
TEZĂ DE DOCTORAT (REZUMAT)

Rolul biofilmelor microbiene în dezvoltarea inflamației din rinosinuzita cronică

Doctorand **Alina-Gabriela Ilieș (Duțu)**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Silviu Albu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Biofilmele microbiene	17
1. 1. Formarea biofilmelor	17
1.2. Proprietățile biofilmelor	18
1.2.1. Comunicarea bacteriană în biofilm	18
1.2.2. Rezistența la antibiotice	19
1. 3. Detectarea biofilmelor	20
1. 4. Biofilmele și bolile cronice	20
2. Rinosinuzita cronică – boală inflamatorie multifactorială	23
2. 1. Generalități	23
2. 2. Impactul psihosocial al rinosinuzitei cronice	24
2. 3. Mecanisme fiziopatogenetice în rinosinuzita cronică	25
2.3.1. Factori exogeni în rinosinuzita cronică	25
2.3.2. Factori endogeni în rinosinuzita cronică	29
2.3.3. Remodelarea	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	37
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Studiul 1. Relația dintre biofilmele microbiene și modificările inflamatorii tisulare în rinosinuzita cronică	41
2.1. Introducere	41
2.2. Obiective	42
2.3. Material și metodă	42
2.4. Rezultate	43
2.5. Discuții	47

2.6. Concluzii	50
3. Studiul 2. Chitotriozidaza - un potențial biomarker al sindromului inflamator din RSC	51
3.1. Introducere	51
3.2. Obiective	52
3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate	53
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	66
4. Studiul 3. Răsunetul sistemic al stresului oxidativ din rinosinuzita cronică	69
4.1. Introducere	69
4.2. Obiective	70
4.3. Material și metodă	70
4.4. Rezultate	72
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	78
5. Studiul 4. Semnificația vitaminei D în rinosinuzita cronică	81
5.1. Introducere	81
5.2. Obiective	82
5.3. Material și metodă	82
5.4. Rezultate	83
5.5. Discuții	94
5.6. Concluzii	95
6. Concluzii generale	97
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: biofilme microbiene, rinosinuzita cronică, chitotriozidaza, ceruloplasmina, vitamina D

INTRODUCERE

Definită ca o inflamație persistentă a mucoasei rinosinusale, cu o durată mai mare de 12 săptămâni și asociată cu o simptomatologie deranjantă, rinosinuzita cronică este o afecțiune cu o prevalență crescătoare, care determină o reducere semnificativă a calității vieții pacienților. De asemenea, impactul socio-economic este important prin numărul ridicat al prezentărilor la medic, prin recurențele apărute la un procent semnificativ de pacienți și prin costurile indirecte ale reducerii randamentului în muncă.

Rinosinuzita cronică este o maladie inflamatorie multifactorială cu o fiziopatologie complexă, datorată interacțiunii factorilor din mediul exterior (bacterii, virusuri, funghi, iritanți inhalatori) cu organismul condiționat de factori endogeni (variații anatomice, natura barierei epiteliale, imunitatea înăscută, imunitatea dobândită, eventuala asociere a unor boli genetice). Mecanismele care determină producerea și menținerea inflamației rinosinusale au fost intens studiate, dar complexitatea interacțiunilor și multitudinea moleculelor implicate oferă permanent noi teme de studiu, care ar putea deveni parte a unei strategii terapeutice sau de îmbunătățire a calității vieții pacienților.

Biofilmele bacteriene sunt implicate în patogeneza și evoluția rinosinuzitei cronice, cu precădere în formele refractare la tratament. Astfel, prezența biofilmelor poate reprezenta un element de prognostic defavorabil în evoluția bolii. Cu toate acestea, relația causală dintre biofilmele bacteriene și inflamația mucoasei rinosinusale este incomplet elucidată, nefiind stabilit cu certitudine dacă biofilmele amplifică inflamația locală sau dacă, dimpotrivă, inflamația mucoasei favorizează dezvoltarea biofilmelor, prin amplificarea aderenței microorganismelor la suprafața acesteia. Studiul acestui aspect a vizat evaluarea relației dintre prezența biofilmelor și infiltratul inflamator la pacienții cu rinosinuzită cronică, precum și analiza impactului comorbidităților asupra prezenței eventuale a biofilmelor, ambele elemente reprezentând factori de prognostic defavorabil.

Deși există diverse resurse terapeutice, pentru obținerea unor rezultate cât mai bune se impune necesitatea terapiei individualizate, cu atât mai mult pentru pacienții cu risc de recidivă. Ținând cont de heterogenitatea rinosinuzitei și de răspunsurile diferite ale pacienților la tratament, am considerat că explorarea unor potențiali biomarkeri pentru inflamație poate fi un demers util, prin identificarea unor parametri care ar putea fi folosiți ulterior ca indicatori în terapie și prognostic.

În această lucrare am investigat sindromul inflamator din rinosinuzita cronică din perspectiva evaluării chitotriozidazei ca marker biologic al acumulării și activării macrofagelor. De asemenea, am studiat răsunetul sistemic al unor mediatori ai inflamației mucoasei rinosinusale, cercetând modificările ceruloplasminei, ca element de protecție împotriva stresului oxidativ.

Lucrarea a abordat și potențiale aspecte de terapie adjuvantă, în sensul evaluării relației dintre vitamina D și biofilmele microbiene în rinosinuzita cronică.

CONTRIBUȚIA PERSONALA

Studiul 1. Relația dintre biofilmele microbiene și modificările inflamatorii tisulare în rinosinuzita cronică

Obiective

În acest studiu ne-am propus să investigăm existența unei relații între prezența biofilmelor și tipul de infiltrat inflamator la pacienții cu RSC, ținând cont de faptul că aceste elemente pot fi considerate factori de prognostic defavorabil.

Material și metodă

Am realizat un studiu comparativ, care a inclus 50 de pacienți diagnosticați cu RSC conform criteriilor EPOS 2012 (European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps) care au avut rezultate nesatisfăcătoare la tratamentele anterioare.

Acest studiu a fost aprobat de către Comisia de etică a UMF „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, pacienții si-au oferit acordul cu privire la participarea informată la acest studiu. Pacienții au fost investigați în perioada 2016-2017 în Spitalul Clinic Universitar CF Cluj-Napoca.

Includerea în studiu s-a făcut pe baza următoarelor criterii:

-diagnostic de RSC confirmat pe baza examenului clinic și a istoricului bolii, a endoscopiei nazale și/sau a investigării imagistice prin tomografie computerizată craniană,

-pacienți cu rezultate nesatisfăcătoare după tratamentul medicamentos administrat anterior.

Criteriile de excludere au fost următoarele:

-pacienți cu vârsta sub 18 ani,
-pacienți imunocompromiși,
-pacienți care au utilizat tratamente cu antibiotice sau corticosteroizi în mai puțin de 3 săptămâni înainte de investigații.

Prin endoscopie nazală s-a confirmat prezența sau absența polipilor nazali, iar din fișele medicale ale pacienților au fost colectate date despre tratamentele anterioare, despre alte intervenții chirurgicale, precum și despre eventuale comorbidități (alergii, astm bronșic).

De la fiecare pacient au fost recoltate sub control endoscopic, fragmente din mucoasa afectată inflamator de la nivelul sinusului etmoidal și al meatului mijlociu.

Am utilizat colorațiile Gram și Hematoxilină-Eozină (HE) pentru punerea în evidență a colonizării bacteriene. Prezența biofilmelor a fost confirmată utilizând colorația Toluidine Blue cu care s-a evidențiat stratul polizaharidic bacterian, caracteristic biofilmelor. Fragmentele tisulare utilizate pentru evaluarea biofilmelor au fost prelucrate la Laboratorul de Patologie, Diagnostic Necropsic și Medicină Legală a USAMV Cluj-Napoca conform referințelor. Fragmentele tisulare obținute au fost imersate în formalină 10% imediat după recoltare, pentru fixare 48-72h, apoi au fost deshidratate, clarificate și introduse în parafină. Secțiunile obținute după tăierea blocurilor de parafină au fost colorate cu Hematoxilină-Eozină și Toluidine Blue. S-a utilizat aparatura Olympus pentru examinarea probelor (microscop Olympus BX41), pentru obținerea și procesarea imaginilor (camera digitală Olympus UC30 și program Olympus Stream Image Analysis). Prin colorația HE au fost evidențiate celulele

inflamatorii (eozinofile, neutrofile, limfocite). Infiltratul inflamator a fost evaluat ca „abundent”, „moderat” sau „reduș”.

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului IBM SPSS 25.0 (IBM, USA).

Rezultate

În urma evaluării histopatologice, biofilmele bacteriene au fost identificate prin colorație cu HE și Toluidine Blue la un număr de 34 de pacienți (68%). Infiltratul inflamator a fost considerat abundent la 24 de pacienți, iar moderat și redus la 26 de pacienți.

S-a constatat că frecvența de apariție a inflamației abundente este semnificativ mai mare la pacienții cu biofilme decât la cei fără biofilme $OR=12,833[2,489-66,163]$, $p=0,001$. Biofilmele microbiene nu s-au corelat cu un anumit tip de infiltrat inflamator, preponderent eozinofilic sau limfocitar/neutrofilic.

Prezența polipilor nazali a fost corelată semnificativ cu biofilmele microbiene, comparativ cu pacienții fără polipi nazali la care frecvența de apariție a biofilmelor a fost mai redusă $OR=4,500[1,052-19,252]$, $p=0,044$.

Identificarea biofilmelor la pacienții cu RSC și comorbidități a arătat o șansă semnificativ mai mare de dezvoltare a biofilmelor la pacienții cu RSC și astm bronșic, respectiv alergii $OR=7,875[1,547-40,091]$, $p=0,006$.

Concluzii

Prezența biofilmelor microbiene a fost semnificativ asociată cu un infiltrat inflamator abundent la pacienții incluși în studiul nostru, asociere care poate determina agravarea bolii. De asemenea, prezența biofilmelor a fost evidențiată la pacienții cu polipi nazali, precum și la pacienții cu comorbidități asociate, subgrupuri cunoscute cu risc de recidivă. În lumina acestor constatări, am putea considera oportună solicitarea specialistilor ORL privind identificarea biofilmelor la examinarea histopatologică, în scopul unei terapii personalizate și a diminuării riscului de recidivă.

Studiul 2. Chitotriozidaza - un potențial biomarker al sindromului inflamator din RSC

Obiective

Investigarea sindromului inflamator din RSC poate oferi o mai bună înțelegere a patogenzei acestei maladii, iar identificarea unui biomarker adecvat rămâne în continuare un obiectiv important și pentru îmbunătățirea monitorizării pacienților. Dozarea CHT ca marker biologic al acumulării și activării macrofagelor s-a impus ca o abordare modernă în managementul unor boli genetice, autoimune, inflamatorii sau degenerative. În acest context, ne-am propus analiza evaluarea activității serice a chitotriozidazei urmărind variațiile acesteia în funcție de fenotipul rinosinuzitei și în funcție de prezența biofilmelor microbiene

Material și metodă

Studiul s-a desfășurat în urma aprobării primite de la Comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie ”Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca și s-a desfășurat în perioada 2016-2017 în Spitalul Clinic Universitar CF Cluj-Napoca, pacienții au semnat consimțământul informat.

Am realizat un studiu clinic prospectiv, randomizat, de tip caz-martor care a inclus 16 pacienți diagnosticați cu RSC și un grup de control format din 21 de subiecți nefumători, investigați pentru deviație de sept nazal, fără alte boli asociate cunoscute.

Criteriile de includere sunt similare celor din studiul 1: pacienți diagnosticați cu RSC în urma examenului clinic, cu confirmare prin endoscopie nazală și/sau evaluare imagistică prin CT cranian, fără alte boli inflamatorii cunoscute, pacienți la care tratamentul medicamentos anterior a avut rezultate nesatisfăcătoare. Criteriile de excludere au fost similare celor din studiul 1: vârsta sub 18 ani, fumători, pacienți imunocompromiși, administrarea de antibiotice sau corticoizi cu 3 săptămâni înaintea internării.

Analiza biochimică

Probele de sânge au fost prelevate înainte de intervenția chirurgicală pentru analize de rutină. După coagulare, probele de sânge au fost centrifugate pentru separarea serului, care a fost congelat imediat la -80°C .

Pentru dozarea chitotriozidazei circulante am utilizat serul recoltat de la pacienții diagnosticați cu RSC și de la grupul de control. Pentru măsurarea activității enzimatică am utilizat o metodă fluorimetrică, bazată pe utilizarea unui analog de substrat (4-Methylumbelliferyl beta-D-N,N',N''-triacetylchitotrioside). Pentru trasarea curbei de etalonare am utilizat un compus fluorescent (4-Methylumbelliferone), folosind o serie de standarde de concentrații crescătoare (0, 5, 10, 20, 40, 80 nmol/L).

Măsurarea fluorescenței eliberate a permis determinarea activității enzimatică, exprimată în nmol/mL ser/h. Practic, am utilizat 5 μL de ser și 100 μL de substrat 0,022 M în tampon citrat-fosfat 0,1 M, pH 5,2. După o incubare de 15 minute la 37°C , reacția a fost oprită prin adăugarea unei soluții de glicină 0,3 M, pH 10,6. Fluorescența a fost citită la fluorimetrul BioRad (excitație 366 nm, emisie 446 nm) (142).

Un pacient și 2 probe de control care au avut valori nedectabile ale activității enzimatică, probabil datorită unei alele homozigote(216), au fost excluse din analiza activității enzimatică.

Analiza histopatologică

Sub control endoscopic, de la fiecare pacient s-au recoltat fragmente de mucoasă sinusală afectată inflamator, de la nivelul meatului mijlociu și sinusului etmoidal. Fragmentul tisular a fost utilizat pentru evaluarea prezenței biofilmelor microbiene. Prepararea și examinarea probelor s-au realizat în mod similar ca și în studiul 1. Am utilizat colorațiile Gram și Hematoxilină-Eozină (HE) pentru punerea în evidență a colonizării bacteriene. Prezența biofilmelor a fost confirmată utilizând colorația Toluidine Blue cu care s-a evidențiat stratul polizaharidic bacterian, caracteristic biofilmelor (63)(217)(186).

Rezultate

Valorile CHT au arătat o diferență semnificativă statistic între grupul de pacienți și lotul martor. Valorile activității serice a chitotriozidazei nu au avut o distribuție normală, folosind testul Shapiro-Wilk am obținut $p=0,020$ pentru CHT.S-au constatat diferențe semnificativ statistice în distribuția valorilor CHT între pacienți și grupul de control. Valorile CHT au fost cuprinse între 80 și 460 nmol/mL/h, cu mediana și intervalul inter-cvartilic de 230 (150-280) nmol/mL/h pentru lotul de pacienți și respectiv 130 (100-180) nmol/mL/h pentru lotul martor, constatându-se o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între cele două loturi ($p = 0,030$, testul Mann-Whitney-U).

La pacienții cu RSC, valorile CHT nu au prezentat diferențe semnificative în funcție de prezența sau absența polipilor nazali. De asemenea, nici comorbiditățile asociate de tipul alergiilor sau astmul bronșic nu au indus diferențe semnificative ale activității enzimatică între subgrupurile de pacienți.

Pacienții cu biofilme microbiene prezente nu au prezentat valori ale CHT semnificative față de subgrupul pacienților fără biofilme, deși valorile înregistrate la pacienții cu biofilme au fost mai mari decât la cei fără biofilme.

Evaluarea capacității de diferențiere a CHT ca marker al inflamației s-a realizat pe baza analizei curbei ROC. Aceasta a relevat o valoare a ariei de sub curbă de 0,7143 (0,5436-0,8850), semnificând o bună capacitate de diferențiere a CHT între grupul de pacienți și grupul de control.

Concluzii

Studiul nostru a arătat că activitatea chitotriozidazei serice, ca marker de activare a macrofagelor, a fost semnificativ crescută la pacienții cu rinosinuzită cronică, comparativ cu lotul martor. Am constatat că activitatea chitotriozidazei serice nu a fost influențată de covariabilele investigate, iar rezultatele curbei ROC indică posibilitatea utilizării chitotriozidazei ca biomarker de diferențiere corectă între pacienții cu rinosinuzită cronică și grupul de control.

Valorile chitotriozidazei serice au fost mai mari la pacienții cu rinosinuzită cronică și biofilme, comparativ cu cei fără biofilme, chiar dacă diferențele nu au atins pragul semnificației statistice, probabil datorită unui grad mai accentuat de inflamație asociat dezvoltării biofilmelor.

Studiul 3. Răsunetul sistemic al stresului oxidativ din rinosinuzita cronică

Obiective

Până în prezent, există puține studii care să evalueze modificările ceruloplasminei la pacienții cu RSC. Pornind de la premisa că biofilmele microbiene se asociază cu o inflamație semnificativă a mucoasei rinosinusale, iar această inflamație poate accentua eliberarea de SRO, ne-am propus să evaluăm modificările stresului oxidativ la pacienții cu RSC. În această lucrare am investigat rolul ceruloplasminei, ca mecanism antioxidant la pacienții cu RSC, în ideea de a studia răsunetul sistemic al stresului oxidativ de la nivel local utilizând un biomarker ușor de măsurat cu metode automatizate. În acest sens am efectuat următoarele determinări: catalaza, ceruloplasmina, malondialdehida. Am studiat nivelul acestor parametrii cu scopul de a evidenția eventualele modificări cauzate de stresul oxidativ la pacienții cu RSC.

Material și metodă

Am realizat un studiu caz-martor, care a fost aprobat de comisia de etică a universității noastre, în care au fost incluși pacienți cu RSC investigați în Spitalul Clinic Universitar CF în 2017. Pacienții și-au exprimat acordul de a participa la acest studiu, prin consimțământ informat.

În studiu au fost incluși un număr de 21 de pacienți care au fost diagnosticați cu RSC pe baza criteriilor EPOS. Lotul martor a cuprins 7 pacienți care au fost investigați pentru deviație de sept nazal.

Criteriile de includere au fost următoarele: pacienți cu vârsta peste 18 ani diagnosticați cu RSC pe baza examenului clinic, a istoricului bolii și endoscopie nazală și /sau investigare imagistică prin tomografie computerizată craniană, absența altor boli inflamatorii cunoscute, fără utilizare de suplimente alimentare cu efect antioxidant.

Criteriile de excludere au fost următoarele: vârsta sub 18 ani, pacienți imunocompromiși, prezența unor boli inflamatorii cunoscute, a unor boli hepatice, enteropatii, boli renale, diabet zaharat, boli oncologice, infecții acute recente, utilizare de suplimente alimentare cu efect antioxidant.

Rezultate

Am verificat normalitatea distribuției datelor folosind testul Shapiro-Wilk și am constatat că datele sunt normal distribuite (testul Shapiro-Wilk a avut probabilitatea $p > 0,05$).

Deoarece la compararea valorilor ceruloplasminei între loturi, testul Levene de egalitate a varianțelor a avut probabilitatea de 0,968, se poate considera că varianțele nu diferă statistic semnificativ și se poate utiliza pentru comparația mediilor testul Student pentru varianțe egale. Probabilitatea acestuia a fost de 0,568 și prin aceasta am arătat că nu există diferențe statistic semnificative între valorile CP între cele două loturi.

Evaluarea valorilor catalazei nu a arătat diferențe semnificative între grupul de pacienți și martori (testul Student pentru varianțe egale $p=0,824$).

Deoarece la compararea MDA între loturi testul Levene de egalitate a varianțelor a avut probabilitatea de 0,713 se poate considera că varianțele nu diferă statistic semnificativ. Utilizând testul Student pentru varianțe egale ($p=0,532$), am constatat că nu există diferențe statistic semnificative între valorile MDA între grupul de pacienți și grupul de control.

Concluzii

La pacienții incluși în studiu, evaluarea balanței O/AO nu a relevat diferențe semnificative față de lotul martor, valorile ceruloplasminei, ca antioxidant și ale malondialdehidei, ca rezultat al produșilor de oxidare, nefiind diferite între cele două loturi.

Studiul 4. Semnificația vitaminei D în rinosinuzita cronică

Obiective

Acest studiu a urmărit evaluarea nivelului seric al vitaminei D (25-OH-D3), ca potențial biomarker asociat inflamației și variațiile acesteia în funcție de prezența biofilmelor microbiene.

Material și metodă

Studiul a fost efectuat în urma aprobării primite de la Comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca și s-a desfășurat în perioada 2016-2017 în Spitalul Clinic Universitar CF Cluj-Napoca, pacienții au semnat consimțământul informat.

Am realizat un studiu clinic prospectiv, randomizat, de tip caz-martor în care a inclus 16 pacienți diagnosticați cu RSC și un grup de control format din 21 de subiecți nefumători, investigați pentru deviație de sept nazal, fără alte boli asociate cunoscute.

Criteriile de includere au fost: pacienți diagnosticați cu RSC pe baza istoricului bolii, a evaluării imagistice prin CT cranian și endoscopie nazală, fără alte boli inflamatorii cunoscute, pacienți la care tratamentul medicamentos administrat optimal nu s-a dovedit a fi eficient. Criteriile de excludere au fost: vârsta sub 18 ani, pacienți imunocompromiși, administrarea de antibiotice sau corticoizi cu 3 săptămâni înaintea internării, tratamente cu suplimente de Vitamina D.

Analiza histopatologică

Sub control endoscopic, de la fiecare pacient s-au recoltat fragmente de mucoasă sinusală afectată inflamator, de la nivelul meatului mijlociu și sinusului etmoidal. Fragmentul tisular a fost utilizat pentru evaluarea prezenței biofilmelor microbiene. Prepararea și examinarea probelor s-au realizat în mod similar ca și în studiul 2. Am utilizat colorațiile Gram și Hematoxilină-Eozină (HE) pentru punerea în evidență a colonizării bacteriene. Prezența biofilmelor a fost confirmată utilizând colorația Toluidine Blue cu care s-a evidențiat stratul polizaharidic bacterian, caracteristic biofilmelor.

Analiza biochimică

Probele de sânge au fost prelevate înainte de intervenția chirurgicală pentru analize de rutină. Serul obținut după coagulare și centrifugare, a fost depozitat la congelator la -20°C .

Valorile 25-OH-D3 au fost măsurate folosind metoda imunoenzimatică (ELISA), conform indicațiilor de la producător (DiaMetra S.r.l.Headquarter, Italy). Pentru această metodă, au fost definite ca "insuficiență" valori sub 30ng/ml și "deficiență" concentrații obținute mai mici decât 10ng/ml.

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului IBM SPSS versiunea 25.0 (IBM, USA). Folosind testul Shapiro-Wilk am constatat că variabilele cantitative nu au avut o distribuție normală, astfel că pentru evaluare s-a folosit testul Mann-Whiney U. Valorile p mai mici decât 0.05 au fost considerate semnificative.

Rezultate

Valorile concentrațiilor serice ale 25-OH-D3, cuprinse între 4 și 37,1ng/ml, cu mediana și intervalul inter-cvartilic de 22,7 (16,70 -28,3) ng/ml pentru lotul de pacienți și respectiv 43,5 (32,20-64,20) ng/mL pentru lotul martor, nu au avut o distribuție normală, la testul Shapiro-Wilk am obținut $p<0,001$.

S-au constatat diferențe semnificative statistic în distribuția valorilor 25-OH-D3 între pacienți și grupul de control (Mann-Whitney U test $p=0.001$).

Am analizat valorile vitaminei D în grupul de pacienți constatând că nu sunt diferențe semnificative între subgrupul de pacienți cu polipi nazali și fără polipi nazali, testul Mann-Whitney-Wilcoxon are $p=0,236$.

Am verificat potențiala dependență a valorilor 25-OH-D3 în funcție de prezența biofilmelor microbiene pe mucoasa sinusală (Mann-Whitney U test $p=0.054$) sau în funcție de comorbidități asociate precum astmul bronșic (Mann-Whitney U test $p=0.603$), fără ca aceste aspecte să releve diferențe semnificativ statistice.

Am constatat că pacienții cu biofilme au avut valori mai reduse ale 25-OH-D3 comparativ cu cei fără biofilme (mediana și IQR au fost 23.45 (14.40-29.30) ng/ml versus 32.20 (27.90-45.60) ng/mL, respectiv), însă fără diferență statistică.

Analiza ROC a fost utilizată pentru a investiga capacitatea de diferențiere a 25-OH-D3 ca parametru biochimic asociat inflamației din rinosinuzita cronică. Valoarea

ariei de sub curbă a fost 0.8286 [0.6912 – 0.9660], semnificând o bună capacitate de diferențiere a 25-OH-D3 între grupul de pacienți și grupul de control.

Concluzii

Pacienții cu rinosinuzită cronică au prezentat valori ale vitaminei D mai scăzute decât grupul de control. Analiza curbei ROC a arătat că vitamina D poate fi un parametru de diferențiere corectă a pacienților cu rinosinuzită cronică față de grupul de control. Vitamina D a avut valori mai scăzute la subgrupurile de pacienți cu rinosinuzită cronică asociată cu polipi nazali sau biofilme bacteriene, comparativ cu pacienții fără polipi nazali sau la care nu s-au identificat biofilme, deși aceste diferențe nu fost semnificative din punct de vedere statistic.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Prin rezultatele obținute, fiecare dintre capitolele acestei lucrări, constituindu-se în studii pilot, a adus informații suplimentare în privința patogeniei rinosinuzitei cronice, dar mai ales a deschis drumul unor noi provocări, care ar putea fi aprofundate prin cercetări ulterioare.

Astfel, asocierea semnificativă a biofilmelor microbiene cu un infiltrat inflamator abundent, reprezentând elemente de prognostic defavorabil pentru RSC, poate constitui o sugestie pentru clinicieni de a solicita identificarea prezenței biofilmelor la examenul histopatologic, în scopul unei terapii și monitorizări personalizate.

Potrivit rezultatelor noastre, chitotriozidaza reprezintă un marker neinvaziv al sindromului inflamator, prin capacitatea sa de a diferenția corect pacienții cu RSC de grupul de control. Chitotriozidaza ar putea deveni un parametru util și accesibil, la îndemâna clinicienilor, iar datele noastre au arătat ca dozarea acestei enzime s-a dovedit importantă în evaluarea sindromului inflamator, implicat atât în patogeneza, cât și în prognosticul evolutiv al acestei afecțiuni.

Vitamina D a fost semnificativ diminuată la pacienții cu RSC față de martori, relevând o capacitate de diferențiere corectă între cele două grupuri, ceea ce poate aduce în discuție utilizarea terapiei adjuvante cu suplimente de vitamina D, în baza efectelor sale imunomodulatoare.

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

The role of the microbial biofilms in developement of inflammation in chronic rhinosinusitis

PhD Student **Alina-Gabriela Ilieș (Duțu)**

PhD Supervisor **Prof. Dr. Silviu Albu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Microbial biofilms	17
1. 1. Biofilm formation	17
1.2. Properties of biofilms	18
1.2.1. Bacterial communication in biofilm	18
1.2.2. Antibiotic resistance	19
1. 3. Detection of biofilms	20
1. 4. Biofilms and chronic diseases	20
2. Chronic rhinosinusitis - multifactorial inflammatory disease	23
2. 1. General aspects	23
2. 2. The psychosocial impact of chronic rhinosinusitis	24
2. 3. Pathophysiogenetic mechanisms in chronic rhinosinusitis	25
2.3.1. Exogenous factors in chronic rhinosinusitis	25
2.3.2. Endogenous factors in chronic rhinosinusitis	29
2.3.2. Remodeling	34
PERSONAL CONTRIBUTION	37
1. Working hypothesis	39
2. Study 1. The relationship between microbial biofilms and tissue inflammatory changes in chronic rhinosinusitis	41
2.1. Introduction	41
2.2. Working hypothesis	42
2.3. Material and method	42

2.4. Results	43
2.5. Discussion	47
2.6. Conclusions	50
3. Study 2. Chitotriosidase - a potential biomarker of the inflammatory syndrome in chronic rhinosinusitis	51
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis	52
3.3. Material and method	52
3.4. Results	53
3.5. Discussion	66
3.6. Conclusions	67
4. Study 3. Systemic resonance of oxidative stress in chronic rhinosinusitis	69
4.1. Introduction	69
4.2. Working hypothesis	70
4.3. Material and method	70
4.4. Results	72
4.5. Discussion	76
4.6. Conclusions	78
5. Study 4. Significance of vitamin D in chronic rhinosinusitis	81
5.1. Introduction	81
5.2. Working hypothesis	82
5.3. Material and method	82
5.4. Results	83
5.5. Discussion	94
5.6. Conclusions	95
6. General conclusions	97
7. Originality and innovative contributions	99
REFERENCES	101

Keywords: microbial biofilms, chronic rhinosinusitis, chitotriosidase, ceruloplasmin, vitamin D

INTRODUCTION

Defined as a persistent inflammation of the rhinosinusal mucosa, lasting more than 12 weeks and associated with annoying symptomatology, chronic rhinosinusitis is a condition with an increasing prevalence, which causes a significant reduction in the quality of life of patients. Also, the socio-economic impact is important due to the high number of doctor's presentations, the recurrences that occurred in a significant percentage of patients, and the indirect costs of reducing work efficiency.

Chronic rhinosinusitis is a multifactorial inflammatory disease with complex pathophysiology, due to the interaction of external factors (bacteria, viruses, fungi, inhaling irritants) with the body conditioned by endogenous factors (anatomical variations, nature of the epithelial barrier, innate immunity, acquired immunity of some genetic diseases). The mechanisms that determine the production and maintenance of rhinosinusal inflammation have been intensively studied, but the complexity of the interactions and the multitude of molecules involved constantly offer new topics for study, which could become part of a therapeutic strategy or improve patients' quality of life.

Bacterial biofilms are involved in the pathogenesis and evolution of chronic rhinosinusitis, especially in treatment-refractory forms. Thus, the presence of biofilms may represent an unfavorable prognostic element in the evolution of the disease. However, the causal relationship between bacterial biofilms and inflammation of the rhinosinusal mucosa is incompletely elucidated, it is not established with certainty whether biofilms amplify local inflammation or whether, on the contrary, mucosal inflammation promotes the development of biofilms by increasing the adhesion of microorganisms to its surface. The study of this aspect aimed to evaluate the relationship between the presence of biofilms and inflammatory infiltrate in patients with chronic rhinosinusitis, as well as the analysis of the impact of comorbidities on the possible presence of biofilms, both elements representing unfavorable prognostic factors.

Although there are various therapeutic resources, to obtain the best possible results, the need for individualized therapy is required, especially for patients at risk of recurrence. Given the heterogeneity of rhinosinusitis and the different responses of patients to treatment, we considered that exploring potential biomarkers for inflammation can be a useful approach, by identifying parameters that could be used later as indicators in therapy and prognosis.

In this paper, we investigated the inflammatory syndrome of chronic rhinosinusitis from the perspective of evaluating chitotriosidase as a biological marker of macrophage accumulation and activation. We also studied the systemic resonance of some mediators of inflammation of the rhinosinusitis mucosa, researching changes in ceruloplasmin, as an element of protection against oxidative stress.

The paper also addressed potential aspects of adjuvant therapy, to evaluate the relationship between vitamin D and microbial biofilms in chronic rhinosinusitis.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. The relationship between microbial biofilms and tissue inflammatory changes in chronic rhinosinusitis

Objectives

In this study we aimed to investigate the existence of a relationship between the presence of biofilms and the type of inflammatory infiltrate in patients with CSR, taking into account the fact that these elements can be considered unfavorable prognostic factors.

Material and method

We conducted a comparative study, which included 50 patients diagnosed with CSR according to the EPOS 2012 criteria (European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps), which had unsatisfactory results in previous treatments.

This study was approved by the Ethics Commission of UMF "Iuliu Hațieganu" from Cluj-Napoca, patients gave their consent regarding the informed participation in this study. The patients were investigated in the period 2016-2017 in the CF Cluj-Napoca University Clinical Hospital.

The inclusion in the study was made based on the following criteria:

- confirmed diagnosis of CSR based on clinical examination and disease history, nasal endoscopy and/or cranial computed tomography imaging,
- patients with unsatisfactory results after previous drug treatment.

The exclusion criteria were as follows:

- patients under 18 years of age,
- immunocompromised patients,
- patients who have been treated with antibiotics or corticosteroids for less than 3 weeks before investigations.

Nasal endoscopy confirmed the presence or absence of nasal polyps, and data were collected from patients' medical records on previous treatments, on other surgeries, as well as on possible comorbidities (allergies, asthma).

From each patient were collected under endoscopic control, fragments of the mucosa affected by inflammation of the ethmoid sinus and middle meatus.

We used Gram and Hematoxylin-Eosin (HE) staining to highlight bacterial colonization. The presence of biofilms was confirmed using Toluidine Blue staining, which highlighted the bacterial polysaccharide layer, characteristic of biofilms. Inflammatory cells (eosinophils, neutrophils, lymphocytes) were highlighted by HE staining.

Inflammatory infiltrate was rated as "abundant", "moderate" or "low". Statistical analysis was performed using IBM SPSS 25.0 (IBM, USA).

Results

Following the histopathological evaluation, bacterial biofilms were identified by staining with HE and Toluidine Blue in 34 patients (68%). Inflammatory infiltrate was considered abundant in 24 patients, and moderate and reduced in 26 patients.

It has been found that the frequency of severe inflammation is significantly higher in patients with biofilms than those without biofilms OR=12.833 [2.489-66.163], p=0.001. Microbial biofilms did not exist correlated with a certain type of inflammatory infiltrate, mainly eosinophilic or lymphocytic/neutrophilic.

The presence of nasal polyps was significantly correlated with microbial

biofilms compared to patients without nasal polyps in which the frequency of occurrence of biofilms was lower OR= 4.500 [1.052-19.252], p = 0.044.

The identification of biofilms in patients with CSR and comorbidities showed a significantly higher chance of development of biofilms in patients with CSR and asthma, respectively allergies OR= 7.875 [1.547-40.091], p = 0.006.

Conclusions

The presence of microbial biofilms has been significantly associated with an abundant inflammatory infiltrate in patients included in our study, an association that may worsen the disease. Also, the presence of biofilms was highlighted in patients with nasal polyps, as well as in patients with associated comorbidities, known subgroups at risk of recurrence. In light of these findings, we might consider it appropriate to request ENT specialists to identify biofilms for histopathological examination, to provide personalized therapy, and reduce the risk of recurrence

Study 2. Chitotriosidase - a potential biomarker of the inflammatory syndrome in CRS

Objectives

Investigation of inflammatory CRS syndrome may provide a better understanding of the pathogenesis of this disease, and identifying an appropriate biomarker remains an important goal for improving patient monitoring.

CHT determination as a biological marker of macrophage accumulation and activation has emerged as a modern approach in the management of genetic, autoimmune, inflammatory, or degenerative diseases. In this context, we aimed to evaluate the serum activity of chitotriosidase, following its variations depending on the phenotype of rhinosinusitis and depending on the presence of microbial biofilms.

Material and method

The study was performed following the approval received from the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca and took place between 2016-2017 in the University Clinical Hospital CF Cluj-Napoca, patients signed the informed consent.

We conducted a prospective, randomized, case-control clinical study that included 16 patients diagnosed with CRS and a control group of 21 non-smokers, investigated for nasal septal deviation, without other known associated diseases.

The inclusion criteria are similar to those in study 1: patients diagnosed with CRS after clinical examination, with confirmation by nasal endoscopy and/or cranial CT imaging, without other known inflammatory diseases, patients in whom previous drug treatment had unsatisfactory results. The exclusion criteria were: age under 18, smokers, immunocompromised patients, administration of antibiotics or corticosteroids 3 weeks before admission.

Biochemical analysis

Blood samples were taken before surgery for routine tests. After coagulation, blood samples were centrifuged to separate the serum, which was immediately frozen at -80 ° C.

For the determination of circulating chitotriosidase, we used the serum collected from patients diagnosed with CRS and from the control group. To measure the enzymatic activity, we used a fluorometric method, based on the use of a substrate analog (4-Methylumbelliferyl beta-D-N, N', N''- triacetylchitotrioside).

Histopathological analysis

Under endoscopic control, fragments of inflamed sinus mucosa, from the middle meatus and the ethmoidal sinus were collected from each patient. The tissue fragment was used to assess the presence of microbial biofilms. Sample preparation and examination were performed similarly to study 1.

Results

CHT values showed a statistically significant difference between the subject group and the control group. Serum chitotriosidase activity values did not have a normal distribution using the Shapiro-Wilk test and we obtained $p=0.020$ for CHT. Statistically significant differences in the distribution of values were found.

CHT between patients and the control group. CHT values ranged from 80 to 460 nmol/mL/h, with median and interquartile range of 230 (150-280) nmol/mL/h for the patient group and 130 (100-180) nmol/mL/h for the control group, with a significant difference in statistical view between the two groups ($p=0.030$, Mann-Whitney-U test). In patients with CSR, CHT values did not differ significantly depending on the presence or absence of nasal polyps. Also, no associated comorbidities such as allergies or asthma did not induce significant differences in enzyme activity between subgroups of patients.

Patients with microbial biofilms present did not show significant CHT values compared to the subgroup patients without biofilms, although the values recorded in patients with biofilms were higher than in those without biofilms.

The assessment of the differentiation capacity of CHT as a marker of inflammation was performed based on the analysis ROC curve. This revealed a value of the area under the curve of 0.7143 (0.5436-0.8850), meaning a good ability to differentiate CHT between the patient group and the control group.

Conclusions

Our study showed that serum chitotriosidase activity as a marker of macrophage activation was significantly increased in patients with chronic rhinosinusitis compared to the control group. We found that serum chitotriosidase activity was not influenced by the investigated covariates, and the results of the ROC curve indicate the possibility of using chitotriosidase as a biomarker of correct differentiation between patients with chronic rhinosinusitis and the control group.

Serum chitotriosidase values were higher in patients with chronic rhinosinusitis and biofilms compared to those without biofilms, even though the differences did not reach the threshold of statistical significance, probably due to a higher degree of inflammation associated with biofilm development.

According to these data, chitotriosidase is a non-invasive marker of the inflammatory syndrome, through its ability to correctly differentiate patients with CSR from the control group, expressing the systemic resonance of local inflammation and could become a useful and accessible parameter available to clinicians.

Study 3. Systemic resonance of oxidative stress in chronic rhinosinusitis

Objectives

To date, there are few studies evaluating ceruloplasmin changes in patients with CRS. Starting from the premise that microbial biofilms are associated with significant inflammation of the rhinosinusal mucosa, and this inflammation can accentuate the release of ORS, we aimed to evaluate changes in oxidative stress in patients with CRS. In this paper, we investigated the role of ceruloplasmin, as an antioxidant mechanism in

patients with CRS, with the idea of studying the systemic resonance of oxidative stress at the local level using an easy-to-measure biomarker with automated methods. In this sense, we performed the following determinations: catalase, ceruloplasmin, malondialdehyde. We studied the level of these parameters to highlight any changes caused by oxidative stress in patients with CRS.

Material and method

We conducted a case-control study, which was approved by the ethics committee of our university, which included patients with CRS investigated at the CF University Clinical Hospital in 2017. Patients agreed to participate in this study, by informed consent.

The study included 21 patients who were diagnosed with CRS based on EPOS criteria. The control group included 7 patients who were investigated for nasal septal deviation.

The inclusion criteria were as follows: patients over 18 years of age diagnosed with CRS based on clinical examination, disease history and nasal endoscopy and/or imaging investigation by computed tomography, absence of other known inflammatory diseases, without the use of dietary supplements antioxidant.

The exclusion criteria were as follows: age under 18, immunocompromised patients, presence of known inflammatory diseases, liver disease, enteropathy, kidney disease, diabetes, oncological diseases, recent acute infections, use of dietary supplements with antioxidant effect.

Results

We checked the normality of the data distribution using the Shapiro-Wilk test and found that the data are normally distributed (the Shapiro-Wilk test had a probability of $p > 0.05$).

Because when comparing ceruloplasmin values between groups, the Levene test of equality of variances had a probability of 0.968, it can be considered that the variances do not differ statistically significantly and the Student test for equal variances can be used to compare the means. Its probability was 0.568 and thus we showed that there are no statistically significant differences between the CP values between the two groups.

Evaluation of catalase values did not show significant differences between the group of patients and controls (Student's test for equal variances $p = 0.824$).

Because when comparing MDA between groups the Levene test of equality of variances had the probability of 0.713 it can be considered that the variances do not differ statistically significantly. Using the Student test for equal variances ($p = 0.532$), we found that there are no statistically significant differences between MDA values. between the patient group and the control group.

Conclusions

In the patients included in the study, the evaluation of the O/AO balance did not reveal significant differences compared to the control group, the values of ceruloplasmin, as antioxidant and malondialdehyde, as a result of the oxidation products, not being different between the two groups.

In conclusion, the fact that we did not obtain significant results in this research may direct the investigations in another direction of study or may bring the challenge of further research using other methods.

Study 4. Significance of vitamin D in chronic rhinosinusitis

Objectives

This study aimed to evaluate the serum level of vitamin D (25-OH-D3), as a potential biomarker associated with inflammation and its variations depending on the presence of microbial biofilms.

Material and method

The study was performed following the approval received from the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca and took place between 2016-2017 in the University Clinical Hospital CF Cluj-Napoca, patients signed the informed consent. We conducted a prospective, randomized, case-control clinical study that included 16 patients diagnosed with CSR and a control group of 21 non-smokers, investigated for nasal septal deviation, without other known associated diseases.

The inclusion criteria were: patients diagnosed with CRS based on the history of the disease, imaging evaluation by cranial CT and nasal endoscopy, without other known inflammatory diseases, patients in whom the optimally administered drug treatment did not prove to be effective. The exclusion criteria were: age under 18 years, immunocompromised patients, administration of antibiotics or corticosteroids 3 weeks before hospitalization, treatments with Vitamin D supplements.

Results

Serum concentrations of 25-OH-D3, between 4 and 37.1 ng/ml, with a median and interquartile range of 22.7 (16.70-28.3) ng/ml for the patient group and 43 respectively, 5 (32.20-64.20) ng/mL for the control group, did not have a normal distribution, in the Shapiro-Wilk test we obtained $p < 0.001$.

Statistically significant differences were found in the distribution of 25-OH-D3 values between patients and the control group (Mann-Whitney U test $p = 0.001$).

We analyzed the values of vitamin D in the group of patients finding that there are no significant differences between the subgroup of patients with nasal polyps and without nasal polyps, the Mann-Whitney-Wilcoxon test has $p = 0.236$.

We verified the potential dependence of 25-OH-D3 values depending on the presence of microbial biofilms on the sinus mucosa (Mann-Whitney U test $p = 0.054$) or based on associated comorbidities such as asthma (Mann-Whitney U test $p = 0.603$), without these aspects revealed statistically significant differences.

We found that patients with biofilms had lower values of 25-OH-D3 compared to those without biofilms (median and IQR were 23.45 (14.40-29.30) ng/ml versus 32.20 (27.90-45.60) ng/mL, respectively), but without statistical difference.

Conclusions

In conclusion, we can consider 25-OH-D3 as a non-invasive biomarker, whose usefulness in tracking inflammation in CSR requires further investigation. Patients with nasal polyps had values lower than 25-OH-D3 compared to those without polyps, also patients in whom microbial biofilms were identified had values lower than 25-OH-D3 than those without biofilms, a finding that may support the importance of microbial biofilms as an aggravating factor in the pathogenesis of the disease.

Thus, given that microbial biofilms are associated with refractory forms of CSR, the use of vitamin D supplements may improve the effectiveness of therapy. However, additional studies, performed on larger cohorts of patients, monitored over a longer period are needed to confirm these hypotheses.

Originality and innovative contributions of the thesis

Through the results obtained, each of the chapters of this paper, constituting pilot studies, brought additional information on the pathogenesis of chronic rhinosinusitis but especially opened the way for new challenges, which could be deepened by further research.

Thus, the significant association of microbial biofilms with an abundant inflammatory infiltrate, representing elements of unfavorable prognosis for CSR, maybe a suggestion for clinicians to request the identification of the presence of biofilms at the histopathological examination, for personalized therapy and monitoring.

According to our results, chitotriosidase is a non-invasive marker of the inflammatory syndrome, through its ability to correctly differentiate patients with CSR from the control group. Chitotriosidase could become a useful and accessible parameter available to clinicians, and our data have shown that the dosage of this enzyme is important in assessing inflammatory syndrome, involved in both the pathogenesis and evolutionary prognosis of this condition.

Vitamin D was significantly decreased in patients with CSR compared to controls, revealing a correct ability to differentiate between the two groups, which may call into question the use of adjuvant therapy with vitamin D supplements, based on its immunomodulatory effects.