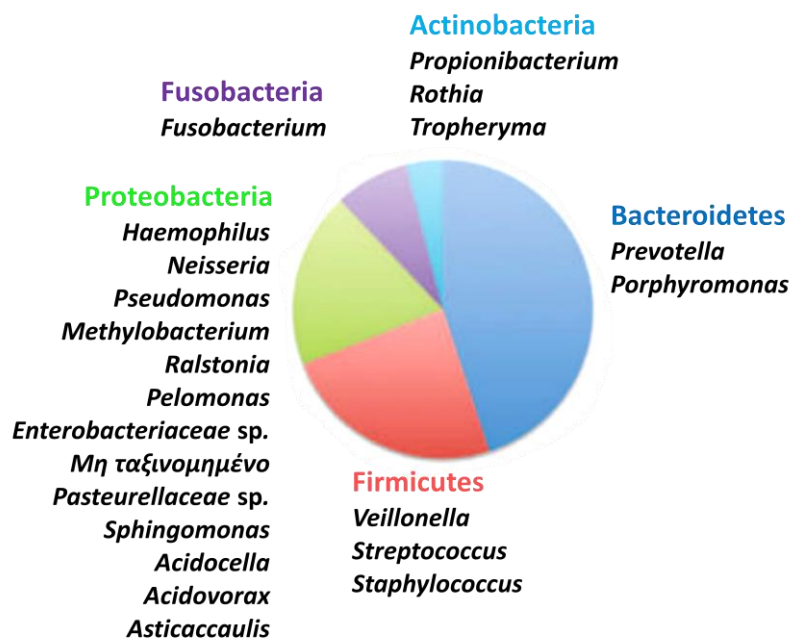
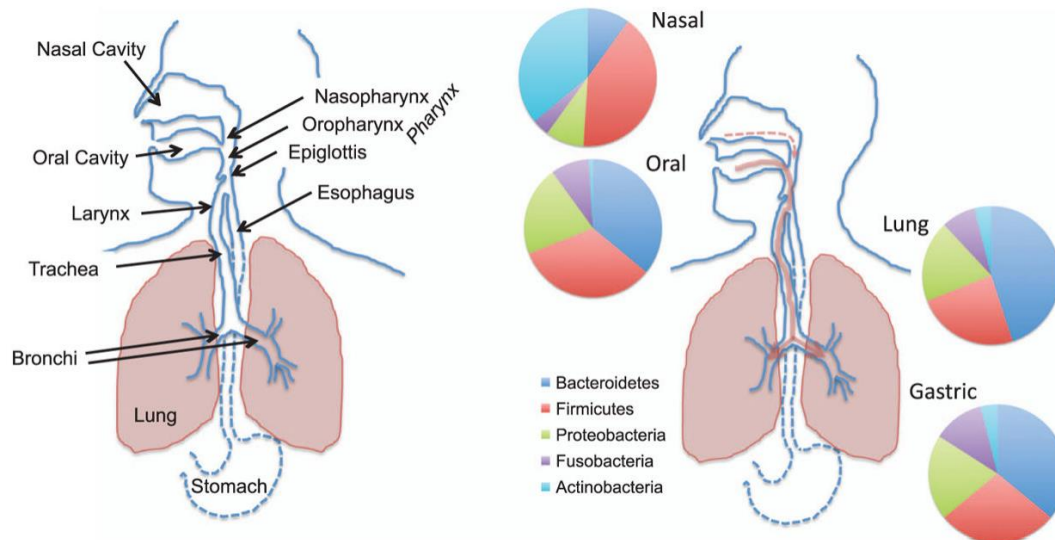
Πολλές είναι οι επιστημονικές μελέτες που αναφέρουν ότι τα κυρίαρχα φύλα στους πνεύμονες είναι τα Bacteroidetes, Firmicutes και Proteobacteria (Charlson et al., 2011; Erb-Downward et al., 2011; Segal et al., 2013; Morris et al., 2013; Bassis et al., 2015; Dickson et al., 2015). Παρόμοια σύσταση παρατηρείται τόσο στο μικροβίωμα της στοματικής κοιλότητας όσο και του στομάχου (Εικόνα 4) (Huffnagle et al., 2017). Μερικά από τα κυρίαρχα γένη βακτηρίων με βάση τα τρέχοντα δεδομένα είναι τα *Prevotella*, *Veillonella* και *Streptococcus* αλλά περιλαμβάνουν επίσης και τα *Fusobacterium* και *Haemophilus* (Hilty et al., 2010; Bassis et al., 2015; Venkataraman et al., 2015). Άλλες μελέτες επίσης, αναφέρουν την παρουσία και άλλων γενών, όπως *Staphylococcus* (Hilty et al., 2010), *Pseudomonas*, *Porphyromonas* (Erb-Downward et al., 2011), μέλη της οικογένειας *Neisseriaceae* (Charlson

et al., 2011), *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Bosea* και *Enterobacteriaceae* sp. (Morris et al., 2013), *Propionibacterium* (Segal et al., 2013), ένα μη ταξινομημένο *Pasteurellaceae* sp. και *Pelomonas* (Dickson et al., 2015). Παράλληλα, έχουν βρεθεί και μικροοργανισμοί που δεν προέρχονται από το ανώτερο αναπνευστικό, όπως το γένος *Tropheryma*, το οποίο καταλαμβάνει πολύ μικρό ποσοστό της μικροβιακής κοινότητας και πιθανότατα αντιστοιχεί στο παθογόνο στέλεχος *Tropheryma whipplei* (Morris et al., 2013; Segal et al., 2013; Dickson et al., 2015). Ο εμπλουτισμός του βακτηρίου *Tropheryma* σε υγιείς πνεύμονες, υποδηλώνει την τοπο-ειδική αναπαραγωγή του και την επιλεκτική του ανάπτυξη. Όλες οι παραπάνω διαπιστώσεις συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Συγκριτικός πίνακας με τις μελέτες που αφορούν το μικροβίωμα των πνευμόνων σε υγιείς ανθρώπους.

| Συγγραφέας, έτος | Μέγεθος δείγματος | Τύπος δείγματος | Μέθοδος | Κύρια ευρήματα στους υγιείς πνεύμονες |
|---------------------------|---|--|--|--|
| Hilty, 2010 | 8 υγιείς, 5 ΧΑΠ, 4 άσθμα | BAL, ρινοφαρυγγικό επίχρισμα | Ενίσχυση του γονιδίου 16SrRNA με PCR | <i>Prevotella</i> (Bacteroidetes) <i>Veillonella</i> , <i>Staphylococcus</i> (Firmicutes) |
| Erb- Downward, 2011 | 7 υγιείς καπνιστές, 8 καπνιστές με ΧΑΠ, 3 υγιείς μη καπνιστές | BAL, δείγματα από πνεύμονες που αφαιρέθηκαν χειρουργικά | qPCR για το γονίδιο 16S | <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> (Bacteroidetes) <i>Veillonella</i> , <i>Streptococcus</i> (Firmicutes) <i>Haemophilus</i> , <i>Pseudomonas</i> (Proteobacteria) <i>Fusobacterium</i> (Fusobacteria) |
| Morris, 2013 | 45 υγιείς μη καπνιστές, 19 υγιείς καπνιστές | BAL, στοματική πλύση | PCR για τις περιοχές V1- V3, V3-V5 του γονιδίου 16S | <i>Prevotella</i> (Bacteroidetes) <i>Veillonella</i> , <i>Streptococcus</i> (Firmicutes) <i>Haemophilus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> sp., <i>Methylobacterium</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Bosea</i> (Proteobacteria) <i>Tropheryma</i> (Actinobacteria) |
| Segal, 2013 | 9 υγιείς μη καπνιστές, 14 υγιείς πρώην καπνιστές, 6 υγιείς καπνιστές | BAL | qPCR για το γονίδιο 16S | 2 «πνευμονοτύποι» 1) <i>Prevotella</i> (Bacteroidetes) <i>Veillonella</i> (Firmicutes) 2) <i>Propionibacterium</i> , <i>Tropheryma</i> (Actinobacteria) 3) <i>Sphingomonas</i> (Proteobacteria) |
| Dickson, 2015 | 15 υγιείς | BAL, protected specimen brushings | PCR για το γονίδιο 16S | <i>Prevotella</i> (Bacteroidetes) <i>Veillonella</i> (Firmicutes) <i>Methylobacterium</i> , <i>Pasteurellaceae</i> sp., <i>Pelomonas</i> (Proteobacteria) |

| | | | | |
|---------------|----------------------------|--|--|--|
| Bassis, 2015 | 28 υγιείς | BAL, στοματική πλύση, ρινικό επίχρισμα, δείγματα γαστρικής αναρρόφησης | qPCR για το γονίδιο 16S | Prevotella (Bacteroidetes) Veillonella , <i>Streptococcus</i> (Firmicutes) |
| Dickson, 2017 | 8 υγιείς | BAL, protected specimen brushings | qPCR για το γονίδιο 16S | Prevotella (Bacteroidetes) Veillonella (Firmicutes) |
| Nielsen, 2021 | 21 υγιείς, 40 ΧΑΠ, 1 άσθμα | BAL, στοματική πλύση | PCR για την περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S | Prevotella (Bacteroidetes) <i>Streptococcus</i> , Veillonella (Firmicutes) <i>Rothia</i> , <i>Haemophilus</i> (Proteobacteria) |



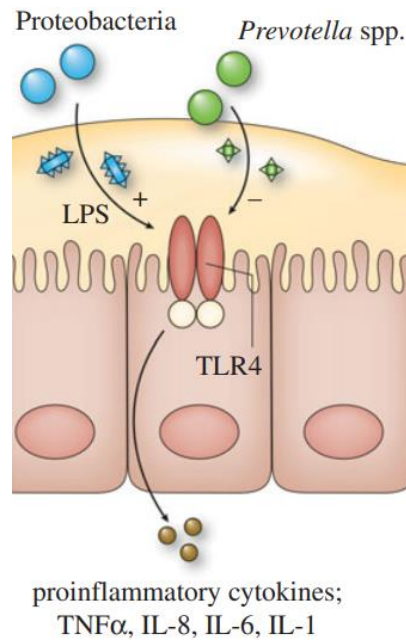
Εικόνα 4: Μικροβιακή σύσταση στους υγιείς πνεύμονες. Στο πάνω μέρος της εικόνας γίνεται σύγκριση της ανατομίας και της σύστασης του μικροβιώματος σε επίπεδο φύλου στην ανώτερη αναπνευστική και γαστρεντερική οδό. Τα βέλη απεικονίζουν τη ροή του αέρα. Παρακάτω παρουσιάζεται πιο αναλυτικά η σύσταση σε επίπεδο φύλου και γένους βακτηρίων που προκύπτει από σύγκριση δεδομένων των διαφόρων μελετών που αφορούν το πνευμονικό μικροβίωμα σε υγιείς. Τα κυρίαρχα γένη φαίνεται πως είναι τα *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* (τροποποιημένη εικόνα από Huffnagle et al., 2017).

1.3.1 Η λειτουργική επίδραση του μικροβιώματος των πνευμόνων στην υγεία του ανθρώπου

Η επίδραση του μικροβιώματος στην υγεία δεν είναι μονόπλευρη, καθώς το μικροβίωμα επηρεάζεται από τις συνθήκες που επικρατούν στον πνεύμονα, αλλά παίζει

ρόλο και στη διαμόρφωσή τους. Για να γίνει κατανοητός ο ρόλος του μικροβιώματος στην πνευμονοπάθεια είναι απαραίτητο να διερευνηθεί η επίδρασή του στην υγεία. Τα κυρίαρχα γένη στους υγιείς πνεύμονες, *Prevotella* και *Veillonella* αποτελούν κοινούς αναερόβιους μικροοργανισμούς της στοματικής χλωρίδας και ανήκουν στα πιο άφθονα φύλα, Bacteroidetes και Firmicutes, αντίστοιχα. Τα *Prevotella* θεωρούνται μερικά από τα πιο κοινά βακτήρια του ανθρώπου λόγω της εκτεταμένης παρουσίας τους στο σώμα και της σπάνιας εμπλοκής τους σε λοιμώξεις. Λίγα στελέχη έχουν αναφερθεί ως αιτία σε ευκαιριακές ενδογενείς λοιμώξεις (Larsen, 2017). Σε περιπτώσεις κάποιας αναπνευστικής νόσου, όπως στο άσθμα για παράδειγμα, παρατηρείται αύξηση της αφθονίας των γ-Πρωτεοβακτηρίων, με χαρακτηριστικό το γένος *Haemophilus* (Hilty et al., 2010).

Για να διαλευκανθεί ο ρόλος των μικροοργανισμών του γένους *Prevotella*, έγινε σύγκριση της ικανότητάς τους να προκαλέσουν φλεγμονή στους πνεύμονες με την αντίστοιχη ικανότητα γνωστών παθογόνων που ευδοκιμούν σε νόσους όπως το άσθμα και τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Μελέτες σε ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα σε *in vitro* πειράματα αλλά και σε ζωικά μοντέλα έδειξαν πως τα *Prevotella* έχουν χαμηλότερο φλεγμονώδες δυναμικό από τα Proteobacteria (Larsen et al., 2012; 2015). Εικάζεται πως αυτή η διαφορά οφείλεται στη δομή της ενδοτοξίνης ή αλλιώς, του λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος. Τα βακτήρια, μέσω του λιποπολυσακχαρίτη, συνδέονται στους υποδοχείς TLR4 (Toll-like Receptor 4) που ανήκουν στην οικογένεια υποδοχών αναγνώρισης προτύπου (PRR), και οδηγούν στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Εικόνα 5)(de Steenhuijsen Piters et al., 2015). Στα *Prevotella* ο λιποπολυσακχαρίτης είναι πεντα-ακυλιωμένος, ενώ στα Proteobacteria φέρει μια επιπλέον ακυλο-ομάδα. Πειράματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης, έδειξαν πως μόνο τα γ-Proteobacteria έχουν την ικανότητα παραγωγής εξα-ακυλιωμένου λιποπολυσακχαρίτη, ο οποίος είναι έως και εκατό φορές πιο ανοσοδιεγερτικός από τον πεντα-ακυλιωμένο όταν προσδεθεί στον TLR4 (Brix et al., 2015).



Εικόνα 5: Ενεργοποίηση του TLR4 από βακτήρια. Τα βακτήρια προσδένονται στον TLR4 μέσω του λιποπολυσακχαρίτη και προκαλούν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Η διαφορά στη δομή του λιποπολυσακχαρίτη οδηγεί σε διαφορετική ένταση της ανοσοαπόκρισης (de Steenhuijsen Piters et al., 2015).

Οι Segal και συνεργάτες του σε διαδοχικές μελέτες σε υγιή άτομα συσχέτισαν τον εμπλουτισμό του πνευμονικού μικροβιώματος με *Prevotella* και *Veillonella* με ενισχυμένη υποκλινική φλεγμονή. Υποκλινική χαρακτηρίζεται η φλεγμονή που δεν προκαλεί κάποιο σοβαρό σύμπτωμα και δεν ανιχνεύεται κατά τη διάγνωση (Segal et al., 2013; 2016). Τέλος, έχει παρατηρηθεί επιλεκτική αποβολή *Prevotella* από τους πνεύμονες (Bassis et al., 2015).

Συνολικά, με βάση αυτά τα στοιχεία προκύπτει η υπόθεση πως το περιορισμένο φλεγμονώδες δυναμικό των *Prevotella* οδηγεί σε υποκλινική φλεγμονή που έχει ως αποτέλεσμα την επιλεκτική αποβολή τους από τους πνεύμονες. Έτσι, διατηρούν το ανοσοποιητικό σύστημα σε εγρήγορση και προστατεύουν τον οργανισμό από παθογόνα του αναπνευστικού (Larsen, 2017).

1.4 Το μικροβίωμα του πνεύμονα στις πνευμονοπάθειες

Η δυσβίωση του μικροβιώματος του πνεύμονα μπορεί να προκληθεί από διαταραχή στη μετανάστευση, στην κάθαρση ή την τοπική αναπαραγωγή. Μεγαλύτερη είσοδος μικροβίων στους πνεύμονες μπορεί να προκύψει από αυξημένη αναρρόφηση, ενώ η μειωμένη αποβολή μπορεί να οφείλεται σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού ή σε παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων, όπως συμβαίνει στην ίνωση.

Μεταβολές στη δομή του επιθηλίου των αεραγωγών εξαιτίας παθολογικών ή περιβαλλοντικών αιτιών, σε συνδυασμό με την αύξηση σε βακτηριακούς πληθυσμούς που προκαλείται από μεγαλύτερη είσοδο ή ελλιπή κάθαρση, είναι πιθανό να ευνοήσουν την τοπική αναπαραγωγή, εφόσον διαταράσσεται η ομοιόσταση (Whiteside et al., 2021).

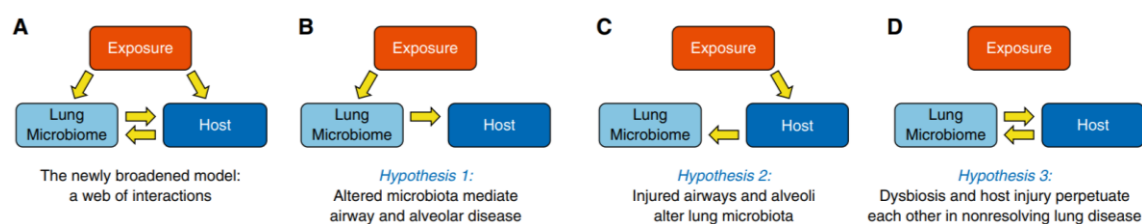
Στους υγιείς πνεύμονες η ισορροπία μεταξύ μετανάστευσης και αποβολής μικροοργανισμών αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για τη διαμόρφωση των μικροβιακών κοινοτήτων των βακτηρίων (Huffnagle et al., 2017). Επομένως, ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατέχει λιγότερο σημαντικό ρόλο. Στην περίπτωση της πνευμονοπάθειας, όμως, η δυναμική ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες αντιστρέφεται, με αποτέλεσμα το βακτηριακό μικροβίωμα να επηρεάζεται κυρίως από τις τοπικές συνθήκες ανάπτυξης (**Εικόνα 2**)(Dickson et al., 2014). Αυτή η διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην αφθονία των βακτηρίων, στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ των ατόμων (β-ποικιλότητα) ή αλλαγές στην κατανομή και τον πλούτο της κοινότητας σε κάθε άτομο (α-ποικιλότητα)(Lipinski et al., 2020).

Η φλεγμονή παίζει βασικό ρόλο στη διαμόρφωση του μικροβιώματος, επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό τις περιφερικές συνθήκες ανάπτυξης. Η φλεγμονή μπορεί να αυξήσει την αγγειακή διαρροή στους αεραγωγούς, παρέχοντας κρίσιμα θρεπτικά στοιχεία όπως αμινοξέα, βιταμίνες και σίδηρο. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να διευκολύνει τη βακτηριακή προσκόλληση και να οδηγήσει στην παραγωγή κυτοκινών, που με τη σειρά τους μπορούν να επιφέρουν πρόσθετη φλεγμονή. Τέλος, η υπερβολική παραγωγή βλέννας δυσχεραίνει την κάθαρση των αεραγωγών και δημιουργεί αναερόβια μικρο-περιβάλλοντα που ευνοούν τη μικροβιακή ανάπτυξη (Huffnagle et al., 2017).

Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι ορισμένα βακτήρια έχουν τη μεταβολική ικανότητα να χρησιμοποιούν τα παραπροϊόντα της φλεγμονής για να επιβιώσουν και να ευημερήσουν υπό αναερόβιες συνθήκες (Winter & Bäuml, 2014). Κατά τη χρόνια φλεγμονή αυτά τα βακτήρια μπορούν να αυξηθούν σημαντικά και συναγωνίζονται τα βακτήρια που δεν έχουν τη μεταβολική ικανότητα να επωφεληθούν από τη φλεγμονή (Huffnagle et al., 2017).

1.4.1 Υποθέσεις για τον ρόλο του μικροβιώματος στην παθογένεση

Η ανακάλυψη του πνευμονικού μικροβιώματος διεύρυνε το εννοιολογικό μοντέλο της παθογένεσης των αναπνευστικών νόσων, στο οποίο πλέον, εκτός από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες λαμβάνεται υπ' όψιν και η επίδραση των μικροβιακών κοινοτήτων της κατώτερης αναπνευστικής οδού. Με αυτά τα δεδομένα, προκύπτει η ερώτηση αν το μικροβίωμα παίζει αιτιακό ρόλο στην πνευμονοπάθεια ή αν είναι παθητικός δέκτης. Με βάση τα παραπάνω προκύπτουν τρεις κύριες υποθέσεις για τον ρόλο του μικροβιώματος στην παθογένεση των πνευμονοπαθειών (Εικόνα 6). Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση, η έκθεση σε παράγοντες όπως αντιβιοτικά, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση ή αναρρόφηση, μπορεί να μεταβάλει άμεσα το μικροβίωμα προκαλώντας έτσι φλεγμονή και τραυματισμό (Dickson et al., 2018). Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, η πνευμονοπάθεια διαταράσσει το αναπνευστικό οικοσύστημα, το οποίο φυσιολογικά δεν ευνοεί ιδιαίτερα τη μικροβιακή ανάπτυξη (Dickson et al., 2017). Σε αυτή την περίπτωση οι αλλαγές στη μικροβιακή κοινότητα είναι αποτέλεσμα της αναπνευστικής παθολογίας. Τέλος, εφόσον η δυσβίωση και η βλάβη στους πνεύμονες έχουν εδραιωθεί, διακινδυνεύουν σε έναν κύκλο μη επιλυόμενης πνευμονοπάθειας (Dickson et al., 2015). Η αλλοιωμένη μικροχλωρίδα προκαλεί φλεγμονή των αεραγωγών και των κυψελίδων μέσω της αλληλεπίδρασής της με τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Carney et al., 2020).



Εικόνα 6: Ο ρόλος του μικροβιώματος στην παθογένεση των πνευμονοπαθειών. (A) Σχηματική αναπαράσταση του εννοιολογικού πλαισίου για τον ρόλο του μικροβιώματος στην παθογένεση των πνευμονοπαθειών. (B) 1^η υπόθεση: Αλλοιώσεις στο μικροβίωμα που προκαλούνται από εξωτερικά αίτια επηρεάζουν τον ξενιστή. (C) 2^η υπόθεση: Βλάβη στους αεραγωγούς και τις κυψελίδες ενδέχεται να μεταβάλει το μικροβίωμα. (D) 3^η υπόθεση: Η δυσβίωση του μικροβιώματος και η βλάβη στους πνεύμονες διακινδυνεύουν σε μη επιλυόμενη πνευμονοπάθεια (Carney et al., 2020).

1.5 Χρόνιες αναπνευστικές ασθένειες

1.5.1 Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση

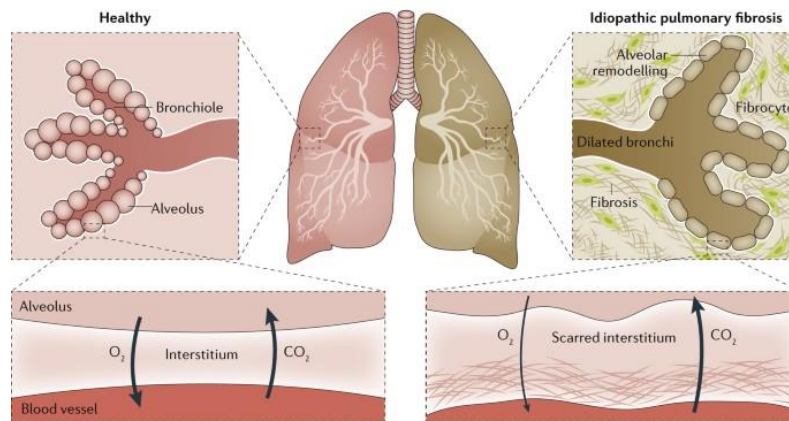
Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF) είναι μια χρόνια, προοδευτική διάμεση πνευμονοπάθεια που χαρακτηρίζεται από ίνωση, φλεγμονή και

καταστροφή της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων. Κύριος παράγοντας στην εξέλιξή της θεωρείται η βλάβη στο επιθήλιο των κυψελίδων και η ανώμαλη αποκατάστασή του (Richeldi et al., 2017).

Πρόκειται για μια ασθένεια που συνδέεται με τη γήρανση με μέση ηλικία διάγνωσης τα 65 έτη και προσβάλλει κυρίως άνδρες –περίπου το 70% των ασθενών. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση παραμένει μέχρι στιγμής ανίατη και χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση, με τον χρόνο επιβίωσης μετά τη διάγνωση να είναι περίπου τα 3-5 έτη (Glass et al., 2022).

Τα κύρια συμπτώματα περιλαμβάνουν ξηρό βήχα, κόπωση, ακροαστικά και προοδευτική δύσπνοια κατά την καταπόνηση. Η διάγνωση γίνεται διεπιστημονικά με την αξιολόγηση φυσιολογικών, κλινικών και ακτινολογικών ευρημάτων και βασίζεται κυρίως στην αναγνώριση προτύπου συνήθους διάμεσης πνευμονοπάθειας (Mori & Kondoh, 2021).

Η αιτιολογία της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης παραμένει άγνωστη, πιστεύεται όμως ότι πρόκειται για πολυπαραγοντικό νόσημα. Μια παγιωμένη υπόθεση είναι ότι επαναλαμβανόμενοι τραυματισμοί των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων από εξωγενείς παράγοντες όπως είναι ο καπνός τσιγάρου, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, ανόργανα σωματίδια και ιογενείς λοιμώξεις σε άτομα με γενετική προδιάθεση έχουν ως αποτέλεσμα μια υπερβολική απόκριση αποκατάστασης πληγών (Hewitt & Molyneaux, 2017; Phan et al., 2021). Οι συχνοί και συνεχείς τραυματισμοί του πνευμονικού επιθηλίου οδηγούν σε διαταραγμένη επικοινωνία μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών που καταλήγει σε στρατολόγηση και ενεργοποίηση μυοϊνοβλαστών και παραγωγή μιας εξωκυτταρικής ουσίας πλούσιας σε κολλαγόνο. Η συσσώρευση αυτής της ουσίας οδηγεί σε μη αναστρέψιμη κατάρρευση των κυψελίδων με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία τους, μειωμένη ανταλλαγή αερίων και δυσκολία στην αναπνοή (**Εικόνα 7**)(Glass et al., 2022).



Εικόνα 7: Υγιής πνεύμονας σε σύγκριση με πνεύμονα στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Στον πνεύμονα με IPF (δεξιά) φαίνονται οι διεσταλμένοι βρόγχοι, οι ινοβλάστες και η αναδιαμόρφωση των κυψελίδων εξαιτίας της συσσώρευσης εξωκυτταρικής ουσίας. Οι μεταβολές αυτές δυσχεραίνουν την ανταλλαγή αερίων (Martinez et al., 2017).

Έχουν εντοπιστεί αρκετά γονίδια που συσχετίζονται είτε με την οικογενή είτε με τη σποραδική ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Οι πιο σημαντικοί πολυμορφισμοί αφορούν τα γονίδια MUC5B και TOLLIP (Peljto et al., 2013; Noth et al., 2013). Το MUC5B κωδικοποιεί για μια γλυκοπρωτεΐνη της βλέννας που παίζει ρόλο στην άμυνα των αεραγωγών. Ο πολυμορφισμός MUC5B rs35705950 στον υποκινητή του γονιδίου συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στους ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (Zhang et al., 2011). Το γονίδιο TOLLIP κωδικοποιεί για μια ανασταλτική πρωτεΐνη προσαρμογής στους Toll-like υποδοχείς. Το μονοπάτι TLR είναι ένα μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που αναγνωρίζει δομικά συντηρημένα μοριακά μοτίβα μικροβιακών παθογόνων, οδηγώντας σε φλεγμονώδη ανοσοαπόκριση (Noth et al., 2013).

Τελικά, ασθενείς με IPF πεθαίνουν από αναπνευστική ανεπάρκεια, συχνά κατά τη διάρκεια ενός επεισοδίου οξείας παρόξυνσης ή από τις επιπτώσεις μιας άλλης συννοσηρότητας όπως είναι η καρδιαγγειακή νόσος, ο καρκίνος του πνεύμονα ή η θρομβοεμβολή (Glass et al., 2022). Η οξεία παρόξυνση στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ορίζεται ως οξεία, κλινικά σημαντική, αναπνευστική επιδείνωση που προκαλείται από άγνωστα αίτια. Πιθανότατα προκαλείται από ένα οξύ συμβάν όπως μόλυνση που οδηγεί σε εκτεταμένο τραυματισμό των πνευμόνων. Η οξεία παρόξυνση μπορεί επίσης να επισπεύσει την επιτάχυνση των υποκείμενων χρόνιων παραγόντων που συμβάλλουν στην ινωτική διαδικασία (Collard et al., 2016).

1.5.1.1 Το μικροβίωμα των πνευμόνων σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση

Οι αρχικές μελέτες που διερεύνησαν τον ρόλο του μικροβιώματος του πνεύμονα στην εξέλιξη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης βασίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες. Η ερευνητική ομάδα του Richter ανέφερε βακτηριακή ανάπτυξη σε βρογχοκυψελιδικό υγρό στο 36% των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Τα καλλιεργημένα βακτήρια περιελάμβαναν τα είδη *Streptococcus pneumoniae* και *Moraxella catarrhalis* μεταξύ άλλων γνωστών παθογόνων του αναπνευστικού (Richter et al., 2009). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως βακτηριακές λοιμώξεις συσχετίζονται με την ανάπτυξη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης.

Οι μελέτες του πνευμονικού μικροβιώματος στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση έχουν εξελιχθεί την τελευταία δεκαετία χάρη στην εφαρμογή μοριακών τεχνικών. Μεταβολές τόσο στην αφθονία των βακτηρίων όσο και στη σύσταση και τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων έχουν συσχετιστεί με εξέλιξη της νόσου (Lipinski et al., 2020).

Η πρώτη αναφορά για συσχέτιση μεταξύ βακτηριακής αφθονίας και θνησιμότητας έγινε από τους Molyneaux και τους συνεργάτες του, σε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 65 ασθενείς με IPF, 17 με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και 44 υγείς. Η αφθονία των βακτηρίων ποσοτικοποιήθηκε βάσει του γονιδίου 16S rRNA με qPCR και φάνηκε πως όσο υψηλότερη ήταν, τόσο μεγαλύτερος ήταν ο κίνδυνος θνησιμότητας. Στους ασθενείς με IPF βρέθηκε πως η αφθονία των βακτηρίων συσχετίζεται ανεξάρτητα με τον πολυμορφισμό rs35705950 στο γονίδιο MUC5B (Molyneaux et al., 2014). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν αργότερα σε μελέτη με 68 ασθενείς, όπου βρέθηκε, επίσης, πως η δυσβίωση του πνεύμονα προάγει την φλεγμονή στις κυψελίδες και η ανώμαλη επιδιόρθωσή του οδηγεί σε ίνωση (O'Dwyer et al., 2019).

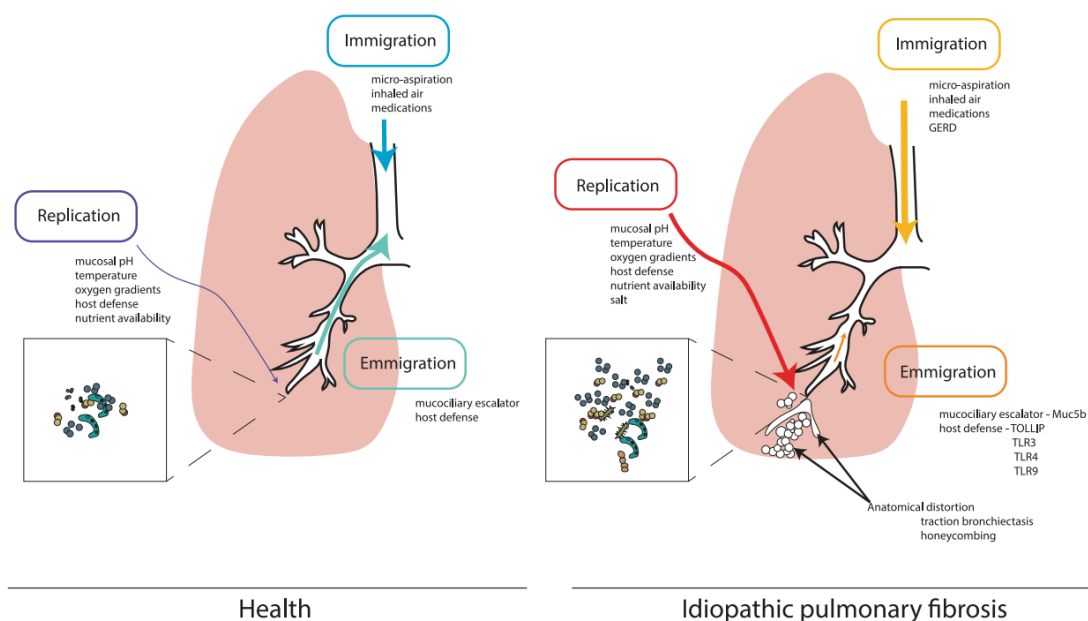
Είναι ενδιαφέρον πως στις παροξύνσεις της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης εντοπίζεται αυξημένη βακτηριακή αφθονία στους κατώτερους αεραγωγούς. Τετραπλάσια αύξηση της βακτηριακής αφθονίας παρατηρήθηκε σε ασθενείς με οξείες παροξύνσεις IPF σε σύγκριση με ασθενείς με σταθερή νόσο (Molyneaux et al., 2017). Στη μελέτη συμμετείχαν 15 ασθενείς με σταθερή νόσο και 20 με παρόξυνση. Η αυξημένη αφθονία των βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει άμεσα σε τραυματισμό του επιθηλίου και παρατεταμένη φλεγμονή (Lipinski et al., 2020).

Δεδομένης της καθολικής παρουσίας της βλάβης του κυψελιδικού επιθηλίου στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, θα πρέπει να διευκρινιστεί αν υπάρχει αιτιολογική σχέση μεταξύ της αυξημένης αφθονίας των βακτηρίων και της εξέλιξης της ίνωσης. Σύμφωνα με πιο πρόσφατα δεδομένα, η συσχέτιση μεταξύ βακτηριακής αφθονίας και εξέλιξης της ίνωσης είναι ειδική για την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και δεν παρατηρείται σε άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες με παρόμοια συμπτωματολογία, όπως στη χρόνια πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας (CHP) ($n_{IPF} = 45$, $n_{CHP} = 110$, $n_{\text{μάρτυρα}} = 28$) (Invernizzi et al., 2021). Ακόμη, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ αφθονίας των βακτηρίων και ακτινολογικών ευρημάτων στην IPF από την ίδια ερευνητική ομάδα. Στη μελέτη συμμετείχαν 137 ασθενείς με IPF και η ακτινολογική τους εικόνα συγκρίθηκε με άτομα μάρτυρα από άλλες μελέτες. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν προηγούμενα ευρήματα σχετικά με κακή πρόγνωση βάσει της αυξημένης βακτηριακής αφθονίας. Η αφθονία των βακτηρίων, ωστόσο, βρέθηκε πως είναι ανεξάρτητη από τους ακτινολογικούς δείκτες μορφολογίας και δριμύτητας της νόσου. Η έλλειψη συσχέτισης που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση υποδηλώνει ότι η αύξηση του βακτηριακής αφθονίας σχετίζεται άμεσα με τη νόσο και δεν είναι απλώς αποτέλεσμα της ίνωσης (Invernizzi et al., 2020).

Η αύξηση της αφθονίας των βακτηρίων πιθανότατα οφείλεται σε αυξημένη συχνότητα εισόδου μικροοργανισμών στους πνεύμονες αλλά και σε μειωμένη κάθαρση των αεραγωγών (Εικόνα 8) (Morris et al., 2014). Η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και οι αναρροφήσεις σχετίζονται με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, οπότε θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αυξημένη ποσότητα βακτηρίων στους ασθενείς (Savarino et al., 2013). Η ανεπαρκής κάθαρση των αεραγωγών οφείλεται σε μεταβολές στην άμυνα του ξενιστή ή και στην υπερβολική συσσώρευση βλέννας. Ειδικότερα, η υπερέκφραση (Molyneaux et al., 2014), αλλά και η έλλειψη της MUC5B συσχετίστηκαν με αυξημένη αφθονία των βακτηρίων (Roy et al., 2014) και ανεπαρκή άμυνα στους αεραγωγούς. Στην πρώτη περίπτωση η υπερβολική συσσώρευση της γλυκοπρωτεΐνης εμποδίζει την κάθαρση των κυψελίδων, ενώ όταν δεν εκφράζεται επαρκώς, τα μικρόβια βρίσκουν ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης (Morris et al., 2014).

Η αυξημένη βακτηριακή βιομάζα μπορεί να αντιπροσωπεύει την αυξημένη αφθονία όλων των ειδών που υπάρχουν στους πνεύμονες ή και αύξηση της σχετικής αφθονίας ορισμένων ειδών εις βάρος άλλων. Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν τη δομή της κοινότητας, χωρίς απαραίτητα όμως να έχουν πάντα αντίκτυπο στην ποικιλότητα (Lipinski et al., 2020). Έχει αποδειχθεί πως η αύξηση της αφθονίας των βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση

της α-ποικιλότητας (O'Dwyer et al., 2019), αλλά και μεταβολές στη β-ποικιλότητα (Molyneaux et al., 2014; Invernizzi et al., 2021). Η α-ποικιλότητα ορίζεται ως ο αριθμός και η κατανομή βακτηριακών τύπων εντός ενός δείγματος, ενώ η β-ποικιλότητα αφορά τον αριθμό και την κατανομή βακτηριακών τύπων μεταξύ των δειγμάτων (Whittaker, 1972).



Εικόνα 8: Οικολογικές πιέσεις στο μικροβίωμα του πνεύμονα στην IPF. Στην υγεία, η ισορροπημένη μετανάστευση και αποβολή μικροοργανισμών συμβάλλουν σημαντικά στη διαμόρφωση του πνευμονικού μικροβιώματος. Στην IPF, η αυξημένη μετανάστευση λόγω γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης και αναρροφήσεων, σε συνδυασμό με τη μειωμένη αποβολή λόγω αυξημένης έκφρασης MUC5B των αεραγωγών, μεταβολών στην άμυνα του ξενιστή, τροποποιημένης σηματοδότησης TLR και τον αυξημένο πολλαπλασιασμό, μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές διαταραχές της ισορροπίας μεταξύ αυτών των οικολογικών παραγόντων που θα οδηγήσουν σε αύξηση του βακτηριακού φορτίου των αεραγωγών (Lipinski et al., 2020).

Τα τρέχοντα στοιχεία υποστηρίζουν ότι η αυξημένη αφθονία βακτηρίων είναι το κύριο εύρημα στην εξέλιξη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Δεδομένου ότι το βλεννογόνο των πνευμόνων δεν αποτελεί επαρκή πηγή θρεπτικών συστατικών, η αύξηση των βακτηρίων αντιπροσωπεύει συγκεκριμένες ταξινομικές κατηγορίες με ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων (Lipinski et al., 2020). Ενώ όλα τα μικρόβια εντός του μικροπεριβάλλοντος των πνευμόνων έχουν σημασία, είναι πιθανό κάποια να είναι πιο σημαντικά από άλλα, καθώς κάποιες μελέτες έχουν συσχετίσει συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες με εξέλιξη της ασθένειας.

Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί συσχέτιση μεταξύ δύο λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (Operational Taxonomic Units, OTU) *Streptococcus* και *Staphylococcus* με την εξέλιξη της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Han et al., 2014). Στη μελέτη συμμετείχαν 55

ασθενείς, ενώ δεν συμπεριλήφθηκαν υγιείς. Στους ασθενείς ήταν κυρίαρχο ένα από τα δύο ΟΤΥ, αλλά όχι και τα δύο μαζί. Επιπλέον, δεν είχαν όλοι οι ασθενείς ενδείξεις αυξημένου *Streptococcus* ή *Staphylococcus* στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, επομένως, αυτά τα ευρήματα ενδεχομένως αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη υποομάδα ασθενών. Αυξημένη σχετική αφθονία των Firmicutes στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση έχει αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες, ωστόσο, οι ερευνητές θεωρούν πως η μείωση της α-ποικιλότητας που προκαλείται από την αύξηση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών είναι ο καθοριστικός παράγοντας στην πορεία της ασθένειας (Molyneaux et al., 2014; Takahashi et al., 2018). Χαρακτηριστική είναι η συσχέτιση μεταξύ α-ποικιλότητας και εξαναγκασμένης ζωτικής χωρητικότητας (FVC), ενός δείκτη που χρησιμοποιείται για την κλινική αξιολόγηση της νόσου (Takahashi et al., 2018).

Στην οξεία παρόξυνση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Acute Exacerbation of IPF, AE-IPF) φαίνεται πως τα δεδομένα αλλάζουν, καθώς σε μελέτη σύγκρισης του μικροβιώματος ασθενών με σταθερή νόσο και ασθενών με παρόξυνση ($n_{IPF} = 15$, $n_{AE-IPF} = 20$), δεν εντοπίστηκαν σημαντικές αλλαγές στη σχετική αφθονία των *Streptococcus* ή *Staphylococcus*. Το κυρίαρχο φύλο στους ασθενείς με παρόξυνση ήταν τα *Proteobacteria* και παρατηρήθηκε αυξημένη σχετική αφθονία στα γένη *Campylobacter* και *Stenotrophomonas* και μειωμένη σχετική αφθονία του γένους *Veillonella* (Molyneaux et al., 2017). Πιο πρόσφατα, διενεργήθηκε μια μελέτη με στόχο να διερευνηθεί ο ρόλος της μόλυνσης στην οξεία παρόξυνση της IPF (Weng et al., 2019). Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 170 ασθενείς ($n_{AE-IPF} = 48$, $n_{stableIPF} = 122$) και εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές για την αξιολόγηση καλλιεργείων πτυέλων. Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 38 διαφορετικά βακτηριακά στελέχη Gram αρνητικών βακτηρίων, με πιο άφθονα είδη τα *Klebsiella pneumoniae* (26%), *Mycobacterium tuberculosis* (21%), και *Acinetobacter baumannii* (10%). Στον **Πίνακα 2** φαίνονται συνοπτικά οι μεταβολές στη σύσταση της βακτηριακής κοινότητας στη σταθερή IPF και στην οξεία παρόξυνση IPF.

Πίνακας 2: Μεταβολές στη σύσταση της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο στη σταθερή IPF και στην οξεία παρόξυνση IPF.

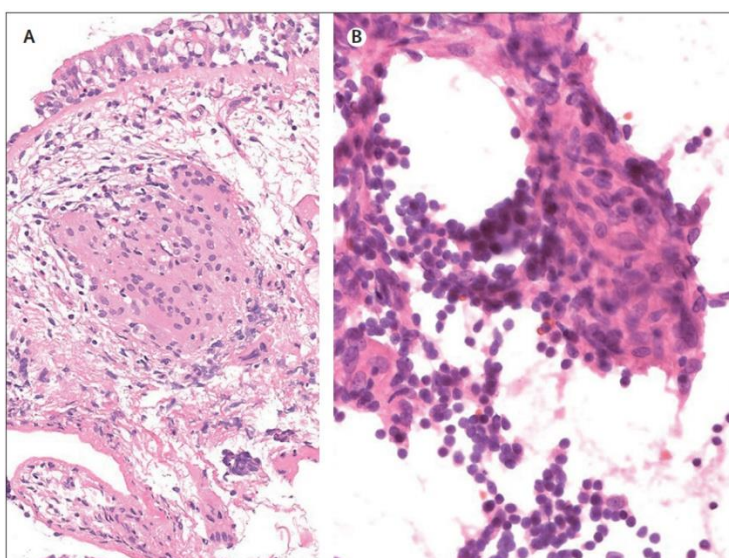
| IPF | AE-IPF |
|---------------------------------------|---|
| Βακτηριακό φορτίο ↑ | Βακτηριακό φορτίο ↑ |
| Firmicutes (<i>Streptococcus</i>) ↑ | Proteobacteria (<i>Campylobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i>) ↑ |
| Proteobacteria ↓ | Firmicutes (<i>Veillonella</i>), Bacteroidetes, Actinobacteria ↓ |

Παρόλο που ο ρόλος των βακτηρίων στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση έχει μελετηθεί, δεν έχει γίνει συστηματική εξέταση της συνεισφοράς των μυκήτων στην παθογένεση. Γενικά, δεν έχουν αναφερθεί σημαντικές διαφορές στη σύσταση της μυκηλιακής κοινότητας στους πνεύμονες ασθενών με IPF σε σχέση με υγιείς. Τα κυρίαρχα γένη που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς και υγιείς είναι τα *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Malassezia* και *Exophiala*, ενώ το *Pneumocystis jirovecii* ανιχνεύθηκε ως το πιο άφθονο είδος μόνο σε δύο ασθενείς (Molyneaux et al., 2016).

1.5.2 Σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι μια σπάνια φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό κοκκιωμάτων σε διάφορα όργανα, ιδιαίτερα στους πνεύμονες και τους λεμφαδένες. Τα κοκκιώματα είναι μη καζεϊνικά, δηλαδή, σπάνια παρατηρείται νέκρωση των κυττάρων, σε αντίθεση με κοκκιώματα που δημιουργούνται εξαιτίας φυματίωσης ή μυκητίασης (**Εικόνα 9**)(Spagnolo et al., 2018). Τα κοκκιώματα είναι αποτέλεσμα υπερβολικής αντίδρασης του ανοσοποιητικού με σκοπό τον έλεγχο ή την εξάλειψη άγνωστων αντιγόνων. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία κεντρικά οργανωμένων επιθηλιοειδών ιστοκυττάρων και μακροφάγων που περιβάλλονται από γιγαντιαία κύτταρα, λεμφοκύτταρα και ινώδη ιστό (Inaoka et al., 2019).

Η πορεία της ασθένειας μπορεί να ποικίλλει σημαντικά, από την αυθόρμητη ανάρρωση, σε χρόνια ενεργό φλεγμονή έως μια μετα-φλεγμονώδη κατάσταση, που τελικά οδηγεί σε μη αναστρέψιμη έκπτωση της λειτουργίας οργάνων όπως η πνευμονική ίνωση, ή η ανεπάρκεια ζωτικών οργάνων (Franzen et al., 2022).



Εικόνα 9: Δείγματα βιοψίας που περιέχουν μη νεκρωτικά κοκκιώματα. (A) Μη νεκρωτικά σαρκοειδικά κοκκιώματα στον υποβλεννογόνο βρογχικής βιοψίας (αιματοξυλίνη-ηωσίνη × 200). (B) Μη νεκρωτικά κοκκιώματα σε δείγμα διαβρογχικής παρακέντησης (αιματοξυλίνη-ηωσίνη× 200) (Spragnolo et al., 2018).

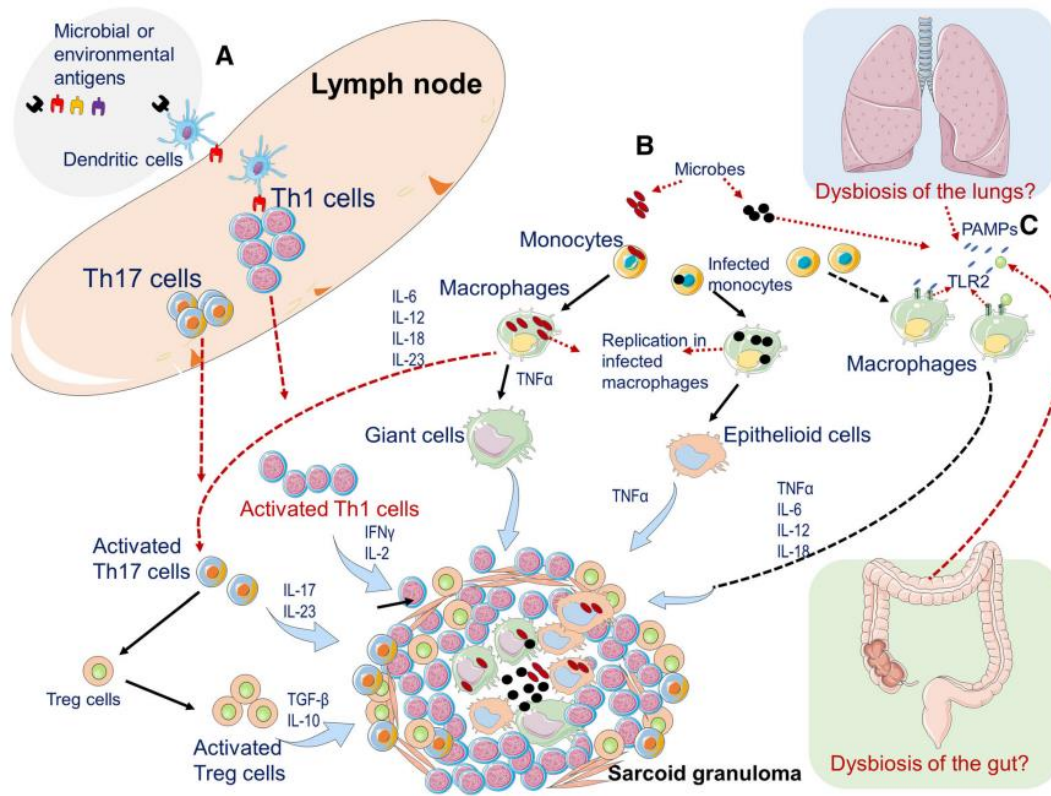
Η συχνότητα εμφάνισης και ο επιπολασμός της νόσου ποικίλλουν ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, την ηλικία, το φύλο και την καταγωγή. Η υψηλότερη συχνότητα εμφανίζεται στις Σκανδιναβικές χώρες και στους Αφροαμερικανούς, ενώ η χαμηλότερη εντοπίζεται σε Ασιατικές χώρες. Η μέση ηλικία έναρξης είναι 30-55 έτη, με κορύφωση σε διαφορετική ηλικία στα δύο φύλα (Arkema & Cozier, 2018). Η διάγνωση γίνεται διεπιστημονικά, με βάση ιστολογικά, κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα και με τον αποκλεισμό άλλων ασθενειών (Wu & Schiff, 2004).

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί πρόοδος, η ακριβής αιτιολογία της σαρκοείδωσης παραμένει άγνωστη (Franzen et al., 2022). Τα τρέχοντα στοιχεία δείχνουν ότι, σε άτομα με γενετική προδιάθεση, μια υπερβολική ανοσολογική απόκριση σε άγνωστο αντιγόνο είναι κρίσιμη για την εκδήλωση της νόσου και ότι σε ένα ποσοστό των ασθενών μικροοργανισμοί ή παράγωγά τους μπορούν να πυροδοτήσουν την ανοσοαπόκριση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κοκκιωμάτων (**Εικόνα 10**)(Esteves et al., 2016). Πιθανά αντιγόνα μπορούν, επίσης, να είναι ανόργανα σωματίδια, φάρμακα ή άγνωστοι περιβαλλοντικοί ρύποι που εισέρχονται στο σώμα κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού (Inaoka et al., 2019).

Ο πιο ισχυρά και σταθερά συνδεδεμένος παράγοντας κινδύνου για σαρκοείδωση είναι τα γονίδια HLA τάξης I και II (Rivera et al., 2016). Έχουν επίσης εντοπιστεί πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου, που συσχετίζονται με τη σαρκοείδωση, σε άλλα γονίδια του ανοσοποιητικού, όπως στο BTNL2 (Li et al., 2006).

Η «υπογραφή» της σαρκοείδωσης είναι η υπερβολική ανοσολογική απόκριση που προκαλείται από βοηθητικά κύτταρα CD4+ τύπου 1, Th1. Μελέτες που χρησιμοποίησαν βρογχοκυψελιδικό υγρό έδειξαν ότι σε ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση, το κυψελιδικό μικροπεριβάλλον χαρακτηρίζεται από ανισορροπία μεταξύ των κυττάρων Th1 και Th2, στην οποία κυτοκίνες των Th1, όπως οι ιντερλευκίνες 2 και 12, η ιντερφερόνη-γ και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α προάγουν επίμονη φλεγμονώδη απόκριση (Darlington et al., 2012). Ένας άλλος τύπος CD4T-λεμφοκυττάρων που συμμετέχει στα σαρκοειδικά κοκκιώματα είναι τα κύτταρα Th17, όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα ιντερλευκινών 17 και 22, αλλά και ιντερφερόνης-γ στο αίμα ασθενών με σαρκοείδωση και

την αυξημένη αναλογία κυττάρων Th17, που εντοπίζονται σε σαρκοειδικά κοκκιώματα και γύρω από αυτά (Ten Berge et al., 2012).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού κοκκιωμάτων. (Α) Δενδριτικά κύτταρα δεσμεύουν το αντιγόνο και μεταναστεύουν στους λεμφαδένες όπου αλληλεπιδρούν με τα T-κύτταρα, επάγοντας τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των βοηθητικών T1 και T17. Τα ενεργοποιημένα T1 και T17 απελευθερώνουν κυτοκίνες και συμμετέχουν στη δημιουργία των κοκκιωμάτων. (Β) Άμεση μόλυνση μονοκυττάρων ή μακροφάγων από μικρόβια όπως μυκοβακτήρια ή *C. acnes* οδηγεί σε διαφοροποίηση των μολυσμένων κυττάρων σε γιγαντιαία ή επιθηλιοειδή κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν TNF-α που επάγει τον σχηματισμό και τη διατήρηση των κοκκιωμάτων. Τα μακροφάγα εκκρίνουν χημειοκίνες που προσελκύουν τα T1 και T17 κύτταρα, μονοκύτταρα και ρυθμιστικά T-κύτταρα. Αυτά αδυνατούν να ελέγξουν τη φλεγμονώδη απόκριση και εκκρίνουν TGF-β που συνεισφέρει στην ίνωση και στην οργάνωση των κοκκιωμάτων. (C) Δυσβίωση στους πνεύμονες ή στο έντερο μπορεί να αποτελέσει πηγή μικροοργανισμών που ενεργοποιούν κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των TLR. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων μπορεί να επάγει τη δημιουργία γιγαντιαίων και επιθηλιοειδών κυττάρων από μακροφάγα, και να συνεισφέρει στον σχηματισμό των κοκκιωμάτων μέσω της έκκρισης κυτοκινών (Inaoka et al., 2019).

1.5.2.1 Το μικροβίωμα του πνεύμονα σε ασθενείς με Σαρκοείδωση

Η πιο ολοκληρωμένη μελέτη με σκοπό να διευκρινίσει τον ρόλο των μικροβίων στη σαρκοείδωση είναι μια μετα-ανάλυση 58 επιμέρους μελετών που χρησιμοποίησαν συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας αλλά και μοριακές τεχνικές. Συνολικά συμπεριέλαβε

πάνω από 6000 ασθενείς από διαφορετικές χώρες και έδειξε πως υπάρχει αιτιακή σχέση μεταξύ του *Cutibacterium acnes* και της σαρκοείδωσης αλλά και ισχυρή συσχέτιση της νόσου με το μυκοβακτήριο της φυματίωσης (Esteves et al., 2016).

Δεδομένου ότι η σαρκοείδωση εκδηλώνεται ως αναπνευστική νόσος στην πλειοψηφία των ασθενών, είναι πιθανή η συσχέτισή της με αλλαγές της μικροχλωρίδας του πνεύμονα (Inaoka et al., 2019). Τα δεδομένα που προκύπτουν από πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, δεν οδηγούν σε σαφή συμπεράσματα. Η ομάδα των Garzoni et al. (2013) εξέτασε το μικροβίωμα των αεραγωγών σε 18 ασθενείς με ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες ($n_{sar} = 7$, $n_{IIP} = 5$, $n_{nonIIP} = 6$), 6 ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με πνευμονοκυστική πνευμονία και 9 υγιή άτομα μάρτυρες. Οι δείκτες ποικιλότητας έδειξαν πως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη σύνθεση του μικροβιώματος μεταξύ των πέντε διαφορετικών ομάδων ασθενών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν σε μελέτη σύγκρισης του μικροβιώματος στη σαρκοείδωση με το μικροβίωμα σε άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες και του μάρτυρα από τη βιβλιογραφία ($n_{sar} = 31$, $n_{ILD} = 19$). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με σαρκοείδωση ή άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες στη σύνθεση και την ποικιλότητα του μικροβιώματος (Becker et al., 2019).

Σε μια άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 71 ασθενείς με σαρκοείδωση, 15 ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και 10 υγιείς, διαπιστώθηκε ότι *Atopobium* spp. ανιχνεύθηκαν στο 68% των δειγμάτων σαρκοείδωσης αλλά σε κανένα από τα δείγματα μάρτυρα. Ομοίως, είδη του γένους *Fusobacterium* spp. ταυτοποιήθηκαν ως βακτήρια που σχετίζονται με τη σαρκοείδωση, αφού παρατηρήθηκε αύξηση στη σχετική αφθονία τους στους ασθενείς με σαρκοείδωση σε σχέση με αυτούς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, αλλά και τους υγιείς (Zimmerman et al., 2017). Τέλος, σε μεταγονιδιωματική ανάλυση ($n_{sar} = 93$, $n_{HC} = 72$) παρατηρήθηκε εμπλουτισμός του γένους *Corynebacterium* μαζί με περιορισμένο εμπλουτισμό του μύκητα *Aspergillus* σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού (Clarke et al., 2018). Οι μεταβολές στη σύσταση του μικροβιώματος μεταξύ των δύο νόσων φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Μεταβολές στη σύσταση του μικροβιώματος σε επίπεδο γένους στην IPF, AE-IPF και σαρκοείδωση.

| IPF | AE-IPF | Sarco |
|--|---|--|
| Firmicutes (<i>Streptococcus</i>) ↑ | Proteobacteria (<i>Campylobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i>) ↑ | Actinobacteria (<i>Atopobium</i> , <i>Corynebacterium</i>) ↑ Fusobacteria (<i>Fusobacterium</i>) ↑ |
| Proteobacteria ↓ | Firmicutes (<i>Veillonella</i>), Bacteroidetes, | |

Συμπερασματικά, όλο και περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι το μικροβίωμα του πνεύμονα μπορεί να επηρεάσει την πορεία των χρόνιων πνευμονοπαθειών. Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η αλληλεπίδραση μικροβιώματος – ξενιστή συμμετέχει στην παθογένεση παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Λίγες διαχρονικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής, και τέλος, οι σχέσεις μικροβιώματος-ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης και μικροβιώματος-σαρκοείδωσης είναι σε μεγάλο βαθμό συσχετιστικές και όχι αιτιολογικές, καθιστώντας αρκετά δύσκολη την αξιοποίηση αυτών των ευρημάτων, σε κλινικές πρακτικές. Επομένως, θα πρέπει να διενεργηθούν περισσότερες διαχρονικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων, ασθενών και υγιών, για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μικροβιώματος και ξενιστή. Έτσι, θα διαλευκανθεί ο ρόλος αυτών των αλληλεπιδράσεων στην παθογένεση.

1.6 Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας βακτηρίων και μυκήτων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και σαρκοείδωση, με σκοπό τον χαρακτηρισμό του μικροβιώματος σε κάθε νόσο και τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων ασθενών. Η ανάλυση του μικροβιώματος έγινε με τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Δειγματοληψία υγρού βροχοκυψελιδικής έκπλυσης

Στην παρούσα εργασία, για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων και μυκήτων των πνευμόνων ασθενών που έπασχαν από διάμεσες πνευμονοπάθειες (π.χ. σαρκοείδωση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση), χρησιμοποιήθηκε υγρό βροχοκυψελιδικής έκπλυσης (BAL) για την εκχύλιση του DNA για την περαιτέρω μελέτη. Η λήψη του υγρού BAL πραγματοποιήθηκε στην Πνευμονολογική Κλινική του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της ιατρού Ζωής Δανιήλ. Η διάγνωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης και της σαρκοείδωσης βασίστηκε σε δημοσιευμένα τυποποιημένα κριτήρια, κλινικά και ιστολογικά ευρήματα και τομογραφία υψηλής ανάλυσης.

Συνολικά συλλέχτηκαν 35 δείγματα βροχοκυψελιδικού υγρού, που μετά την εξέταση των ασθενών, διαγνώστηκαν και κατατάχτηκαν σε 15 δείγματα ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF), 17 δείγματα σαρκοείδωσης (Sarco) και 3 δείγματα υγιών/μάρτυρα. Τα δείγματα μάρτυρες προήλθαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε βρογχοσκόπηση στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, οι οποίοι, ωστόσο, βρέθηκε πως δεν έπασχαν από ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ή σαρκοείδωση. Η έλλειψη νομικού πλαισίου στην Ελλάδα σχετικά με την υποβολή υγιών εθελοντών σε βρογχοσκόπηση καθιστά εξαιρετικά δύσκολη –έως και αδύνατη– τη συλλογή αποδεδειγμένα υγιών δειγμάτων μάρτυρα. Τέλος, ύστερα από την συλλογή των δειγμάτων, το υγρό αποθηκεύτηκε στους -20 °C έως την ανάλυσή τους.

2.1 Απομόνωση DNA από το υγρό βροχοκυψελιδικής έκπλυσης (BAL)

Για τη μελέτη μικροβιώματος ήταν απαραίτητη η εκχύλιση του DNA από τα δείγματα και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit DNeasy PowerSoil Pro Kit της εταιρείας QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden Germany).

Το συγκεκριμένο kit είναι ιδανικό για επεξεργασία ιζήματος, οπότε πραγματοποιήθηκε ένα προπαρασκευαστικό βήμα κατά το οποίο, έγινε φυγοκέντρωση του υγρού BAL (7000 rpm, 4 °C, 15 min) και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml ddH₂O. Τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν ξανά (14.888 rpm, 3 min), το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος με 800 μl διαλύματος CD1, μεταφορά σε PowerBead ProTube και vortex. Η διαδικασία της εκχύλισης συνεχίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Παρακάτω παρατίθεται το πρωτόκολλο:

1. Ανακίνηση των PowerBead ProTube στο bead beater στη μέγιστη ταχύτητα για 40 sec.
2. Φυγοκέντριση στα 15,000 x g για 1 min.
3. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό Microcentrifuge Tube των 2 ml.
4. Προσθήκη 200 μl διαλύματος CD2 και vortex για 5 sec.
5. Φυγοκέντριση στα 15,000 x g για 1 min. Μεταφορά 700 μl υπερκειμένου σε καθαρό Microcentrifuge Tube των 2 ml.
6. Προσθήκη 600 μl διαλύματος CD3 και vortex για 5 sec.
7. Μεταφορά 650 μl διαλύματος σε MB Spin Column. Φυγοκέντριση στα 15,000 x g για 1 min.
8. Απόρριψη του διηθήματος και επανάληψη του βήματος 7 για να εξασφαλιστεί η διήθηση της ποσότητας διαλύματος μέσω του MB Spin Column.
9. Μεταφορά του MB Spin Column σε καθαρό Collection Tube των 2 ml.
10. Προσθήκη 500 μl του διαλύματος EA στο MB Spin Column. Φυγοκέντριση στα 15,000 x g για 1 min.
11. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση του MB Spin Column στο ίδιο Collection Tube.
12. Προσθήκη 500 μl του διαλύματος C5 στο MB Spin Column. Φυγοκέντριση στα 15,000 x g για 1 min.
13. Απόρριψη του διηθήματος και μεταφορά του MB Spin Column σε νέο Collection Tube.
14. Φυγοκέντριση στα 16,000 x g για 2 min. Μεταφορά του MB Spin Column σε Elution Tube του 1.5 ml.
15. Προσθήκη 50-100 μl του διαλύματος C6 στο κέντρο της μεμβράνης του φίλτρου.
16. Φυγοκέντριση στα 15,000 x g για 1 min. Απόρριψη του MB Spin Column. Το DNA είναι έτοιμο για μεταγενέστερες εφαρμογές.



Εικόνα 11: Τα περιεχόμενα του DNEASY PowerSoil Pro Kit της Qiagen (<https://www.qiagen.com/ja-us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit/?catno=47014>).

2.2 Προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση

2.2.1 Ποσοτικοποίηση του DNA με Qubit

Αρχικά, μετά την εκχύλιση του DNA έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του σε κάθε δείγμα με τη χρήση του κιτ Qubit dsDNA BR Assay της εταιρείας Invitrogen (ThermoFisher Scientific Inc.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Υλικά:

- Qubit™ dsDNA BR Reagent (Component A)
- Qubit™ dsDNA BR Buffer (Component B)
- Qubit™ dsDNA BR Standard #1 (Component C)
- Qubit™ dsDNA BR Standard #2 (Component D)

Παρακάτω παρατίθεται το πρωτόκολλο:

1. Καθορισμός του αριθμού των Qubit™ tubes που θα χρησιμοποιηθούν για τα standards και τα δείγματα. Το Qubit dsDNA BR Assay απαιτεί τη χρήση 2 standards.
2. Αρίθμηση των Qubit™ tubes στο καπάκι και όχι στα τοιχώματα, καθώς αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει τη διαδικασία της φωτομέτρησης.
3. Προετοιμασία του Qubit™ working solution με τη διάλυση Qubit™ dsDNA BR Reagent σε Qubit™ dsDNA BR Buffer με αναλογία 1:200.

4. Προσθήκη ανάλογου όγκου του working solution σε κάθε tube για τελικό όγκο 200 μl. Ο προτεινόμενος όγκος των αντιδραστηρίων φαίνεται στον **Πίνακα 4**.
5. Προσθήκη 10 μl από κάθε Qubit™ standard στο κατάλληλο tube.
6. Προσθήκη 1-20 μl από κάθε δείγμα στο κατάλληλο tube.
7. Ανακίνηση στο vortex για 3-5 sec. Να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων.
8. Επώαση των tubes σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min και στη συνέχεια ανάγνωση στο Fluorometer.
9. Επιλογή του dsDNA Broad Range στην οθόνη αφετηρίας.
10. Ανάγνωση των standards για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.
11. Επιλογή του Run Samples.
12. Επιλογή του Sample Volume για την εισαγωγή του όγκου του δείγματος που προστέθηκε στο working solution (1-20 μl).
13. Επιλογή των επιθυμητών μονάδων συγκέντρωσης.
14. Ανάγνωση των δειγμάτων.

Πίνακας 4: Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για το Qubit dsDNA BR Assay

| | Standard assay tubes | User sample assay tubes |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Όγκος working solution | 190 μl | (180-199 μl) |
| Όγκος standard | 10 μl | - |
| Όγκος δείγματος | - | (1-20 μl) |
| Συνολικός όγκος σε κάθε tube | 200 μl | 200 μl |

2.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων και της περιοχής ITS των μυκήτων με PCR (1^η αντίδραση)

Μετά την εκχύλιση του DNA και την ποσοτικοποίηση του, για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων και των μυκήτων, έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA και τμήματος της αλληλουχίας ITS, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, έγινε ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA και της περιοχής ITS2, των βακτηρίων και μυκήτων αντίστοιχα.

Οι αντιδράσεις PCR με τα αντιδραστήρια και τις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των βακτηρίων και των μυκήτων, φαίνονται στους **Πίνακες 5** και **6** αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR (βακτηρίων και μυκήτων) παρατίθενται στους παρακάτω **Πίνακες 7** και **8**, αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,0% (0.6g αγαρόζη σε 60 mL TAE 1x) και 2 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μ L DNA αναμεμειγμένα με 1 μ L loading buffer 6x. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

Πίνακας 5: Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων.

| Αντιδραστήριο | Όγκος αντιδραστηρίου (μ l) για τελικό όγκο αντίδρασης 10 μ l | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------------|---|--------------------|
| Q5 High-Fidelity 2X Master Mix | 5 | x1 |
| BSA(20 mg/ml) | 0,2 | 0.4 μ g/ml |
| 515F(10 μ M) | 0,5 | 0.5 μ M |
| 806R(10 μ M) | 0,5 | 0.5 μ M |
| ddH ₂ O | 2,8 | 0.5 μ M |
| DNA (0,5 ng/ml) | 1 | 0.5 ng |

Πίνακας 6: Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος της περιοχής ITS των μυκήτων.

| Αντιδραστήριο | Όγκος αντιδραστηρίου (μ l) για τελικό όγκο αντίδρασης 10 μ l | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------------|---|--------------------|
| Q5 High-Fidelity 2X Master Mix | 5 | x1 |
| BSA(20 mg/ml) | 0,2 | 0.4 μ g/ml |
| ITS7F(10 μ M) | 0,5 | 0.5 μ M |
| ITS4R(10 μ M) | 0,5 | 0.5 μ M |
| ddH ₂ O | 1,8 | 0.5 μ M |
| DNA (0,5 ng/ml) | 2 | 1 ng |

Πίνακας 7: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων 16S rRNA και ITS, των βακτηρίων και μυκήτων, αντίστοιχα.

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| Forward primer (515F) | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| Reverse primer (806R) | GGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| Forward primer (ITS7F) | GTGARTCATCGAATCTTTG |
| Reverse primer (ITS4R) | TCCTCCGCTTATTGATATGC |

Πίνακας 8: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων 16S rRNA και ITS, των βακτηρίων και μυκήτων, αντίστοιχα.

| | Θερμοκρασία (16S rRNA – ITS) | Χρόνος (sec) (16S rRNA – ITS) | (16S rRNA – ITS) |
|----------------------|--|---|------------------|
| Ενεργοποίηση ενζύμου | 98 °C | 30 | 1 κύκλος |
| Αποδιάταξη | 98 °C | 10 | 28 - 32 κύκλοι |
| Υβριδοποίηση | 50°C - 55°C | 30 | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 15 | |
| Τελική επιμήκυνση | 72 °C | 60 | 1 κύκλος |

2.2.3 PCR εσωτερικής ένθεσης για την προσθήκη της ειδικής για κάθε δείγμα αλληλουχίας δείκτη (2^η αντίδραση)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η δεύτερη αντίδραση PCR, κατά την οποία έγινε προσθήκη της αλληλουχίας δείκτη στα προϊόντα της αρχικής αντίδρασης PCR. Αναλυτικότερα, στα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη αντίδραση PCR, ο ένας εκκινητής παρέμεινε ίδιος, ενώ ο δεύτερος έφερε μία επιπλέον αλληλουχία 9 βάσεων, ξεχωριστή για κάθε δείγμα, με σκοπό να επιτευχθεί η πολυπλεξία των δειγμάτων και η τελική τους ισόποση συνένωση στο τέλος (**Πίνακας 9**).

Οι δεύτερες αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τις αρχικές για τα βακτήρια και τους μύκητες αντίστοιχα, ενώ χρησιμοποιήθηκε ως DNA εκμαγείο ποσότητα (2 μl) από την πρώτη αντίδραση PCR και σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Η μόνη διαφορά στις θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες ήταν ότι πραγματοποιήθηκαν 7 κύκλοι για τα βακτήρια και 8 για τους μύκητες, έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός κύκλων να φτάσει τους 35

και 40 αντίστοιχα. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,0% (0.6g αгарόζη σε 60 mL TAE 1x) και 2 μL βρωμιούχου αιθιδίου (1%). Σε κάθε πηκτή φορτώθηκαν 5 μl DNA αναμεμειγμένα με 1 μL loading buffer 6x. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης κατέστη δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στις πηκτές σε τράπεζα οπτικοποίησης UV.

Στους **Πίνακες 10** και **11** παρατίθενται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις δεύτερες αντιδράσεις αντιδράσεις PCR.

Πίνακας 9: Ενδεικτικές αλληλουχίες 10 ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη αντίδραση PCR εσωτερικής ένθεσης των βακτηρίων και των μυκήτων.

| | Αλληλουχία Δείκτης | linker | Εκκινητής (5'-3') | Συνδυαστικός εκκινητής (5'- 3') (Index primer) |
|------------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------------|---|
| Βακτήρια 16S rRNA | TTCTTCTTC | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTTCTTCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTTCAAG | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTTCAAGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTTGTCA | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTTGTCAAGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTTGAGT | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTTGAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTTGGAC | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTTGGACGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTATAGG | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTATAGGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTATCTC | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTATCTCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTATGCA | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTATGCAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTAACAG | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTAACAGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| | TTCTAGTTG | GT | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA | TTCTAGTTGGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| Μύκητες ITS | TTATTACCG | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATTACCGGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATTAGGC | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATTAGGCGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATTCTCC | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATTCTCCGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATTCGTG | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATTCGTGGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATTGCGA | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATTGCGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC |

| | | | | |
|--|-------------------|----|----------------------|----------------------------------|
| | TTATACTGG | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATACTGGGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATACCTC | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATACCTCGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATACGCA | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATACGCAGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATAGACC | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATAGACCGATCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | TTATGTTCCG | GA | TCCTCCGCTTATTGATATGC | TTATGTTCCGGATCCTCCGCTTATTGATATGC |

Πίνακας 10: Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR εσωτερικής ένθεσης (Βακτήρια).

| Αντιδραστήριο | Όγκος αντιδραστηρίου (μl) για τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------------|---|---------------------------|
| Q5 High-Fidelity 2X Master Mix | 10 | x1 |
| Index primer (10μM) | 1 | 0.5 μM |
| 806R (10μM) | 1 | 0.5 μM |
| ddH ₂ O | 6 | |
| DNA | 2 | |

Πίνακας 11: Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR εσωτερικής ένθεσης (Μύκητες).

| Αντιδραστήριο | Όγκος αντιδραστηρίου (μl) για τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl | Τελική Συγκέντρωση |
|--------------------------------|---|---------------------------|
| Q5 High-Fidelity 2X Master Mix | 10 | x1 |
| ITS7F (10μM) | 1 | 0.5 μM |
| Index primer (10μM) | 1 | 0.5 μM |
| ddH ₂ O | 6 | |
| DNA | 2 | |

Αφού ολοκληρώθηκε η δεύτερη PCR, εσωτερικής ένθεσης, και αξιολογήθηκε η ενίσχυση των επιθυμητών προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση DNA με Qubit. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των

δειγμάτων και ανάμιξή τους σε ισομοριακά τμήματα των 100ng DNA, τα οποία στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Admera Health (Admera Health, New Jersey, USA) σε πλατφόρμα Illumina HiSeq Rapid Mode 2x250 bp paired-end.

2.3. Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση

2.3.1. Πρωτόκολλο βιοπληροφορικών και στατιστικών αναλύσεων

Με το πέρας της αλληλούχισης, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων αλληλούχισης, με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων αλληλουχιών, την ταξινόμηση και τη στατιστική ανάλυση.

Συγκεκριμένα, η προ-ανάλυση των αλληλουχιών αποτελούνταν από την από-πολυπλεξία με την έκδοση 3.0.3 του Flexbar (Dodt et al., 2012). Ο ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών, η αφαίρεση των χιμαιρικών αλληλουχιών, η στοίχιση σε βάσεις δεδομένων αναφοράς και η δημιουργία πινάκων παραλλαγών αλληλουχιών των ενισχυμάτων (Amplicon Sequence Variants, ASV) πραγματοποιήθηκαν με το πακέτο dada2 (Callahan et al., 2016a) της έκδοσης R 4.0.5 (R Core Team, 2020), όπως προτάθηκε σε προηγούμενη δημοσίευση (Callahan et al., 2016b). Η έκδοση 138 του ταξινομικού dataset της SILVA SSU (McLaren, 2020) διαμορφωμένη για το dada2 και η έκδοση 8.2 του UNITE general fasta (Abarenkov et al., 2020) χρησιμοποιήθηκαν για την ταξινόμηση των ενισχυμάτων V4 16S rRNA και ITS2, αντίστοιχα. Η κάλυψη της μικροβιακής ποικιλομορφίας αξιολογήθηκε μέσω rarefaction curves που προετοιμάστηκαν με το πακέτο vegan (Oksanen et al., 2019). Το πακέτο microbiome (Lahti & Shetty, 2012) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό δεικτών αποικιότητας όπως Shannon (Spellerberg & Fedor, 2003) και inverse Simpson (Hill, 1973), την παρατηρούμενη αφθονία (S) και τον δείκτη Pielou's evenness (Pielou, 1966). Η παραμετρική ανάλυση διακύμανσης ANOVA ή η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis ακολουθούμενες από τα Turkey's ή Fischer's post hoc τεστ ελάχιστης σημαντικής διαφοράς, αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογήσουν τις διαφορές μεταξύ δεικτών αποικιότητας και σχετικής αφθονίας των ASVs μεταξύ των δειγμάτων της παρούσας μελέτης. Η ανάλυση της διακύμανσης πραγματοποιήθηκε με την έκδοση 1.3.3 του πακέτου agricolae (de Mendiburu, 2020). Η β-ποικιλότητα αξιολογήθηκε μέσω των μεθόδων πολυπαραγοντικής ανάλυσης Canonical Correspondence Analysis (CCA, ter Braak & Verdonschot, 1995) και Redundancy Analysis (RDA, Israels, 1984), ανάλογα με τον πρώτο αποκλειόμενο άξονα της ανάλυσης αντιστοιχίας (Lepš & Šmilauer, 2003). Η πολυμεταβλητή

ανάλυση διακύμανσης (Anderson, 2017) που συνόδευσε τις προαναφερθείσες αναλύσεις β-ποικιλότητας πραγματοποιήθηκε κατά ζεύγη με την έκδοση 0.0.1 του πακέτου Adonis (Martinez Arbizu, 2020).

2.3.2. Ορισμοί – επεξηγήσεις

Οι παραλλαγές των αλληλουχιών των ενισχυμάτων (Amplicon Sequence Variants, ASV) αποτελούν τις μοναδικές αλληλουχίες DNA που προκύπτουν κατά την αλληλούχιση, προσφέρουν διακριτική ικανότητα μεταξύ των αλληλουχιών σε επίπεδο ενός νουκλεοτιδίου και χρησιμοποιούνται στην ταξινομική ανάλυση.

Ως α-ποικιλότητα ορίζεται ο αριθμός και η κατανομή των ASV εντός ενός δείγματος και μετράται μέσω διαφόρων δεικτών που αφορούν την αφθονία, την ποικιλομορφία και την ομοιότητα των ASVs στο δείγμα. Οι δείκτες που εξετάστηκαν παρατίθενται στη συνέχεια:

- **Shannon Index:** χαρακτηρισμός των λιγότερο κυρίαρχων ASV, ανίχνευση της σπανιότητας ειδών
- **Inverse Simpson Index:** χαρακτηρισμός των πιο κυρίαρχων ASV
- **Pielou's Evenness Index:** ποσοτικός προσδιορισμός της βιοποικιλότητας
- **Rarity low abundance:** χαρακτηρισμός της συγκέντρωσης των λιγότερο άφθονων ειδών

Η β-ποικιλότητα αφορά τον αριθμό και την κατανομή των ASVs μεταξύ των δειγμάτων και υπολογίζεται με στατιστικές μεθόδους πολυπαραγοντικής ανάλυσης όπως Non-metric Multidimensional Scaling (nMDS) ή Canonical Correspondence Analysis (CCA).

ΤΡΙΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

3.1 Ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων αλληλούχισης

Οι αναγνώσεις των ακατέργαστων αλληλουχιών υποβλήθηκαν σε μια σειρά βημάτων ποιοτικού ελέγχου για την αφαίρεση των λαθών της PCR και της διαδικασίας της αλληλούχισης ως εξής: α) οι αλληλουχίες κόπηκαν ποιοτικά από τα άκρα 3', β) τα ζεύγη ανάγνωσης συναρμολογήθηκαν για να ανακατασκευάσουν τα μητρικά τους ενισχύματα (amplicons) γ) τα χιμαιρικά και τα μη ειδικά ενισχύματα αφαιρέθηκαν και τα προκύπτοντα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για τη δημιουργία των πινάκων με τα ASVs. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνόλου δεδομένων αλληλουχιών των βακτηρίων κατά ~31,83% (από 936.696 σε 638.499 αλληλουχίες) και των μυκήτων κατά 26,93% (από 331.771 σε 242.407) όπως φαίνεται στον **Πίνακα 12**. Οι εναπομείνουσες αλληλουχίες έδειξαν μια κάλυψη μεγαλύτερη από 99,99 % τόσο της υπάρχουσας βακτηριακής αλλά και μυκηλιακής ποικιλότητας μεταξύ των ASVs σε σχετική αφθονία σύμφωνα με την εκτίμηση κάλυψης του δείκτη Good's Coverage.

Τα δείγματα Sarco_12, Sarco_13 και Sarco_16 δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση επειδή εντοπίστηκε ένα μόνο ASV στο καθένα.

Πίνακας 12: Οι αριθμοί αλληλουχιών ανά δείγμα που ελήφθησαν και επιβίωσαν από τα διάφορα στάδια ποιοτικού ελέγχου, και η επιτυχής κάλυψη του δείγματος από τις προκύπτουσες αλληλουχίες υψηλής ποιότητας (δείκτης Good's coverage).

| Δείγματα | Βακτήρια | | | Μύκητες | | |
|------------|----------|------------------------------------|------------|---------|------------------------------------|------------|
| | Αρχικές | Τελικές (Στατιστική ανάλυση) | Good's_con | Αρχικές | Τελικές (Στατιστική ανάλυση) | Good's_con |
| Μάρτυρας_1 | 9607 | 6832 | 1,00000 | 13307 | 8538 | 1,00000 |
| Μάρτυρας_2 | 20110 | 12177 | 1,00000 | 13952 | 10938 | 1,00000 |
| Μάρτυρας_3 | 41137 | 30658 | 0,99997 | 4599 | 3673 | 1,00000 |
| IPF_1 | 6477 | 2758 | 1,00000 | 13162 | 8907 | 1,00000 |
| IPF_10 | 31809 | 22384 | 1,00000 | 21140 | 17746 | 1,00000 |
| IPF_11 | 30142 | 21580 | 1,00000 | 11599 | 9930 | 1,00000 |
| IPF_12 | 16261 | 11123 | 0,99990 | 12320 | 7594 | 1,00000 |
| IPF_13 | 8564 | 5911 | 1,00000 | 8706 | 7484 | 1,00000 |

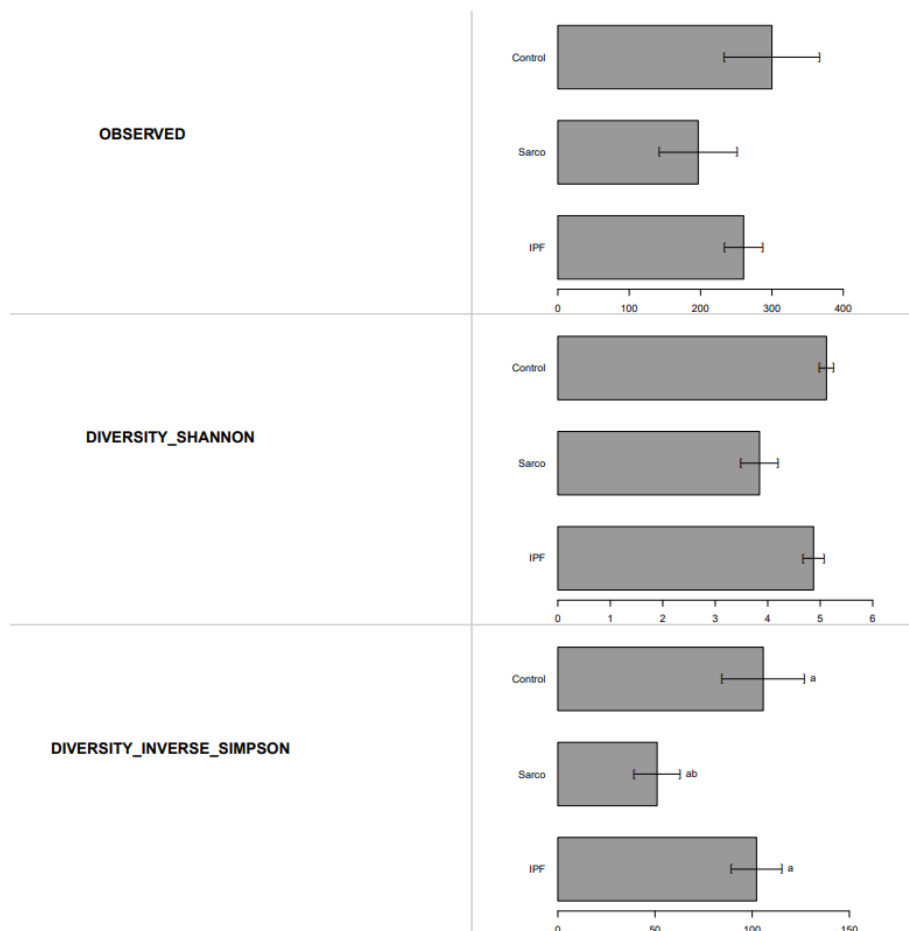
| | | | | | | |
|----------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|
| IPF_14 | 28791 | 18337 | 1,00000 | 5731 | 4850 | 1,00000 |
| IPF_15 | 55066 | 41779 | 1,00000 | 16919 | 10920 | 1,00000 |
| IPF_2 | 25043 | 15292 | 1,00000 | 13611 | 8969 | 1,00000 |
| IPF_3 | 26124 | 18491 | 1,00000 | 8791 | 5755 | 1,00000 |
| IPF_4 | 17972 | 11231 | 1,00000 | 11615 | 8106 | 1,00000 |
| IPF_5 | 35744 | 24066 | 1,00000 | 2784 | 2083 | 1,00000 |
| IPF_6 | 10789 | 6144 | 1,00000 | 8331 | 6318 | 1,00000 |
| IPF_7 | 8527 | 6475 | 1,00000 | 10536 | 7505 | 1,00000 |
| IPF_8 | 5177 | 3343 | 1,00000 | 14751 | 12761 | 1,00000 |
| IPF_9 | 49464 | 36311 | 1,00000 | 7188 | 4965 | 1,00000 |
| Sarco_1 | 61805 | 41225 | 1,00000 | 15481 | 10692 | 1,00000 |
| Sarco_10 | 66144 | 46389 | 1,00000 | 8763 | 7713 | 1,00000 |
| Sarco_11 | 52042 | 34917 | 0,99997 | 6575 | 4044 | 1,00000 |
| Sarco_14 | 84260 | 64265 | 1,00000 | 8379 | 7445 | 1,00000 |
| Sarco_15 | 4128 | 404 | 1,00000 | 8474 | 4485 | 1,00000 |
| Sarco_17 | 761 | 458 | 1,00000 | 9875 | 7365 | 1,00000 |
| Sarco_2 | 3457 | 803 | 1,00000 | 9926 | 6278 | 1,00000 |
| Sarco_3 | 18092 | 8462 | 1,00000 | 10417 | 8192 | 1,00000 |
| Sarco_4 | 30077 | 14119 | 1,00000 | 6947 | 4006 | 1,00000 |
| Sarco_5 | 15013 | 7409 | 1,00000 | 12080 | 8644 | 1,00000 |
| Sarco_6 | 18422 | 10320 | 1,00000 | 12931 | 9195 | 1,00000 |
| Sarco_7 | 13171 | 7250 | 1,00000 | 7316 | 4657 | 1,00000 |
| Sarco_8 | 74026 | 52030 | 1,00000 | 7257 | 5396 | 1,00000 |
| Sarco_9 | 68494 | 55556 | 1,00000 | 8308 | 7253 | 1,00000 |

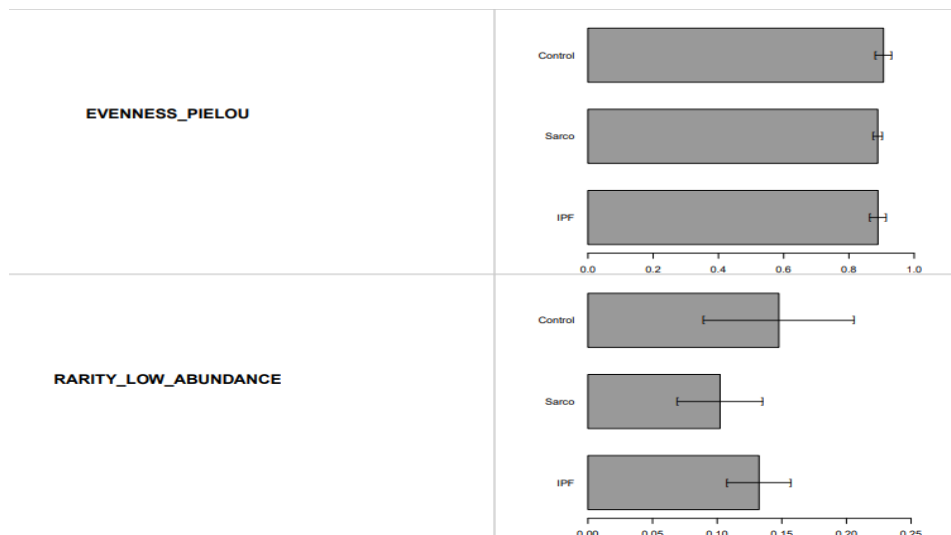
3.2 Ανάλυση της α-ποικιλότητας βακτηρίων και μυκήτων

Η ποικιλότητα του κάθε δείγματος εσωτερικά (δηλαδή η α-ποικιλότητα) προσδιορίστηκε μέσω του υπολογισμού τεσσάρων δεικτών όπως αναφέρθηκε παραπάνω στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων. Για την μετέπειτα στατιστική ανάλυση μεταξύ των μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκε πρώτα ένα Shapiro Wilk τεστ για την εύρεση ακολουθίας κανονικής κατανομής ή μη των δειγμάτων, για την επιλογή στη συνέχεια παραμετρικής ή μη στατιστικής μεθόδου. Η παραμετρική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ανάλυση

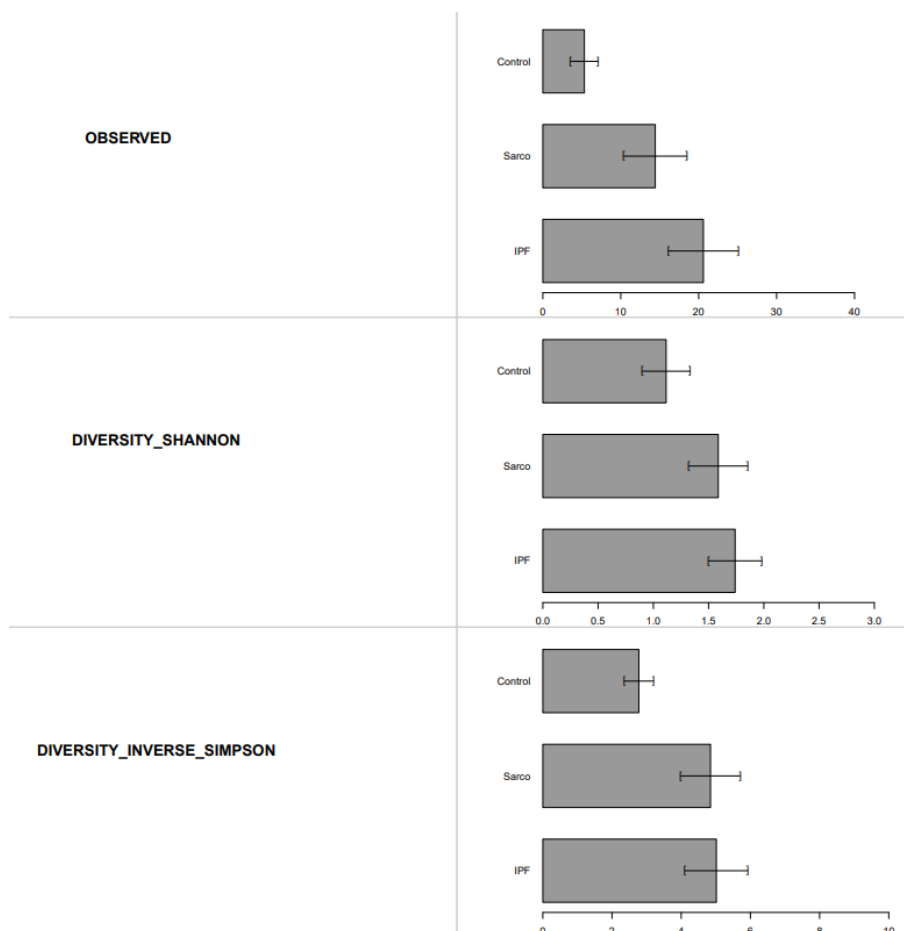
διακύμανσης ANOVA ακολουθούμενη από το Turkey test, ενώ σε περιπτώσεις που δεν πληρούνταν οι απαραίτητες συνθήκες επιλέχθηκε η μη παραμετρική μέθοδος Kruskal Wallis.

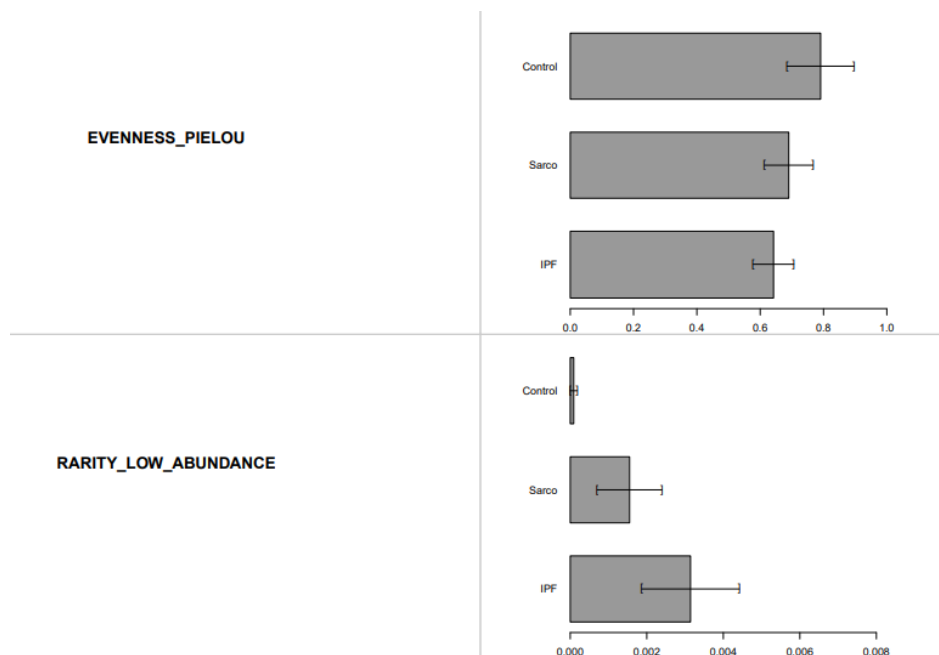
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, αυτό που παρατηρήθηκε για τους περισσότερους προς ανάλυση δείκτες ήταν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών με σαρκοείδωση και με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και των υγιών ανθρώπων/δειγμάτων μάρτυρα, όσον αφορά τη βακτηριακή κοινότητα. Η μόνη αρνητική στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε μόνο στον δείκτη Inverse Simpson, που αφορά την ποικιλότητα των κυρίαρχων ASVs της κοινότητας, μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με σαρκοείδωση και των ασθενών με IPF και υγιών (Διάγραμμα 1). Στην ίδια ανάλυση για την περίπτωση των μυκήτων δεν φαίνεται να προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, γεγονός που υποδεικνύει πως οι κοινότητες των μυκήτων είναι παρόμοια ποικίλες μεταξύ των δειγμάτων ασθενών και των υγιών ανθρώπων της παρούσας μελέτης (Διάγραμμα 2).





Διάγραμμα 1: Δείκτες για την ανάλυση α-ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων μεταξύ των δειγμάτων με σαρκοειδωση, ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και αυτών του μάρτυρα.





Διάγραμμα 2: Δείκτες για την ανάλυση α-ποικιλότητας της μικροβιακής κοινότητας των μυκήτων μεταξύ των δειγμάτων με σαρκοείδωση, ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και αυτών του μάρτυρα.

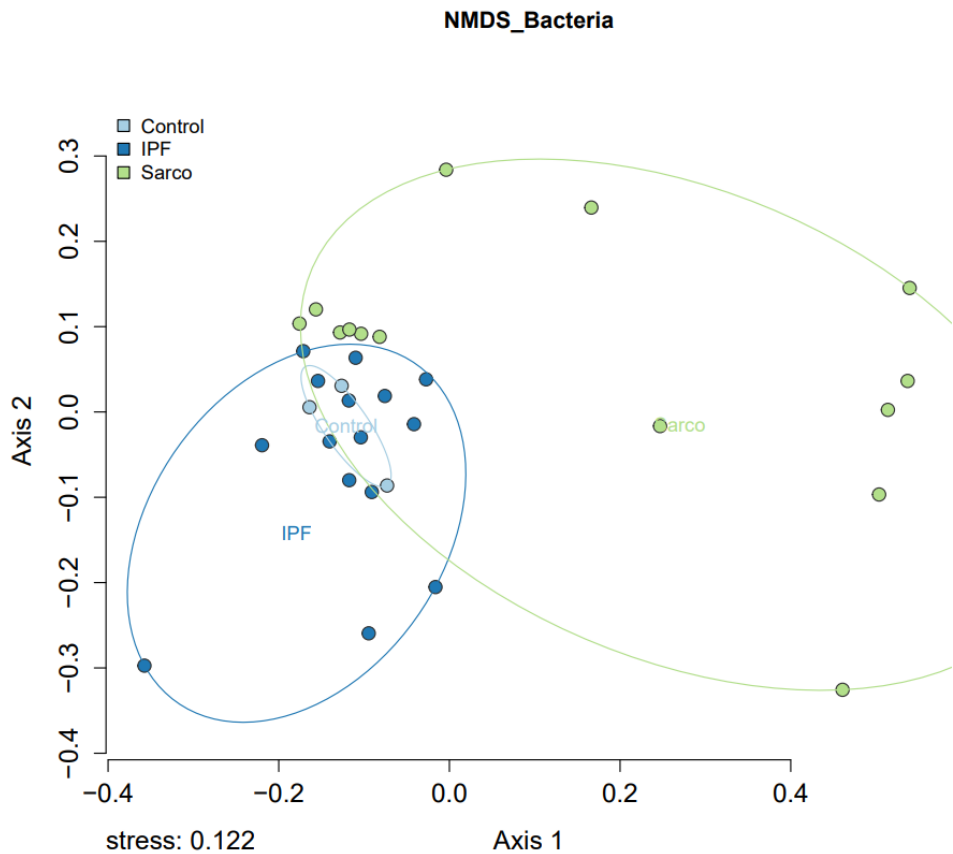
3.3 Ανάλυση της β-ποικιλότητας βακτηρίων και μυκήτων

3.3.1 Non-metric Multidimensional Scaling ανάλυση

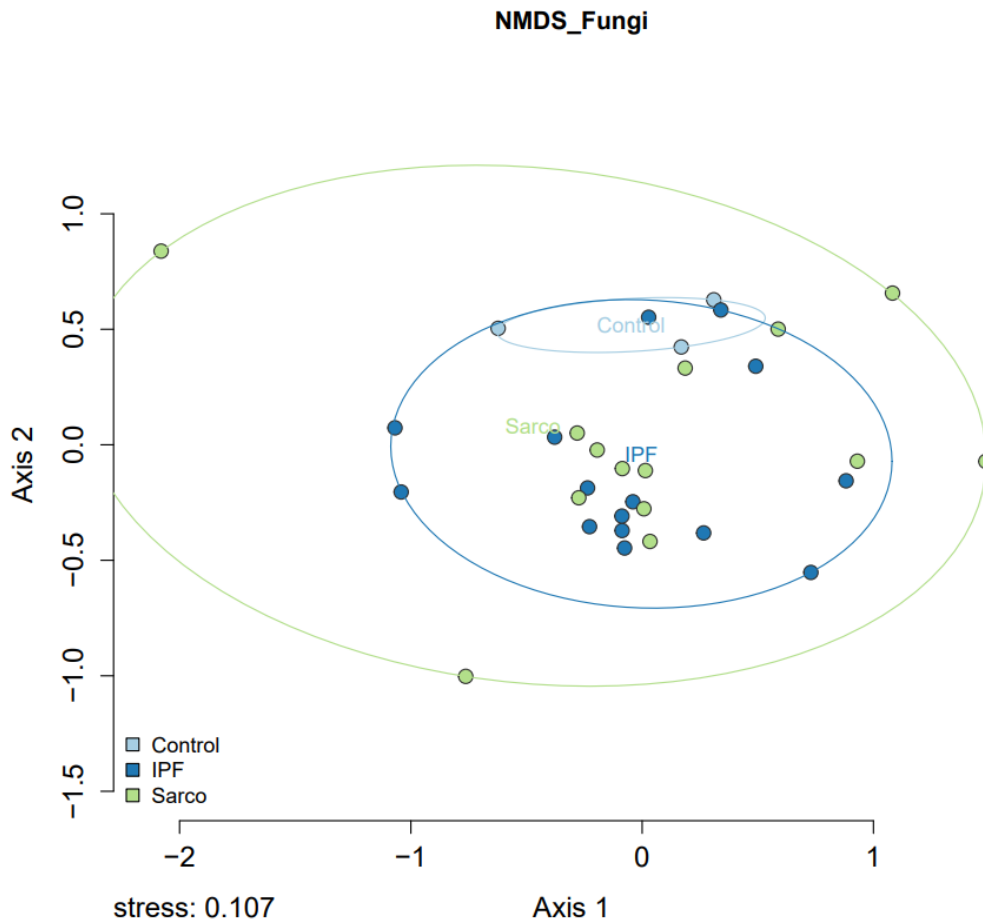
Περαιτέρω αναλύσεις εστίασαν στην διαφοροποίηση τόσο της κοινότητας των βακτηρίων, όσο και αυτή των μυκήτων. Εφαρμόζοντας μη παραμετρική πολυδιάστατης κλιμάκωσης ανάλυση Non-Metric Multidimensional Scaling (nMDS), για την κοινότητα των βακτηρίων, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με πνευμονική ίνωση και υγιών/μάρτυρα, ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων με σαρκοείδωση εμφανίζεται μεγαλύτερη διασπορά και εν μέρει ομαδοποίηση με τις άλλες μεταχειρίσεις της παρούσας μελέτης (**Διάγραμμα 3**).

Αντίθετα, η ανάλυση nMDS της σύστασης της κοινότητας των μυκήτων δεν έδειξε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των μεταχειρίσεων της μελέτης παρά μόνο μια αλληλοεπικάλυψη αυτών (**Διάγραμμα 4**). Γενικότερα, σε μια ανάλυση nMDS, για τιμή stress ίση ή μικρότερη του 0.1 θεωρείται ότι το μοντέλο ανάλυσης επαληθεύει ικανοποιητικά την κατανομή των δειγμάτων, ενώ για τιμή που πλησιάζει ή είναι ανώτερη του 0.2 θεωρείται ότι υπάρχει απλά μια υποψία επαλήθευσης του μοντέλου. Εξαιτίας των υψηλών τιμών stress που προέκυψαν και στις δύο αναλύσεις nMDS, τόσο των βακτηρίων και των μυκήτων, καθώς και της μη διακριτής διαφοροποίησης των μικροβιακών κοινοτήτων,

πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μέθοδος πολυπαραγοντικής ανάλυσης όπως, Canonical Correspondence Analysis για να διαπιστωθεί αν η β-ποικιλότητα βακτηρίων και μυκήτων επηρεάζεται από τις νόσους.



Διάγραμμα 3: Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας 15 ασθενών με IPF (μπλε), 14 ασθενών με σαρκοείδωση (πράσινο) και 3 δειγμάτων μάρτυρα/υγιών (γαλάζιο). Οι ελλείψεις αντιπροσωπεύουν το σύνολο των δειγμάτων ανά ομάδα ασθενών.

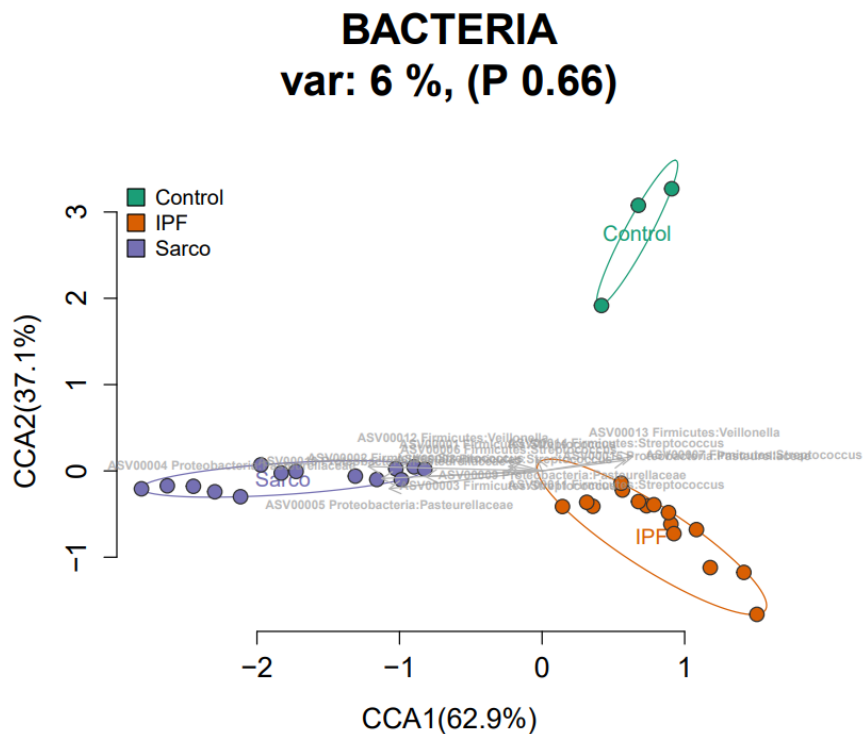


Διάγραμμα 4: Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ανάλυση της κοινότητας μυκήτων 15 ασθενών με IPF (μπλε), 14 ασθενών με σαρκοείδωση (πράσινο) και 3 δειγμάτων μάρτυρα/υγιών (γαλάζιο). Οι ελλείψεις αντιπροσωπεύουν το σύνολο των δειγμάτων ανά ομάδα ασθενών.

3.3.2 Πολυπαραγοντική ανάλυση Canonical Correspondence

Στη συνέχεια των αναλύσεων της παρούσας μελέτης έγινε εφαρμογή πολυπαραγοντικών μεθόδων ανάλυσης όπως η Canonical Correspondence Analysis (CCA) συνδυαστικά με πολυμεταβλητή ανάλυση της διακύμανσης (Permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) των δεδομένων, για την ανίχνευση τυχόν διαφοροποιήσεων των ασθενειών μεταξύ τους. Αρχικά, όμως, για την εφαρμογή της εν λόγω μεθόδου, έγινε τροποποίηση των δεδομένων σύμφωνα με την εξίσωση του Hellinger και μετατροπή τους σε κανονική κατανομή. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης CCA παρόλο που έδειξαν διαφοροποίηση μεταξύ των μεταχειρίσεων ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, των ασθενών με σαρκοείδωση αλλά και των δειγμάτων του μάρτυρα, δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) και μόνο το 6% της διακύμανσης των δεδομένων επαλήθευσαν το μοντέλο (**Διάγραμμα 5**). Τέλος, διαφορετικά ASV βακτηρίων των γενών *Streptococcus*, *Veillonella* και της οικογένειας *Pasteurellaceae* φαίνεται πως είναι

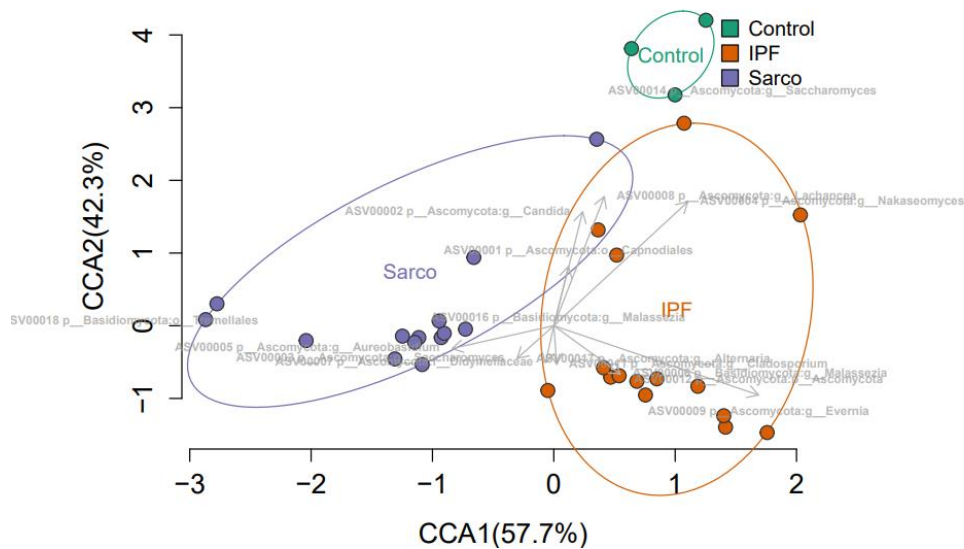
χαρακτηριστικά για IPF και σαρκοείδωση, όπως φαίνονται με τα βέλη στο **Διάγραμμα 5**. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στην ανάλυση της κοινότητας των μυκήτων με αυτή των βακτηρίων, με την διαφοροποίηση των ασθενειών ή μη να μην είναι στατιστικώς σημαντική ($P > 0.05$) και μόνο το 5.6% της διακύμανσης των δεδομένων να επαληθεύουν το μοντέλο ανάλυσης (**Διάγραμμα 6**). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι μύκητες του γένους *Evernia* φαίνονται να είναι χαρακτηριστικοί για τα δείγματα IPF (**Διάγραμμα 6**).



Διάγραμμα 5: Canonical Correspondence Analysis (CCA) της βακτηριακής κοινότητας 15 ασθενών με IPF (πορτοκαλί), 14 ασθενών με σαρκοείδωση (μωβ) και 3 δειγμάτων μάρτυρα/υγιών (πράσινο). Οι ελλείψεις αντιπροσωπεύουν το σύνολο των δειγμάτων ανά ομάδα ασθενών και τα βέλη δείχνουν την κλίση των 15 πιο άφθονων ASV.

FUNGI

var: 5.3 %, (P 0.939)



Διάγραμμα 6: Canonical Correspondence Analysis (CCA) της κοινότητας μυκήτων 15 ασθενών με IPF (πορτοκαλί), 14 ασθενών με σαρκοείδωση (μωβ) και 3 δειγμάτων μάρτυρα/υγιών (πράσινο). Οι ελλείψεις αντιπροσωπεύουν το σύνολο των δειγμάτων ανά ομάδα ασθενών και τα βέλη δείχνουν την κλίση των 15 πιο άφθονων ASV.

3.4 Ανάλυση παραλλακτικότητας της αφθονίας των βακτηρίων και των μυκήτων

Στη συνέχεια των στατιστικών αναλύσεων της παρούσας εργασίας, έγινε ανάλυση της παραλλακτικότητας της αφθονίας των ASV βακτηρίων και μυκήτων, αντίστοιχα, είτε μεταξύ όλων των δειγμάτων των ασθενών με σαρκοείδωση, των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και των υγιών ανθρώπων (δείγματα μάρτυρα) είτε μεταξύ των ασθενειών συγκεντρωτικά.

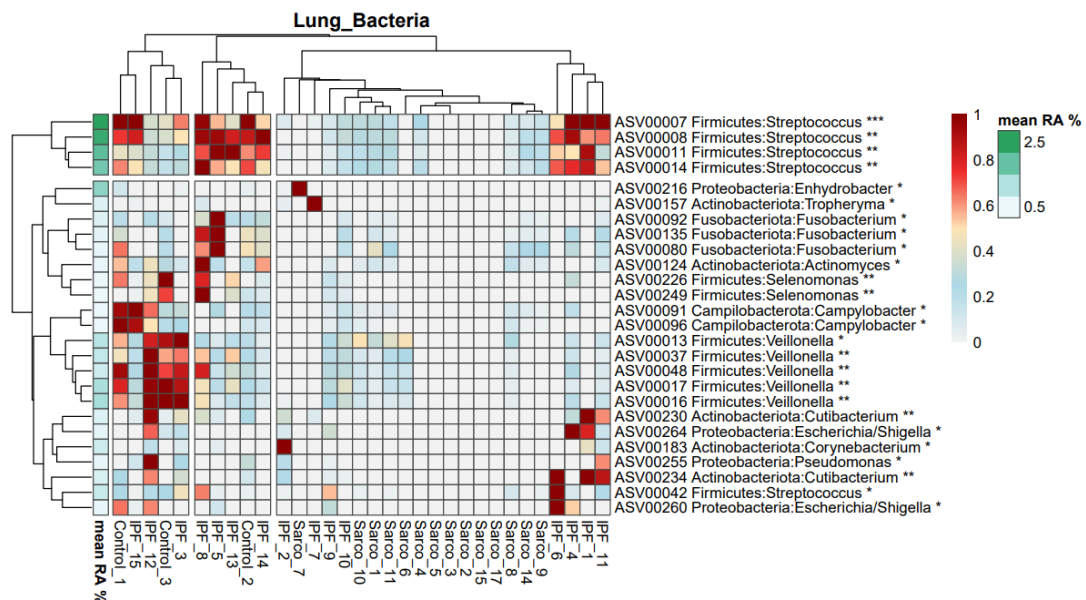
Κοινότητες βακτηρίων:

Συγκεκριμένα για την ανάλυση της παραλλακτικότητας της αφθονίας κατασκευάστηκαν heatmaps για να απεικονίσουν την διαφορετική σύνθεση και αφθονία των στατιστικά πιο κυρίαρχων βακτηριακών ASVs μέσα σε κάθε δείγμα ασθενούς (**Διάγραμμα 7**) και σε κάθε ασθένεια γενικότερα (**Διάγραμμα 8**).

Από την ανάλυση της παραλλακτικότητας των δειγμάτων ξεχωριστά (**Διάγραμμα 7**) φαίνεται πως το ASV *Enhydrobacter* (216) εντοπίζεται μόνο στο δείγμα Sarco_7 και είναι το μοναδικό ASV της ανάλυσης που χαρακτηρίζεται ως το πιο άφθονο στη σαρκοείδωση. Όσον

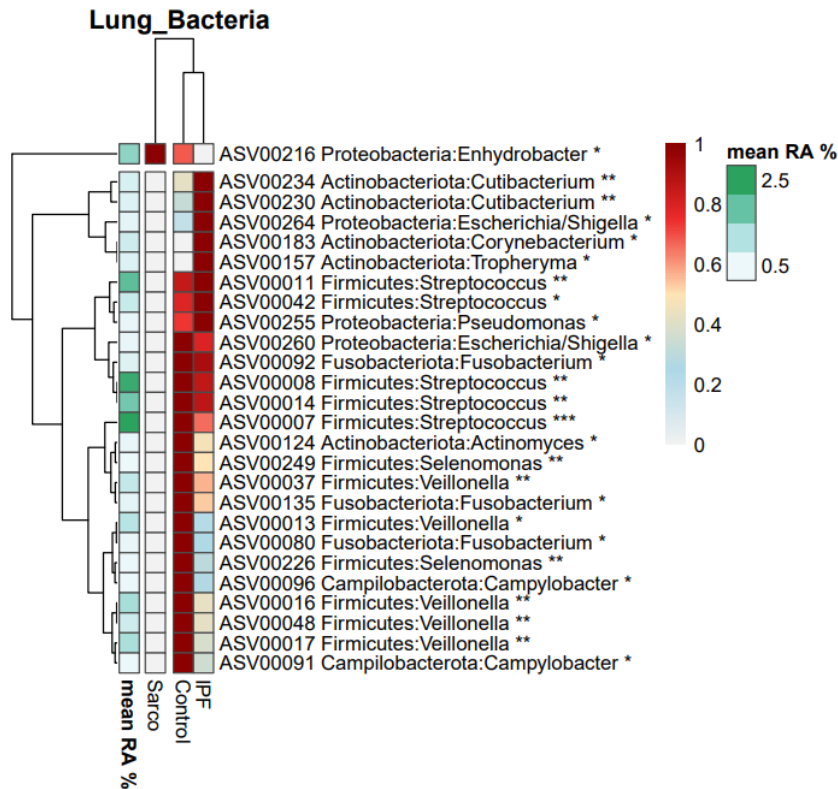
αφορά την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, φαίνεται πως τα ASVs *Streptococcus* (7, 8 11, 14, 42) εμφανίζονται ως τα πιο άφθονα στα περισσότερα δείγματα IPF αλλά και σε κάποια δείγματα του μάρτυρα, ενώ τα μοναδικά πιο άφθονα ASV στην περίπτωση των ασθενών με IPF είναι τα ASVs των γενών *Fusobacterium* (92, 135, 80), *Cutibacterium* (234, 230), *Escherichia/Shigella* (264, 260) και *Tropheryma* (157). Τέλος, τα πιο άφθονα και στατιστικώς σημαντικά ASVs των δειγμάτων του μάρτυρα (υγιείς άνθρωποι) ήταν αυτά των *Selomonas* (249, 226) και *Campylobacter* (96, 91) (Διάγραμμα 7).

Παράλληλα, όταν η ίδια ανάλυση έγινε συγκεντρωτικά για τα δείγματα της κάθε ασθένειας, παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα με την παραπάνω ανάλυση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε εμφανώς ότι το ASV216 *Enhydrobacter* απαντάται να είναι στατιστικώς σημαντικά πιο άφθονο στα δείγματα των δειγμάτων με σαρκοείδωση και μόνο. Αντίθετα, στην περίπτωση των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση παρατηρήθηκε ότι τα *Cutibacterium* (234, 230), *Corynebacterium* (183), *Tropheryma* (157) είναι στατιστικά σημαντικά πιο άφθονα, ενώ για τα δείγματα του μάρτυρα τα στατιστικώς πιο άφθονα ASVs ήταν τα *Fusobacterium* (135 και 80), *Veillonella* (13, 16, 48 και 17), *Selomonas* (226) και *Campylobacter* (91 και 96) (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 7: Heatmap ανάλυση όπου εμφανίζεται η σύνθεση κάθε δείγματος της παρούσας μελέτης με τα πιο στατιστικώς σημαντικά βακτηριακά ASVs. Οι διαφορετικές τιμές αφθονίας για κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκαν σε ένα εύρος από 0 έως 1 και υποδεικνύεται με κωδικό χρώματος

από λευκό έως κόκκινο. Η μέση σχετική αφθονία του συνόλου των δεδομένων για κάθε ASV φαίνεται με λευκό έως πράσινο χρώμα (το επίπεδο σημαντικότητας της συσχέτισης καταδεικνύεται με αστερίσκους ως εξής : '***' P= 0.001, '**' P= 0.01, '*' P= 0.5).



Διάγραμμα 8: Heatmap ανάλυση όπου εμφανίζεται η σύνθεση κάθε ασθενείας συγκεντρωτικά με τα πιο στατιστικώς σημαντικά βακτηριακά ASVs. Οι διαφορετικές τιμές αφθονίας για κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκαν σε ένα εύρος από 0 έως 1 που υποδεικνύεται με κωδικό χρώματος από λευκό έως κόκκινο. Η μέση σχετική αφθονία του συνόλου των δεδομένων για κάθε ASV φαίνεται με λευκό έως πράσινο χρώμα (το επίπεδο σημαντικότητας της συσχέτισης καταδεικνύεται με αστερίσκους ως εξής : '***' P= 0.001, '**' P= 0.01, '*' P= 0.5).

Σε συνέχεια των αναλύσεων με βάση τα παραπάνω, αναλύσαμε περαιτέρω την σχετική αφθονία των διαφόρων ASVs στις δυο ασθένειες της μελέτης και τα δείγματα του μάρτυρα και εντοπίστηκαν 26 ASVs στατιστικώς διαφορετικά, τα οποία αναφέρονται παρακάτω (**Διάγραμμα 9**). Σύμφωνα με την ανάλυση, τα περισσότερα ASVs *Streptococcus* είναι στατιστικά σημαντικά πιο άφθονα στα δείγματα του μάρτυρα και της IPF έναντι αυτών της σαρκοείδωσης, ενώ όλα τα ASVs *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* και *Selomonas*, όπως και το ASV *Actinomyces* είναι πιο άφθονα στα δείγματα μάρτυρα από ότι στην IPF, παρόλο που συσχετίζονται και με τα δύο γκρουπ. Αντιθέτως, τα ASVs *Tropheryma*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium* και *Escherichia/Shigella* είναι πιο άφθονα στην ιδιοπαθή

πνευμονική ίνωση απ' ότι στη σαρκοείδωση, αλλά όχι και από τα δείγματα του μάρτυρα. Τέλος, το ASV *Enhydrobacter* είναι στατιστικά σημαντικά πιο άφθονο στη σαρκοείδωση.

- ASV 7 *Streptococcus*
- ASV 8 *Streptococcus*
- ASV 11 *Streptococcus*
- ASV 14 *Streptococcus*
- ASV 216 *Enhydrobacter*
- ASV 157 *Tropheryma*
- ASV 92 *Fusobacterium*
- ASV 135 *Fusobacterium*
- ASV 80 *Fusobacterium*
- ASV 124 *Actinomyces*
- ASV 226 *Selomonas*
- ASV 249 *Selomonas*
- ASV 91 *Campylobacter*
- ASV 96 *Campylobacter*
- ASV 13 *Veillonella*
- ASV 37 *Veillonella*
- ASV 48 *Veillonella*
- ASV 17 *Veillonella*
- ASV 16 *Veillonella*
- ASV 230 *Cutibacterium*
- ASV 264 *Escherichia/Shigella*
- ASV 183 *Corynebacterium*
- ASV 255 *Pseudomonas*
- ASV 234 *Cutibacterium*
- ASV 42 *Streptococcus*
- ASV 260 *Escherichia/Shigella*



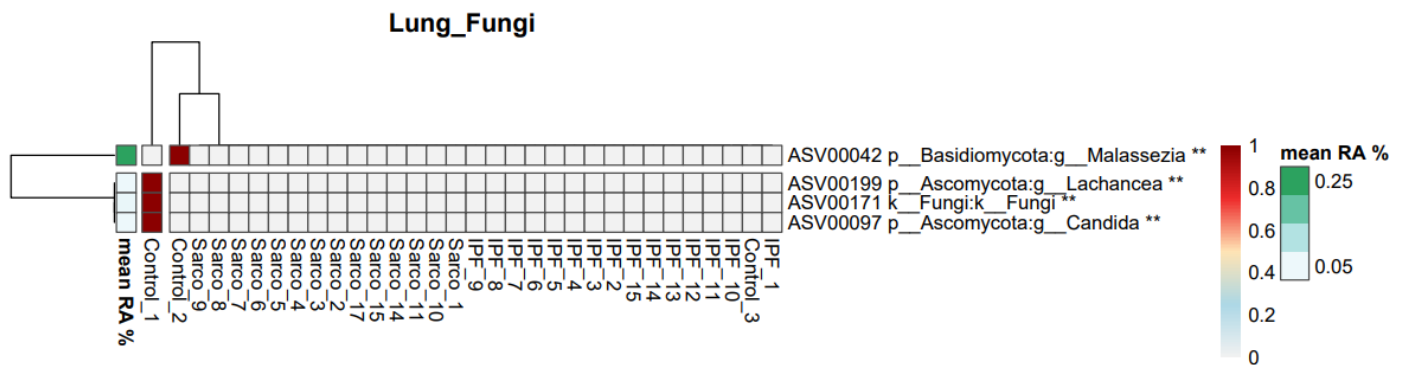
Διάγραμμα 9: Κατανομή της σχετικής αφθονίας των 26 πιο στατιστικά σημαντικών βακτηριακών ASVs. Η στάθμη σημαντικότητας υποδηλώνεται με γράμματα, μετά το Kruskal Wallis test: $\alpha = 0.05$.

Κοινότητες μυκήτων:

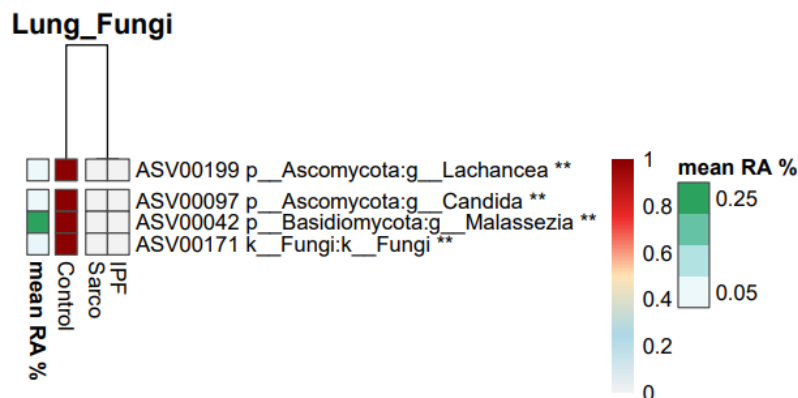
Για την ανάλυση της παραλλακτικότητας της αφθονίας της κοινότητας των μυκήτων, κατασκευάστηκαν επίσης τα αντίστοιχα heatmaps για την απεικόνιση της διαφορετικής

σύνθεσης και αφθονίας των ASVs σε κάθε δείγμα ασθενούς (Διάγραμμα 10) και σε κάθε ασθένεια συγκεντρωτικά (Διάγραμμα 11).

Από την ανάλυση σε ξεχωριστά δείγματα προκύπτει πως όλα τα ASVs είναι στατιστικά σημαντικά πιο άφθονα στα δείγματα μάρτυρα και φαίνεται να συσχετίζονται μόνο με αυτά (Διάγραμμα 10). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τη συγκεντρωτική ανάλυση (Διάγραμμα 11).



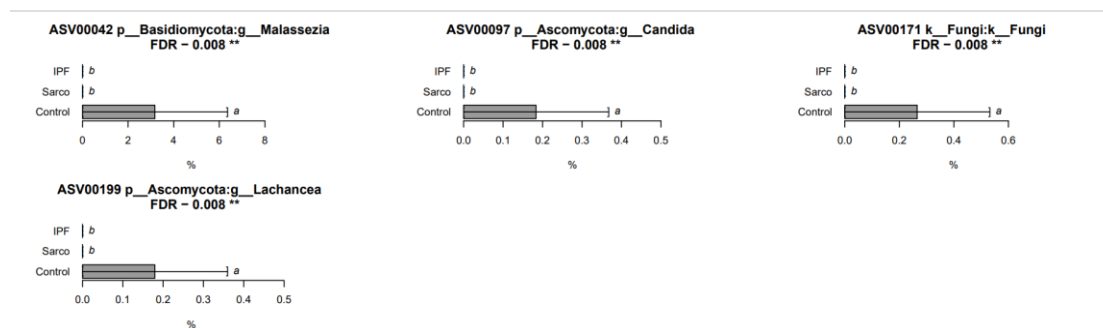
Διάγραμμα 10: Heatmap ανάλυση όπου εμφανίζεται η σύνθεση κάθε δείγματος της παρούσας μελέτης με τα πιο στατιστικώς σημαντικά μυκηλιακά ASVs. Οι διαφορετικές τιμές αφθονίας για κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκαν σε εύρος από 0 έως 1 που υποδεικνύεται με κωδικό χρώματος από λευκό έως κόκκινο. Η μέση σχετική αφθονία του συνόλου δεδομένων για κάθε ASV φαίνεται με λευκό έως πράσινο (το επίπεδο σημαντικότητας της συσχέτισης υποδηλώνεται με αστερίσκους: «*» $P \leq 0.05$, «**» $P \leq 0.01$, «***» $P \leq 0.001$).



Διάγραμμα 11: Heatmap ανάλυση όπου εμφανίζεται η σύνθεση της κάθε ασθένειας συγκεντρωτικά με τα πιο στατιστικώς σημαντικά μυκηλιακά ASVs. Οι διαφορετικές τιμές αφθονίας για κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκαν σε εύρος από 0 έως 1 που υποδεικνύεται με κωδικό χρώματος από λευκό έως κόκκινο. Η μέση σχετική αφθονία του συνόλου των δεδομένων για κάθε ASV φαίνεται με λευκό έως πράσινο (το επίπεδο σημαντικότητας καταδεικνύεται με αστερίσκους: «*» $P \leq 0.05$, «**» $P \leq 0.01$, «***» $P \leq 0.001$).

Σε περαιτέρω ανάλυση της σχετικής αφθονίας των διαφόρων ASVs των μυκήτων στις δύο πνευμονοπάθειες και στα δείγματα μάρτυρα της μελέτης, εντοπίστηκαν 4 στατιστικώς σημαντικά ASVs που παρουσιάζονται στη συνέχεια (**Διάγραμμα 12**). Σύμφωνα με την ανάλυση, όλα τα ASVs φαίνεται πως είναι στατιστικώς σημαντικά πιο άφθονα στα δείγματα μάρτυρα έναντι των δειγμάτων IPF και σαρκοείδωσης.

- ASV 42 *Malassezia*
- ASV 97 *Candida*
- ASV 171 *Fungi*
- ASV 199 *Lachancea*



Διάγραμμα 12: Κατανομή της σχετικής αφθονίας των 4 πιο στατιστικά σημαντικών μυκηλιακών ASVs. Η στάθμη σημαντικότητας υποδηλώνεται με γράμματα, μετά το Kruskal Wallis test: a = 0.05.

3.5 Σύνοψη της μικροβιακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου, οικογένειας και γένους

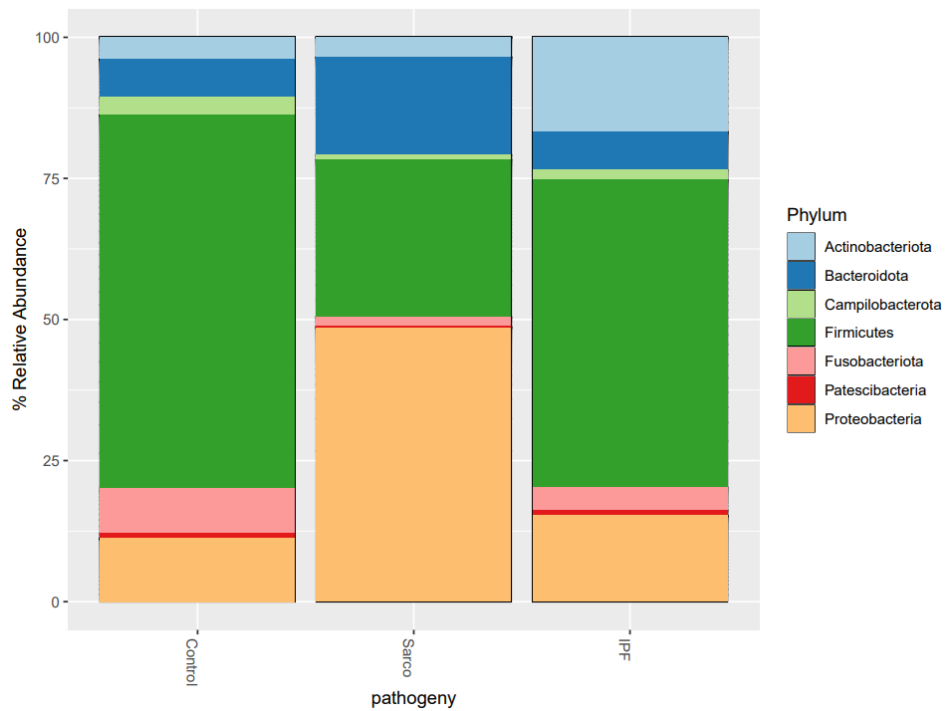
Οι τελευταίες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αφορούν τη σχετική αφθονία βακτηρίων και μυκήτων σε επίπεδο φύλου, οικογένειας και γένους (**Διαγράμματα 13-18**).

Ξεκινώντας με τη βακτηριακή κοινότητα, σε επίπεδο φύλου, είναι φανερό πως το κυρίαρχο φύλο στα δείγματα ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης και στα δείγματα του μάρτυρα είναι τα Firmicutes, με ποσοστό >50%. Στη σαρκοείδωση, αντίθετα, επικρατούν τα Proteobacteria με ποσοστό περίπου 50%, ενώ τα Firmicutes καταλαμβάνουν το 25% της κοινότητας. Τα Fusobacteria φαίνεται να είναι πιο άφθονα στα δείγματα του μάρτυρα σε σύγκριση με τις πνευμονοπάθειες, όπως και τα Campilobacterota. Ακόμη, τα Bacteroidota παρουσιάζουν διπλάσια σχετική αφθονία στα δείγματα της σαρκοείδωσης σε σχέση με τα

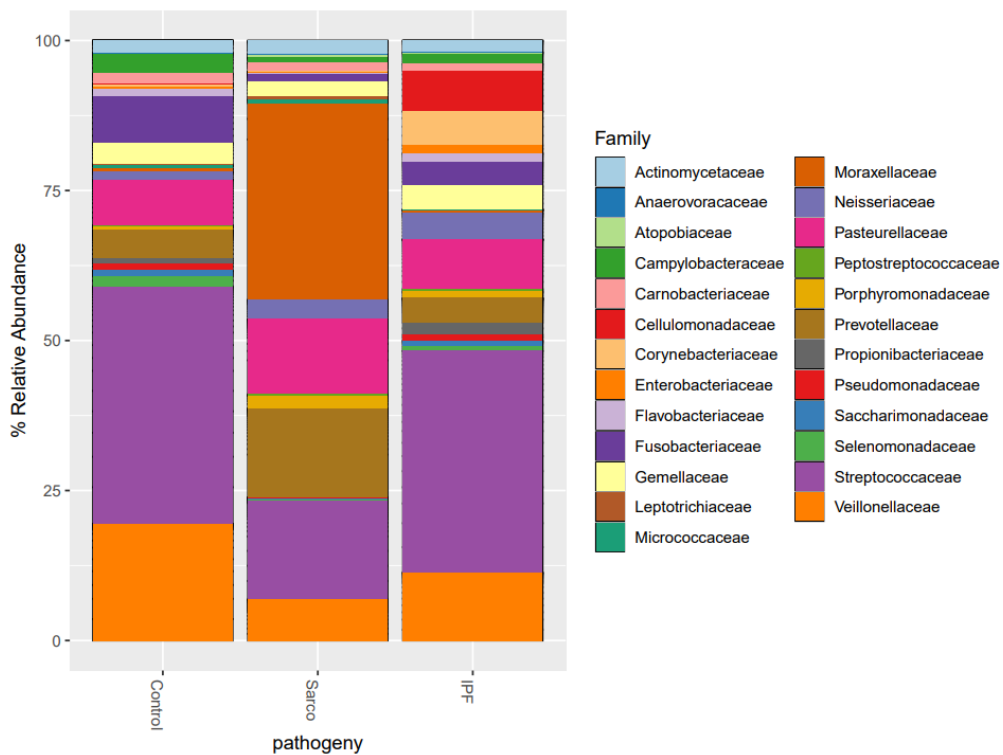
υπόλοιπα, ενώ τα Actinobacteriota είναι εμφανώς αυξημένα στα δείγματα IPF (Διάγραμμα 13).

Σε επίπεδο οικογένειας, τόσο στα δείγματα IPF όσο και στα δείγματα του μάρτυρα, κυριαρχούν τα *Streptococcaceae* με ποσοστό περίπου 40% και στις δύο μεταχειρίσεις, ενώ στη σαρκοείδωση η κυρίαρχη οικογένεια είναι των *Moraxellaceae* με ποσοστό 30-40%. Παράλληλα, τα *Prevotellaceae* και *Pasteurellaceae* εμφανίζονται πιο άφθονα συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες συμμετεχόντων. Επίσης, παρατηρώντας τη σύσταση της βακτηριακής μικροβιακής κοινότητας των ασθενών και μη αυτής της μελέτης, φαίνεται να εμφανίζονται αρκετές ομοιότητες μεταξύ των ασθενών με IPF και υγιών/δειγμάτων μάρτυρα, παρόλα αυτά όμως υπάρχουν και κάποιες χαρακτηριστικές διαφορές. Συγκεκριμένα, τα *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* και *Cellulomonadaceae* είναι πιο άφθονα μόνο στην IPF, ενώ τα *Fusobacteriaceae* και *Campylobacteriaceae* είναι πιο άφθονα μόνο στα δείγματα του μάρτυρα, και τα *Enterobacteriaceae* μόνο στην σαρκοείδωση (Διάγραμμα 14).

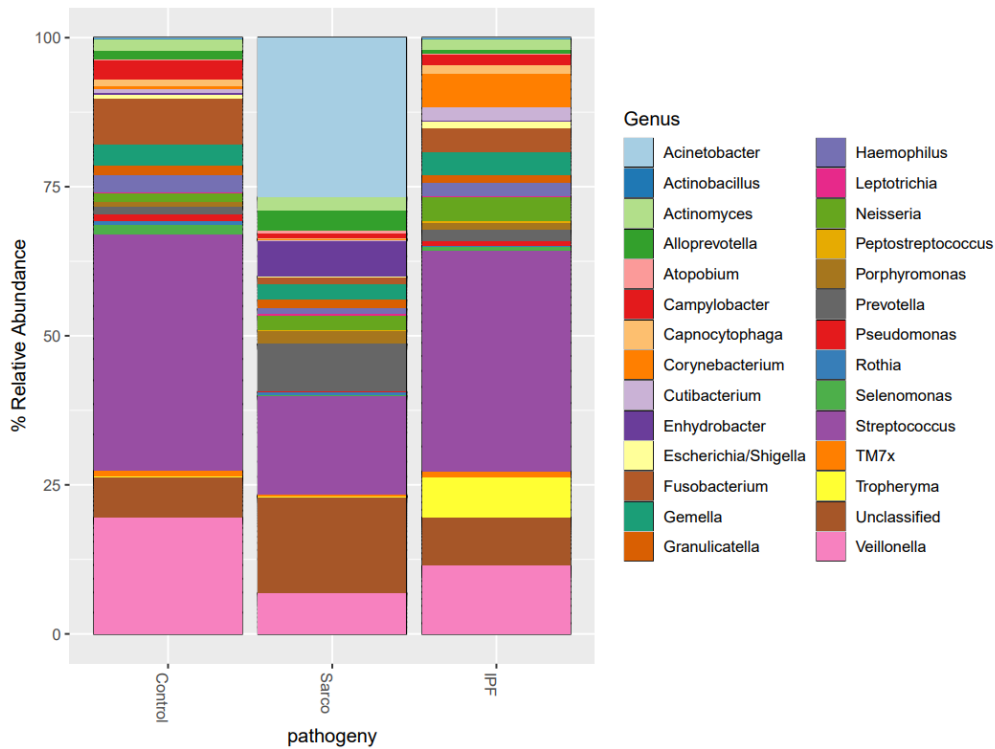
Τέλος, σε επίπεδο γένους, στους ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και στους υγιείς ανθρώπους/δείγματα μάρτυρες φαίνεται να κυριαρχούν τα γένη *Streptococcus* με ποσοστό περίπου 40% και *Veillonella* με ποσοστά από 10 έως 15% σε κάθε μεταχείριση αντίστοιχα. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι μόνο στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση εμφανίζονται πιο άφθονα τα γένη *Corynebacterium*, *Neisseria* και *Tropheryma* σε σύγκριση με τα δείγματα του μάρτυρα και των ασθενών με σαρκοείδωση. Τέλος, οι ασθενείς με σαρκοείδωση εμφανίζουν μια διαφορετική εικόνα, με τα πιο άφθονα γένη και μόνο στα δείγματα της σαρκοείδωσης να είναι να είναι το *Acinetobacter* με ποσοστό >25% και να ακολουθούν με αυξημένη σχετική αφθονία ο *Streptococcus*, τα *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Enhydrobacter* και *Alloprevotella* (Διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 13: Barplot που παρουσιάζουν την σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου βάσει των 200 πιο άφθονων ASVs.



Διάγραμμα 14: Barplot που παρουσιάζουν την σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο οικογένειας βάσει των 200 πιο άφθονων ASVs.



Διάγραμμα 15: Barplot που παρουσιάζουν την σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο γένους βάσει των 200 πιο άφθονων ASVs.

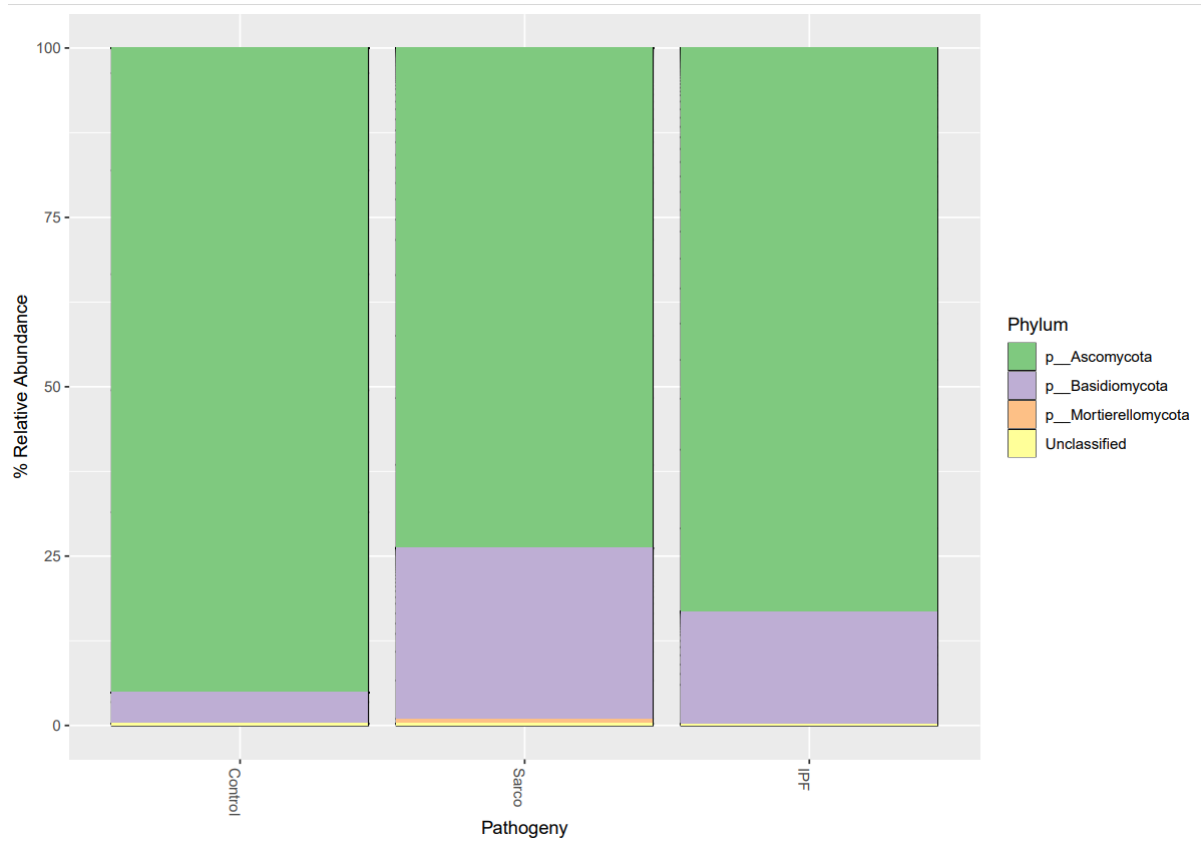
Οι αντίστοιχες αναλύσεις στους μύκητες έδειξαν πως και στις 3 ομάδες ασθενών ή μη της παρούσας μελέτης, τα *Ascomycota* καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό της σύνθεσης της μυκηλιακής κοινότητας, με περίπου 90% στο μάρτυρα, >75% στην IPF και 75% στη σαρκοείδωση, ενώ το δεύτερο πιο άφθονο φύλο είναι τα *Basidiomycota* (**Διάγραμμα 16**).

Στη συνέχεια των αναλύσεων είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε επίπεδο οικογένειας και γένους η σύνθεση της μυκηλιακής κοινότητας παρουσιάζει ποικιλομορφία και αρκετές ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων των δύο πνευμονοπαθειών σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα (**Διαγράμματα 17, 18**).

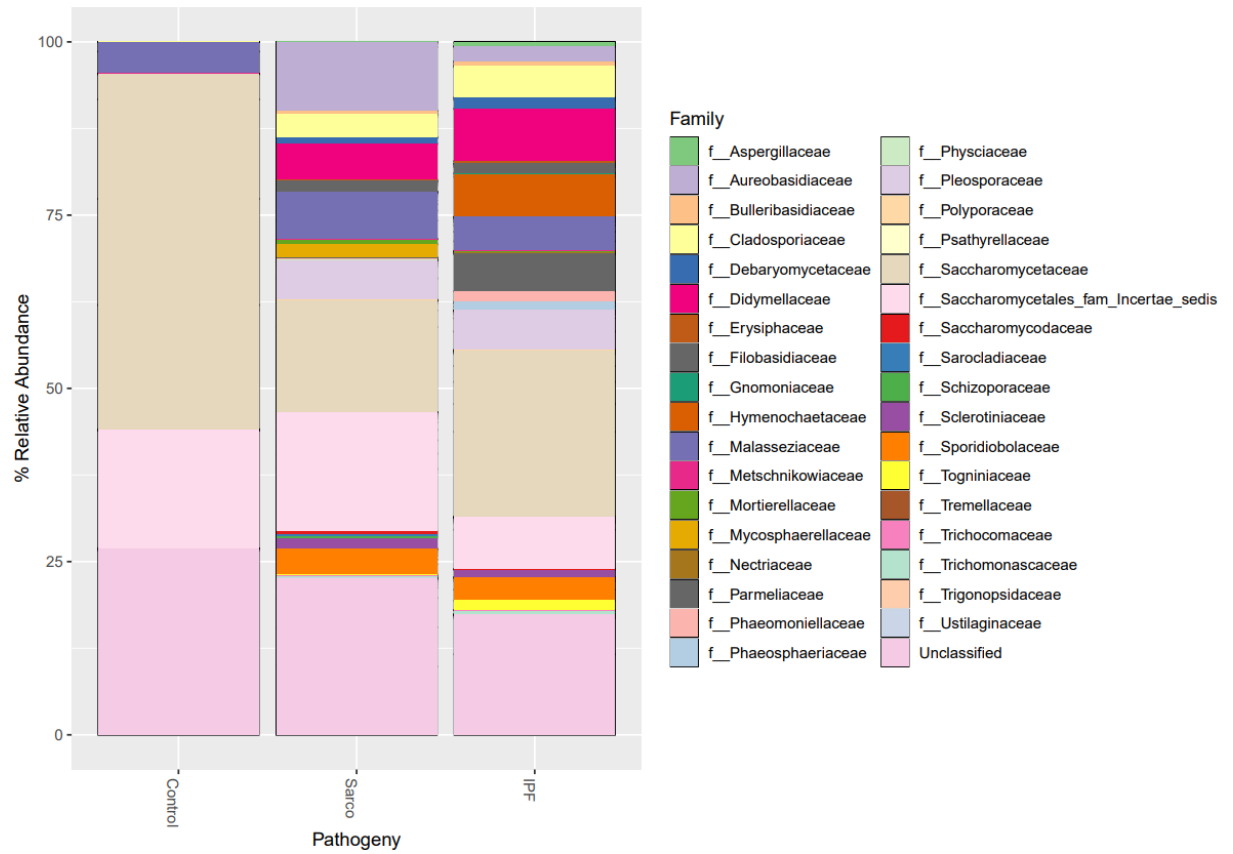
Σε επίπεδο οικογένειας, στα δείγματα μάρτυρα οι πιο άφθονες οικογένειες που απαρτίζουν σχεδόν 100% της σύνθεσης της μυκηλιακής κοινότητας, είναι τα *Mallasseziaceae*, *Saccharomycetales*, οι μη ταξινομημένες οικογένειες και τα *Saccharomycetaceae* με αύξουσα σειρά αφθονίας. Στην ασθένεια IPF, η πιο άφθονη οικογένεια είναι των *Saccharomycetaceae* με ποσοστό περίπου 25% και ακολουθούν οι μη ταξινομημένες οικογένειες και τα *Saccharomycetales*. Στη σαρκοείδωση οι κυρίαρχες

οικογένειες είναι οι μη ταξινομημένες με ποσοστό >20%, ενώ οι οικογένειες των *Saccharomycetaceae* και *Saccharomycetales* ακολουθούν με ποσοστό περίπου 15% εκάστη. Χαρακτηριστικό είναι όμως να αναφερθεί ότι παρατηρούνται οικογένειες που εμφανίζονται σχετικά πιο άφθονες σε μια μόνο από τις δυο πνευμονοπάθειες, όπως για παράδειγμα η περίπτωση των *Aspergillaceae*, *Hymenochaetaceae*, *Phaeomoniellaceae*, *Phaeosphaeriaceae* και *Togniniaceae* που συναντώνται αισθητά πιο άφθονα στην ασθένεια IPF και οι οικογένειες *Mycosphaerellaceae*, *Sacharomycodaceae* και *Schizoporaceae* που είναι πιο άφθονες στα δείγματα σαρκοείδωσης (Διάγραμμα 17).

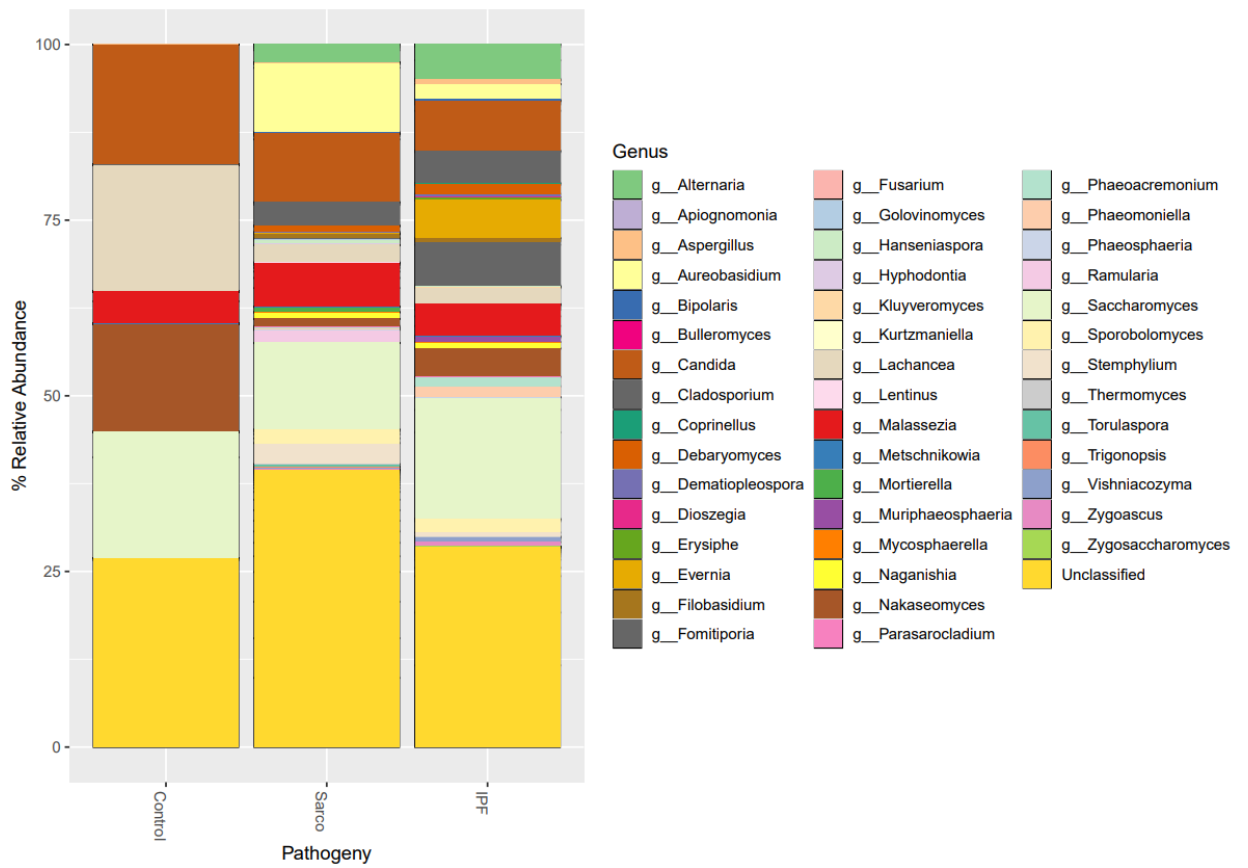
Τέλος, σε επίπεδο γένους, τα κυρίαρχα γένη και στις 3 ομάδες ασθενών ή μη, είναι τα μη ταξινομημένα γένη με ποσοστό 25-30%, το *Saccharomyces* με ποσοστό περίπου 20% στα δείγματα του μάρτυρα και IPF και περίπου 15% στη σαρκοείδωση και με χαμηλότερα ποσοστά τα *Candida*, *Nakaseomyces*, *Lachancea* και *Malassezia*. Τα χαρακτηριστικότερα πιο άφθονα γένη που απαντώνται μόνο στα δείγματα της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης είναι τα *Aspergillus*, *Dematiopleospora*, *Evernia*, *Formitiporia*, *Metschnikowia*, *Muriphaeosphaeria*, *Phaeoacremonium* και *Phaeomoniella*, ενώ για την σαρκοείδωση είναι τα *Golovinomyces*, *Mortierella* και *Ramularia* (Διάγραμμα 18).



Διάγραμμα 16: Barplot που παρουσιάζουν την σύνθεση της μυκηλιακής κοινότητας σε επίπεδο φύλου βάσει των 200 πιο άφθονων ASVs.



Διάγραμμα 17: Barplot που παρουσιάζουν την σύνθεση της μυκηλιακής κοινότητας σε επίπεδο οικογένειας βάσει των 200 πιο άφθονων ASVs.



Διάγραμμα 18: Barplot που παρουσιάζουν την σύνθεση της μυκηλιακής κοινότητας σε επίπεδο γένους βάσει των 200 πιο άφθονων ASVs.

ΤΕΤΑΡΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. Συμπεράσματα - συζήτηση

Για πολλά χρόνια η επιστημονική κοινότητα θεωρούσε πως ο υγιής πνεύμονας συνεπάγεται στειρότητα (Dickson e tal., 2016). Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών αλλά και η ανάπτυξη τεχνολογιών νέας γενιάς αλληλούχισης, βοήθησαν κατά κόρον στη μελέτη του μικροβιώματος σε πνευμονικά δείγματα, όπως για παράδειγμα, σε δείγματα από βρογχοκυψελιδικό υγρό, με αποτέλεσμα να είναι πλέον γνωστή η ύπαρξη μικροβιακών κοινοτήτων στους κατώτερους αεραγωγούς. Η σύσταση των κοινοτήτων είναι χαρακτηριστική τόσο στην υγεία όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Hilty et al., 2010). Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η σύσταση και η ποικιλότητα του πνευμονικού μικροβιώματος σε 35 συνολικά δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού ασθενών που έπασχαν από ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ή σαρκοείδωση. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν, επίσης, και τρία δείγματα μάρτυρα, από πιθανούς ασθενείς πνευμονοπάθειας. Ύστερα από κλινική εξέταση αποδείχτηκε ότι δεν έπασχαν από IPF ή σαρκοείδωση, ωστόσο δεν αντιπροσωπεύουν τον γενικό υγιή πληθυσμό.

Η μελέτη των δεικτών της α-ποικιλότητας έδειξε πως, κατά κανόνα, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μικροοργανισμών που συσχετίζονται με την κάθε νόσο, με εξαίρεση τον δείκτη Inverse Simpson για τα πιο κυρίαρχα ASVs στη μελέτη της βακτηριακής κοινότητας των ασθενών ομάδων ή μη της παρούσας εργασίας.

Από τη μελέτη της β-ποικιλότητας με τη μέθοδο ανάλυσης CCA, προέκυψαν διαφοροποιήσεις και ομαδοποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων των διαφορετικών ομάδων ασθενών, οι οποίες, όμως, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε καμία από τις δύο κοινότητες, βακτηρίων και μυκήτων. Στην ανάλυση παραλλακτικότητας της αφθονίας των 26 πιο στατιστικά σημαντικών βακτηριακών ASVs προέκυψε συσχέτιση του ASV *Enhydrobacter* με τη σαρκοείδωση, τα ASVs *Tropheryma*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Escherichia/Shigella* βρέθηκαν πιο άφθονα στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ενώ τα ASVs *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Selomonas* και το ASV *Actinomyces* πιο άφθονα στα δείγματα του μάρτυρα. Ακόμη, τα περισσότερα ASVs *Streptococcus* βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά πιο άφθονα στα δείγματα μάρτυρα και IPF. Στην αντίστοιχη ανάλυση για τους μύκητες προέκυψαν 4 μόνο στατιστικά σημαντικά ASVs, τα οποία ήταν πιο άφθονα στα δείγματα του μάρτυρα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σχετικής αφθονίας βακτηρίων και μυκήτων σε επίπεδο φύλου, οικογένειας και γένους. Όσον αφορά τα βακτήρια προέκυψε πως η σύνθεση της κοινότητας παρουσιάζει ομοιότητες στα δείγματα του μάρτυρα και των ασθενών με IPF, ενώ διαφέρει με αυτή της σαρκοείδωσης. Έτσι, το

φύλο που κυριαρχεί σε IPF και δείγματα μάρτυρα είναι τα Firmicutes, ενώ στη σαρκοείδωση τα Proteobacteria είναι πιο άφθονα. Σε επίπεδο οικογένειας κυριαρχούν τα *Streptococcaceae* (IPF, δείγματα μάρτυρα) και *Moraxellaceae* (σαρκοείδωση). Συνεχίζοντας, τα κυρίαρχα γένη είναι τα *Streptococcus* και *Veillonella* σε IPF και δείγματα μάρτυρα και το *Acinetobacter* στη σαρκοείδωση. Στην περίπτωση των μυκήτων φάνηκε πως υπάρχουν ομοιότητες στη σύσταση της κοινότητας στα δείγματα των δύο πνευμονοπαθειών. Πιο συγκεκριμένα, και στα 3 γκρουπ το κυρίαρχο φύλο είναι τα Ascomycota. Σε επίπεδο οικογένειας, στα δείγματα μάρτυρα πιο άφθονα είναι τα *Mallasseziaceae*, *Saccharomycetales*, στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση οι οικογένειες *Saccharomycetaceae*, ενώ στη σαρκοείδωση κυριαρχούν οι μη ταξινομημένες οικογένειες. Σε επίπεδο γένους, κυρίαρχα και στις 3 ομάδες είναι τα μη ταξινομημένα γένη, ενώ ακολουθεί το γένος *Saccharomyces*.

Τα αποτελέσματα συμφωνούν, εν μέρει, με στοιχεία που έχουν δημοσιευθεί τα προηγούμενα χρόνια στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι περισσότερες μελέτες στο πεδίο εξέτασαν τον ρόλο της αφθονίας των βακτηρίων στην πορεία των δύο πνευμονοπαθειών, ενώ ταυτόχρονα σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε κατηγοριοποίηση των ασθενών σύμφωνα με το στάδιο της νόσου (O'Dwyer et al 2019; Molyneaux et al., 2017; Zimmerman et al., 2017), κάτι που δεν λήφθηκε υπόψη στην παρούσα μελέτη.

Όσον αφορά την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως σε επίπεδο φύλου επικρατούν τα Firmicutes, ενώ σε επίπεδο γένους τα γένη *Streptococcus* (Firmicutes), *Prevotella* (Bacteroidota), *Veillonella* (Firmicutes) (Invernizzi et al., 2021; Takahashi et al 2018; Molyneaux et al., 2017), εύρημα που συσχετίζεται και με την εξέλιξη της νόσου. Στην παρούσα μελέτη τα γένη *Streptococcus* και *Veillonella* ήταν όντως τα πιο άφθονα στα δείγματα IPF, ωστόσο, το γένος *Prevotella* φαίνεται πως καταλαμβάνει σημαντικά μικρότερο ποσοστό της κοινότητας. Τα βακτήρια του γένους *Streptococcus* είναι σφαιρικά Gram+ προαιρετικά ή υποχρεωτικά αναερόβια. Από τα 50 περίπου γνωστά είδη, μόνο 5 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και είναι υπεύθυνα για το 1% περίπου των περιπτώσεων πνευμονίας στους ενήλικους (Zander & Farver, 2008). Όσον αφορά το γένος *Veillonella*, πρόκειται για Gram- αναερόβιους διπλόκοκκους που ανήκουν στη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα του στόματος και της γαστρεντερικής οδού. Έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις της στοματικής κοιλότητας αλλά και των πνευμόνων, παρά το γεγονός πως η παθογένειά τους θεωρείται περιορισμένη (Actor, 2012). Ακόμη, ανιχνεύθηκε το γένος

Gemella που ανήκει επίσης στο φύλο Firmicutes και έχει συσχετιστεί με συγκεκριμένη ακτινολογική εικόνα σε ασθενείς με IPF (Dickson et al., 2019).

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποικιλότητα μεταξύ της νόσου IPF και των δειγμάτων του μάρτυρα, παρόλο που στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μεταβολές τόσο στην α - όσο και στη β -ποικιλότητα όταν έγινε σύγκριση μεταξύ ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και υγιών (Lipinski et al., 2020). Λαμβάνοντας υπόψη την προέλευση και τον αριθμό των δειγμάτων ελέγχου στην παρούσα μελέτη, γίνεται κατανοητό πως δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί αυτή η σύγκριση και να προκύψουν ακριβή συμπεράσματα στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Πρόσφατες μελέτες που αφορούν το πνευμονικό μικροβίωμα στη σαρκοείδωση αναφέρουν αυξημένη αφθονία *Atorobium* και *Fusobacterium* (Zimmerman et al., 2017) και συσχέτιση του γένους *Corynebacterium* με την νόσο (Clarke et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, το γένος *Corynebacterium* εμφανίζεται πιο άφθονο στην IPF συγκριτικά με τους ασθενείς με σαρκοείδωση, ενώ το πιο άφθονο γένος στη σαρκοείδωση είναι το *Acinetobacter* που ανήκει στα γ -Proteobacteria. Σε πρόσφατη μελέτη των Becker et al. (2019) με σκοπό τον χαρακτηρισμό του πνευμονικού μικροβιώματος στη σαρκοείδωση σε σύγκριση με άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες, βρέθηκε πως το γένος *Acinetobacter* αποτελούσε μια από τις πιο άφθονες ομάδες μικροοργανισμών στην κοινότητα. Γενικά, τα είδη του γένους *Acinetobacter* ευθύνονται για λοιμώξεις του αναπνευστικού στον άνθρωπο, ενδονοσοκομειακές και μη, καθώς δύνανται να προσβάλλουν αρκετά συστήματα οργάνων (Kaye & Bonomo, 2020). Παράλληλα, το γένος *Enhydrobacter* που ανήκει επίσης στα Proteobacteria έχει συσχετιστεί με δείκτες φλεγμονής στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Scher et al., 2016), ένα αυτοάνοσο φλεγμονώδες νόσημα με παρόμοια συμπτωματολογία με τη σαρκοείδωση σε ορισμένες περιπτώσεις.

Όσον αφορά τους μύκητες που εντοπίζονται στις συγκεκριμένες πνευμονοπάθειες, δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία στη βιβλιογραφία ακόμη. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τείνουν να συμφωνούν με αυτά των Molyneaux et al., (2016) που εντόπισαν, μεταξύ άλλων, τα γένη *Malassezia*, *Candida* και *Aspergillus* σε ασθενείς με IPF. Πρόσφατα, έγινε αναφορά ενός κλινικού περιστατικού που αφορούσε μόλυνση από τον μύκητα *Malassezia restricta* σε ασθενή με IPF, ο οποίος υποβλήθηκε σε διπλή μεταμόσχευση πνεύμονα το 2014. Τα είδη *Malassezia* παρόλο που ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος, φαίνεται πως μπορούν να αποτελέσουν ευκαιριακά παθογόνα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Mularoni et al., 2021). Από την άλλη, το γένος *Candida* και

ιδιαίτερα ο μικροοργανισμός *C. albicans* αποτελεί ένα από τα πιο κοινά ευκαιριακά παθογόνα στον άνθρωπο. Παρόλο που ανιχνεύεται πιο συχνά στην επιδερμίδα, τη γαστρεντερική και την ουρογεννητική οδό ως μέλος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας, παρουσία ειδών *Candida* έχει αναφερθεί και στο αναπνευστικό σύστημα υγιών αλλά και ατόμων που πάσχουν από αναπνευστικές νόσους (Pendleton et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη των Zarrinfar et al. (2015) ανιχνεύθηκαν με μοριακές μεθόδους, είδη *Candida* στα δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού 75 ασθενών με συμπτώματα πνευμονοπάθειας, ανοσοκατεσταλμένων και μη. Η πλειοψηφία των ευρημάτων αφορούσε το είδος *C. albicans* στους ανοσοεπαρκείς ασθενείς, ενώ ανιχνεύθηκαν συνολικά 6 επιπλέον είδη.

Οι Clarke et al. (2018) αναφέρουν περιορισμένο εμπλουτισμό του μυκηλιακού γένους *Aspergillus* σε δείγματα BAL σαρκοείδωσης. Στην παρούσα μελέτη, όμως, το γένος *Aspergillus* φαίνεται πως χαρακτηρίζει μόνο τα δείγματα IPF. Πριν από μερικά χρόνια αναφέρθηκε μια κλινική περίπτωση, στην οποία βρέθηκε συννοσηρότητα ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης με χρόνια νεκρωτική πνευμονική ασπεργίλλωση (Liu et al., 2019). Η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης ανάλογων περιστατικών, σε συνδυασμό με τη δυσκολία που χαρακτηρίζει τη διάγνωση αυτού του τύπου ασπεργίλλωσης, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή από τους κλινικούς ιατρούς, έτσι ώστε να γίνεται έγκαιρη χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας.

Συμπερασματικά, παρατηρείται διαφοροποίηση στη σύσταση της βακτηριακής κοινότητας μεταξύ ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και σαρκοείδωση. Παρά τη σαφή διαφοροποίηση, όμως, στην πλειοψηφία τους τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Για να αυξηθεί η αξιοπιστία και η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων θα πρέπει να αναλυθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, ασθενών και μάρτυρα. Η κοινότητα των μυκήτων βρέθηκε πως παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες μεταξύ των νόσων, ωστόσο και στη συγκεκριμένη περίπτωση απαιτούνται περισσότερα δείγματα, αλλά και ο αποκλεισμός άλλων πνευμονικών νόσων, καθώς τα δείγματα ελέγχου δεν προέρχονται από αποδεδειγμένα υγιείς εθελοντές.

Ο χαρακτηρισμός του πνευμονικού μικροβιώματος στις δύο αυτές διάμεσες πνευμονοπάθειες αποτελεί το πρώτο στάδιο σε μια διεπιστημονική προσπάθεια με στόχο να διαλευκανθεί ο ρόλος των μικροοργανισμών στην παθογένεση, να διασαφηνιστούν οι αλληλεπιδράσεις τους με τον ξενιστή και ενδεχομένως να αναπτυχθούν νέα διαγνωστικά εργαλεία και θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Βιβλιογραφία

1. Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson KH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AF, Tedersoo L, Ursing BM, Vrålstad T, Liimatainen K, Peintner U, Kõljalg U. The UNITE database for molecular identification of fungi--recent updates and future perspectives. *New Phytol.* 2010 Apr;186(2):281-5.
2. Actor, J., 2012. *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology*. 2nd ed.
3. Anderson MJ. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. American Cancer Society. 2017; pp 1–15
4. Arkema EV, Cozier YC. Epidemiology of sarcoidosis: current findings and future directions. *Ther Adv Chronic Dis.* 2018 Aug 24;9(11):227-240.
5. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio.* 2015 Mar 3;6(2):e00037.
6. Becker A, Vella G, Galata V, Rentz K, Beisswenger C, Herr C, Walter J, Tierling S, Slevogt H, Keller A, Bals R. The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study. *Respir Res.* 2019 Feb 28;20(1):46.
7. Brix S, Eriksen C, Larsen JM, Bisgaard H. Metagenomic heterogeneity explains dual immune effects of endotoxins. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Jan;135(1):277-80.
8. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016a Jul;13(7):581-3.
9. Callahan BJ, Sankaran K, Fukuyama JA, McMurdie PJ, Holmes SP. Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res.* 2016b Jun 24;5:1492.
10. Carney SM, Clemente JC, Cox MJ, Dickson RP, Huang YJ, Kitsios GD et al. Methods in lung microbiome research. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2020 Mar 1;62(3):283-299.
11. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Oct 15;184(8):957-63.
12. Clarke EL, Lauder AP, Hofstaedter CE, Hwang Y, Fitzgerald AS, Imai I, Biernat W, Rękawiecki B, Majewska H, Dubaniewicz A, Litzky LA, Feldman MD, Bittinger K, Rossman MD, Patterson KC, Bushman FD, Collman RG. Microbial lineages in sarcoidosis. A metagenomic analysis tailored for low-microbial content samples. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197(2):225–34.
13. Collard HR, Ryerson CJ, Corte TJ, Jenkins G, Kondoh Y, Lederer DJ, Lee JS, Maher TM, Wells AU, Antoniou KM, Behr J, Brown KK, Cottin V, Flaherty KR, Fukuoka J, Hansell DM, Johkoh T, Kaminski N, Kim DS, Kolb M, Lynch DA, Myers JL, Raghu G, Richeldi L, Taniguchi H, Martinez FJ. Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Group Report. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Aug 1;194(3):265-75
14. Collins Working AM, Rylance J, Wootton DG, Wright AD, Wright AK, Fullerton DG, Gordon SB. Bronchoalveolar lavage (BAL) for research; obtaining adequate sample yield. *J Vis Exp.* 2014 Mar 24;(85):4345.

15. Darlington P, Haugom-Olsen H, von Sivers K, Wahlström J, Runold M, Svjatoha V, Porwit A, Eklund A, Grunewald J. T-cell phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid, blood and lymph nodes in pulmonary sarcoidosis--indication for an airborne antigen as the triggering factor in sarcoidosis. *J Intern Med.* 2012 Nov;272(5):465-71.
16. de Mendiburu F (2020) *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*
17. de Steenhuijsen Piters WA, Sanders EA, Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Aug 19;370(1675):20140294.
18. Dickson RP, Erb-Downward JR, Falkowski NR, Hunter EM, Ashley SL, Huffnagle GB. The lung microbiota of healthy mice are highly variable, cluster by environment, and reflect variation in baseline lung innate immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198: 497–508.
19. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, Curtis JL. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Jun;12(6):821-30.
20. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Falkowski NR, Huffnagle GB, et al. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *MBio* 2017;8:e02287-16.
21. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309:L1047–L1055.
22. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med.* 2014 Mar;2(3):238-46.
23. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:481-504.
24. Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, et al. Analysis of culturedependent versus culture-independent techniques for identification of bacteria in clinically obtained bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:3605–13.
25. Dickson RP, Huffnagle GB, Flaherty KR, White ES, Martinez FJ, Erb-Downward JR, Moore BB, O'Dwyer DN. Radiographic Honeycombing and Altered Lung Microbiota in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Dec 15;200(12):1544-1547.
26. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet.* 2014 Aug 23;384(9944):691-702.
27. Dodt M, Roehr JT, Ahmed R, Dieterich C. FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology (Basel).* 2012 Dec 14;1(3):895-905.
28. Eishi Y. Etiologic aspect of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by *Propionibacterium acnes*. *Biomed Res Int.* 2013;2013:935289.
29. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, et al. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *Plos one.* 2011 Feb;6(2):e16384.
30. Esteves T, Aparicio G, Garcia-Patos V. Is there any association between Sarcoidosis and infectious agents?: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine.* 2016;16.

31. Franzen DP, Brutsche M, Nilsson J, Böni C, Daccorde C, Distlerf O, Elsener D, Funke-Chambour M, Gruner C, Hayward-Könnecke H, Hostettler KE, Kündig T, Ribi C, Seebach JD, Seeger H, Vrugt B, Kolios AGA. Sarcoidosis – a multisystem disease. *Swiss Medical Weekly*. 2022;151.
32. Garzoni C, Brugger SD, Qi W, Wasmer S, Cusini A, Dumont P, Gorgievski-Hrisoho M, Mühlemann K, von Garnier C, Hilty M. Microbial communities in the respiratory tract of patients with interstitial lung disease. *Thorax*. 2013 Dec;68(12):1150-6.
33. Glass DS, Grossfeld D, Renna HA, Agarwala P, Spiegler P, DeLeon J, Reiss AB. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment. *Clin Respir J*. 2022 Feb;16(2):84-96.
34. Han MK, Zhou Y, Murray S, Tayob N, Noth I, Lama VN, Moore BB, White ES, Flaherty KR, Huffnagle GB, Martinez FJ; COMET Investigators. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. *Lancet Respir Med*. 2014 Jul;2(7):548-56.
35. Hewitt RJ, Molyneaux PL. The respiratory microbiome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Annals of Translational Medicine*. 2017;5:250-250.
36. Hill, M., 1973. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology*, 54(2), pp.427-432.
37. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*. 2010 Jan 5;5(1):e8578.
38. Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol*. 2017 Mar;10(2):299-306.
39. Inaoka PT, Shono M, Kamada M, Espinoza JL. Host-microbe interactions in the pathogenesis and clinical course of sarcoidosis. *Journal of Biomedical Science*. 2019 Jun 11.
40. Invernizzi R, Barnett J, Rawal B, Nair A, Ghai P, Kingston S, Chua F, Wu Z, Wells AU, Renzoni ER, Nicholson AG, Rice A, Lloyd CM, Byrne AJ, Maher TM, Devaraj A, Molyneaux PL. Bacterial burden in the lower airways predicts disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis and is independent of radiological disease extent. *Eur Respir J*. 2020 Apr 3;55(4):1901519.
41. Invernizzi R, Wu BG, Barnett J, Ghai P, Kingston S, Hewitt RJ, Feary J, Li Y, Chua F, Wu Z, Wells AU, George PM, Renzoni EA, Nicholson AG, Rice A, Devaraj A, Segal LN, Byrne AJ, Maher TM, Lloyd CM, Molyneaux PL. The Respiratory Microbiome in Chronic Hypersensitivity Pneumonitis Is Distinct from That of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Feb 1;203(3):339-347.
42. Israels, A., 1984. Redundancy analysis for qualitative variables. *Psychometrika*, 49(3), pp.331-346.
43. Kaye, K. and Bonomo, R., 2020. *Goldman-Cecil Medicine, 2-volume Set*. 26th ed. Elsevier.
44. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & COTRAN pathologic basis of disease. Amsterdam: Elsevier; 2020.
45. Lahti L., Shetty S. microbiome R package. 2012
46. Larsen JM, Musavian HS, Butt TM, Ingvorsen C, Thysen AH, Brix S. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. *Immunology*. 2015 Feb;144(2):333-42.

47. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, et al. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *Plos one*. 2012 ;7(2):e31976.
48. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017 Aug;151(4):363-374.
49. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *Genealogical Treasury of Words. Scientist*. 2001;15(7):8.
50. Li Y, Wollnik B, Pabst S, Lennarz M, Rohmann E, Gillissen A, Vetter H, Grohé C. *BTNL2* gene variant and sarcoidosis. *Thorax*. 2006 Mar;61(3):273-4.
51. Lipinski JH, Moore BB, O'Dwyer DN. The evolving role of the lung microbiome in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020 Oct 1;319(4):L675-L682.
52. Liu C, Yang J, Lu Z. Idiopathic pulmonary fibrosis with chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a case report. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 Jul 1;12(7):2653-2656. PMID: 31934094;
53. Marsh RL, Kaestli M, Chang AB, Binks MJ, Pope CE, Hoffman LR, Smith-Vaughan HC. The microbiota in bronchoalveolar lavage from young children with chronic lung disease includes taxa present in both the oropharynx and nasopharynx. *Microbiome*. 2016 Jul 7;4(1):37.
54. Martinez Arbizu, P. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4. 2020
55. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, Swigris JJ, Taniguchi H, Wells AU. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Oct 20;3:17074.
56. McLaren MR. Silva SSU taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138). 2020
57. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? *Eur Respir J*. 2011 Oct;38(4):761-9.
58. Molyneaux PL, Cox MJ, Wells AU, Kim HC, Ji W, Cookson WO, Moffatt MF, Kim DS, Maher TM. Changes in the respiratory microbiome during acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2017 Feb 1;18(1):29.
59. Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, Mallia P, Russell KE, Russell AM, Murphy E, Johnston SL, Schwartz DA, Wells AU, Cookson WO, Maher TM, Moffatt MF. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Oct 15;190(8):906-13.
60. Molyneaux PL, James P, Cookson W, Moffatt M, Maher T. The Role of the Fungal Microbiome in IPF. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2016;.
61. Mori Y, Kondoh Y. What parameters can be used to identify early idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Investig*. 2021 Jan;59(1):53-65.
62. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, Flores SC, Fontenot AP, Ghedin E, Huang L, Jablonski K, Kleerup E, Lynch SV, Sodergren E, Twigg H, Young VB, Bassis CM, Venkataraman A, Schmidt TM, Weinstock GM; Lung HIV Microbiome Project. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 May 15;187(10):1067-75.
63. Mularoni, A., Graziano, E., Medaglia, A., Buscemi, B., Eddens, T., Martino, L., Di Carlo, D., Cascio, A., Conaldi, P., Bertani, A. and Grossi, P., 2021. *Malassezia restricta* Pneumonia in

- Solid Organ Transplant Recipients: First Report of Two Cases. *Journal of Fungi*, 7(12), p.1057.
64. Nielsen R, Xue Y, Jonassen I, Haaland I, Kommedal Ø, Wiker HG, Drengenes C, Bakke PS, Eagan TML. Repeated bronchoscopy in health and obstructive lung disease: is the airway microbiome stable? *BMC Pulm Med*. 2021 Nov 2;21(1):342.
 65. Noth I, Zhang Y, Ma S-F, Flores C, Barber M, Huang Y, Broderick SM, Wade MS, Hysi P, Scurba J, Richards TJ, Juan-Guardela BM, Vij R, Han MK, Martinez FJ, Kossen K, Seiwert SD, Christie JD, Nicolae D, Kaminski N, Garcia JG. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2013;1:309-317.
 66. O'Dwyer DN, Ashley SL, Gurczynski SJ, Xia M, Wilke C, Falkowski NR, Norman KC, Arnold KB, Huffnagle GB, Salisbury ML, Han MK, Flaherty KR, White ES, Martinez FJ, Erb-Downward JR, Murray S, Moore BB, Dickson RP. Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 May 1;199(9):1127-1138.
 67. Oksanen J, Blanchet GF, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H (2019) *Vegan: Community Ecology Package*
 68. Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE, Ma SF, Garcia JG, Richards TJ, Silveira LJ, Lindell KO, Steele MP, Loyd JE, Gibson KF, Seibold MA, Brown KK, Talbert JL, Markin C, Kossen K, Seiwert SD, Murphy E, Noth I, Schwarz MI, Kaminski N, Schwartz DA. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA*. 2013 Jun 5;309(21):2232-9
 69. Pendleton KM, Huffnagle GB, Dickson RP. The significance of *Candida* in the human respiratory tract: our evolving understanding. *Pathog Dis*. 2017 Apr 1;75(3):ftx029.
 70. Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, Giordo R, Eid AH, Fois AG, Zinellu A, Mangoni AA, Pintus G. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Mar;78(5):2031-2057.
 71. Pielou, E., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, pp.131-144.
 72. R Core Team (2020) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
 73. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2017 May 13;389(10082):1941-1952.
 74. Richter AG, Stockley RA, Harper L, Thickett DR. Pulmonary infection in Wegener granulomatosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2009 Aug;64(8):692-7.
 75. Rivera NV, Ronninger M, Shchetynsky K, Franke A, Nöthen MM, Müller-Quernheim J, Schreiber S, Adrianto I, Karakaya B, van Moorsel CH, Navratilova Z, Kolek V, Rybicki BA, Iannuzzi MC, Petrek M, Grutters JC, Montgomery C, Fischer A, Eklund A, Padyukov L, Grunewald J. High-Density Genetic Mapping Identifies New Susceptibility Variants in Sarcoidosis Phenotypes and Shows Genomic-driven Phenotypic Differences. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 May 1;193(9):1008-22.

76. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014;505: 412–416.
77. Savarino E, Carbone R, Marabotto E, Furnari M, Sconfienza L, Ghio M, Zentilin P, Savarino V. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2013 Nov;42(5):1322-31.
78. Scher JU, Joshua V, Artacho A, Abdollahi-Roodsaz S, Öckinger J, Kullberg S, Sköld M, Eklund A, Grunewald J, Clemente JC, Ubeda C, Segal LN, Catrina AI. The lung microbiota in early rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Microbiome*. 2016 Nov 17;4(1):60.
79. Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, Chen H, Berger KI, Goldring RM, Rom WN, Blaser MJ, Weiden MD. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013 Jul 1;1(1):19.
80. Segal LN, Clemente JC, Tsay JC, Koralov SB, Keller BC, Wu BG, Li Y, Shen N, Ghedin E, Morris A, Diaz P, Huang L, Wikoff WR, Ubeda C, Artacho A, Rom WN, Serman DH, Collman RG, Blaser MJ, Weiden MD. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol*. 2016 Apr 4;1:16031.
81. Sorino C. Diagnostic Evaluation of the Respiratory System. JP Medical Ltd; 2017.
82. Spagnolo P, Rossi G, Trisolini R, Sverzellati N, Baughman RP, Wells AU. Pulmonary sarcoidosis. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2018;6:389-402.
83. Spellerberg, I. and Fedor, P., 2003. A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon-Wiener’ Index. *Global Ecology and Biogeography*, 12(3), pp.177-179.
84. Takahashi Y, Saito A, Chiba H, Kuronuma K, Ikeda K, Kobayashi T, Arika S, Takahashi M, Sasaki Y, Takahashi H. Impaired diversity of the lung microbiome predicts progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2018 Feb 27;19(1):34.
85. Ten Berge B, Paats MS, Bergen IM, van den Blink B, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Hendriks RW, Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Jan;51(1):37-46.
86. ter Braak, C. and Verdonschot, P., 1995. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences*, 57(3), pp.255-289.
87. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):804-10.
88. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, Schmidt TM. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *mBio*. 2015 Jan 20;6(1):e02284-14.
89. Weng D, Chen XQ, Qiu H, et al. The role of infection in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Mediators Inflamm* 2019; 2019: 5160694
90. Whiteside SA, McGinniss JE, Collman RG. The lung microbiome: progress and promise. *J Clin Invest*. 2021 Aug 2;131(15):e150473.
91. Winter SE, Bäumlér AJ. Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut Microbes*. 2014 Jan-Feb;5(1):71-3.

92. Wright M., 2004. Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO. By Jan Lepš and Petr Šmilauer. Cambridge and New York: Cambridge University Press. *The Quarterly Review of Biology*, 79(2), pp.222-223.
93. Wu JJ, Schiff KR. Sarcoidosis. *Am Fam Physician*. 2004 Jul 15;70(2):312-22.
94. Zander, D. and Farver, C., 2008. *Pulmonary Pathology*. London: Elsevier Health Sciences.
95. Zarrinfar H, Kaboli S, Dolatabadi S, Mohammadi R. Rapid detection of *Candida* species in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary symptoms. *Braz J Microbiol*. 2016 Jan-Mar;47(1):172-6.
96. Zhang Y, Noth I, Garcia JG, Kaminski N. A variant in the promoter of MUC5B and idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21;364(16):1576-7.
97. Zimmermann A, Knecht H, Häsler R, et al. *Atopobium* and *Fusobacterium* as novel candidates for sarcoidosis-associated microbiota. *Eur Respir J* 2017; 50: 1600746.