

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Стилиди И.С., Грачев А.Н.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕЗИДЕНТНОГО МИКРОБИОМА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115552, Москва, Россия

*Представлены данные комплексного сравнительного исследования таксономического состава резидентного микробиома опухолей 26 больных немелкоклеточным раком легкого. Анализ таксономического разнообразия выявил 10 типов, 280 родов и 788 видов микроорганизмов. Анализ относительного содержания и прогностической значимости проведен для 62 доминирующих родов. Обнаружены отличия относительного содержания бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* между опухолевой и условно нормальной тканью легкого, однако их диагностический потенциал не подтвержден. Проведенный корреляционный анализ не выявил взаимосвязи содержания различных родов бактерий с гистологическим типом опухоли, ее локализацией и возрастом пациентов. Обнаружены различия в содержании исследованных бактерий в зависимости от стадии заболевания, наличия регионарных метастазов и дифференцировки опухоли. Показана прогностическая значимость бактерий родов *Variovorax* и *Pseudoclavibacter* при немелкоклеточном раке легкого. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых эффективных методов диагностики и прогноза немелкоклеточного рака легкого.*

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого; микробиом; диагностика; прогноз.

Для цитирования: Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Стилиди И.С., Грачев А.Н. Диагностический и прогностический потенциал резидентного микробиома немелкоклеточного рака легкого. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 458-462. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-458-462>

Для корреспонденции: Ковалева Ольга Владимировна, канд. биол. наук, ст. научн. сотр. лаб. регуляции клеточных и вирусных онкогенов; e-mail: ovkovaleva@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-15-00291, <https://rscf.ru/project/22-15-00291/>.

Поступила 21.05.2022

Принята к печати 27.05.2022

Опубликовано 15.08.2022

Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Stilidi I.S., Gratchev A.N.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC POTENTIAL OF THE RESIDENT NON-SMALL CELL LUNG CANCER MICROBIOME

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115552, Moscow, Russia

*The data of a comprehensive comparative study of the taxonomic composition of the resident microbiome of tumors from 26 patients with non-small cell lung cancer are presented. Analysis of taxonomic diversity revealed 10 types, 280 genera and 788 species of microorganisms. The analysis of the relative content and prognostic significance was carried out for 62 dominant genera. Differences in the relative abundance of bacteria of the genera *Acinetobacter*, *Halomonas*, and *Chryseobacterium* between tumor and conditionally normal lung tissue were found, but their diagnostic potential was not confirmed. The correlation analysis did not reveal any relationship between the content of various genera of bacteria and the histological type of the tumor, its localization, and the age of the patients. Differences were found in the content of the studied bacteria depending on the stage of the disease, the presence of regional metastases and tumor differentiation. The prognostic significance of bacteria of the genera *Variovorax* and *Pseudoclavibacter* in non-small cell lung cancer was established. The results obtained can be used in the development of new effective methods for the diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer.*

Key words: non-small cell lung cancer; microbiome; diagnosis, prognosis.

For citation: Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Stilidi I.S., Gratchev A.N. Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 458-462 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-458-462>

For correspondence: Kovaleva Olga Vladimirovna, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes; e-mail: ovkovaleva@gmail.com

Information about authors:

Kovaleva O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>;

Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>;

Podlesnaya P.A., <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>;

Stilidi I.S., <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>;

Gratchev A.N., <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00291, <https://rscf.ru/project/22-15-00291/>.

Received 21.05.2022
Accepted 27.05.2022
Published 15.08.2022

Введение. Различные исследования показывают, что в настоящее время опухолевое микроокружение нельзя рассматривать без его микробиологической составляющей, и резидентный микробиом опухоли является его неотъемлемым компонентом. Известно, что для многих солидных опухолей микробиом играет важную роль, причем это не ограничено органами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), для которых его присутствие является общепризнанной нормой. Относительно недавно была охарактеризована нормальная микробиота легких, органа, который долгое время считали стерильным. Микробиом легких представляет собой динамичную систему, которая зависит от множества факторов. Разные участки легких могут быть охарактеризованы специфичным микробным «пейзажем», который зависит от аборигенной микрофлоры, иммунного статуса хозяина и факторов внешней среды. Микробиом легких может существенно меняться при различных заболеваниях легких и дыхательных путей. В целом большинство заболеваний можно охарактеризовать дисбактериозом и превалированием патогенных видов микроорганизмов.

Микроорганизмы могут принимать как непосредственное участие в опухолевой трансформации, так и создавать неспецифический хронический воспалительный фон, который может приводить к возникновению опухолей. Например, показано повышение количества двух типов бактерий *Firmicutes* и *TM7* в опухолях легкого. Более того, два рода бактерий *Veillonella* и *Megasphaera* встречались в опухолях легкого значительно чаще других [1]. Также показана связь между злокачественными опухолями легкого и *Mycobacterium tuberculosis*, активность которых стимулирует синтез фактора некроза опухолей, что, в свою очередь, стимулирует онкологические процессы [2]. Современные исследования подтвердили ассоциацию повышенного содержания *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter* spp. и *Escherichia coli* с развитием опухолей легкого [3]. По сравнению с контрольными образцами нормальной ткани в опухолях легкого наблюдается повышенное содержание представителей родов *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Streptococcus* [4]. При онкологических заболеваниях в легких также может наблюдаться развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Legionella* и *Moraxella* (например, *Moraxella catarrhalis*). Микробиом опухолей легких оказывает влияние на клиническое течение заболевания на различных уровнях. Так, при дисбактериозе легких наблюдается повышение концентрации активных форм кислорода, что приводит к учащению двуцепочечных разрывов ДНК, и, как следствие, воспалительным процессам. В ряде случаев aberrantные микроорганизмы в составе микробиоты легких вызывают повышенный синтез интерлейкинов. К примеру, установлена связь между активностью *Haemophilus influenzae* и выработкой интерлейкина IL-17, что стимулирует развитие опухолей [5].

Изучение микробиома легких при онкологических заболеваниях имеет ряд ограничений и часто осложнено отсутствием контрольных образцов. Тем не менее, ана-

лиз микробиома, ассоциированного со злокачественными опухолями, может позволить выявить микроорганизмы, присутствие которых специфично для определенных процессов или популяций. Изучение микробиоты легких при онкологических заболеваниях необходимо для исследования влияния микроорганизмов на клиническую картину на разных стадиях опухолевого процесса. Также, изучение микробиоты опухолей легкого позволит выявить микроорганизмы, которые можно рассматривать в качестве биомаркеров онкологических заболеваний [6].

Цель настоящего исследования - изучение резидентного микробиома немелкоклеточного рака легкого и выявление перспективных диагностических и прогностических микроорганизмов.

Материал и методы. В исследование включены 26 больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием пациентов и здоровых доноров, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех больных подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей легкого (ВОЗ, 2021). Описание исследованной выборки представлено в таблице.

ДНК библиотеки для секвенирования гена 16S были приготовлены согласно протоколу Illumina (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с использованием праймеров к V3 и V4 региону гена рибосомальной рРНК [7]. Библиотеки были секвенированы при помощи MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3. Секвенирование проводили на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» (ЦКП ИКВС УрО РАН).

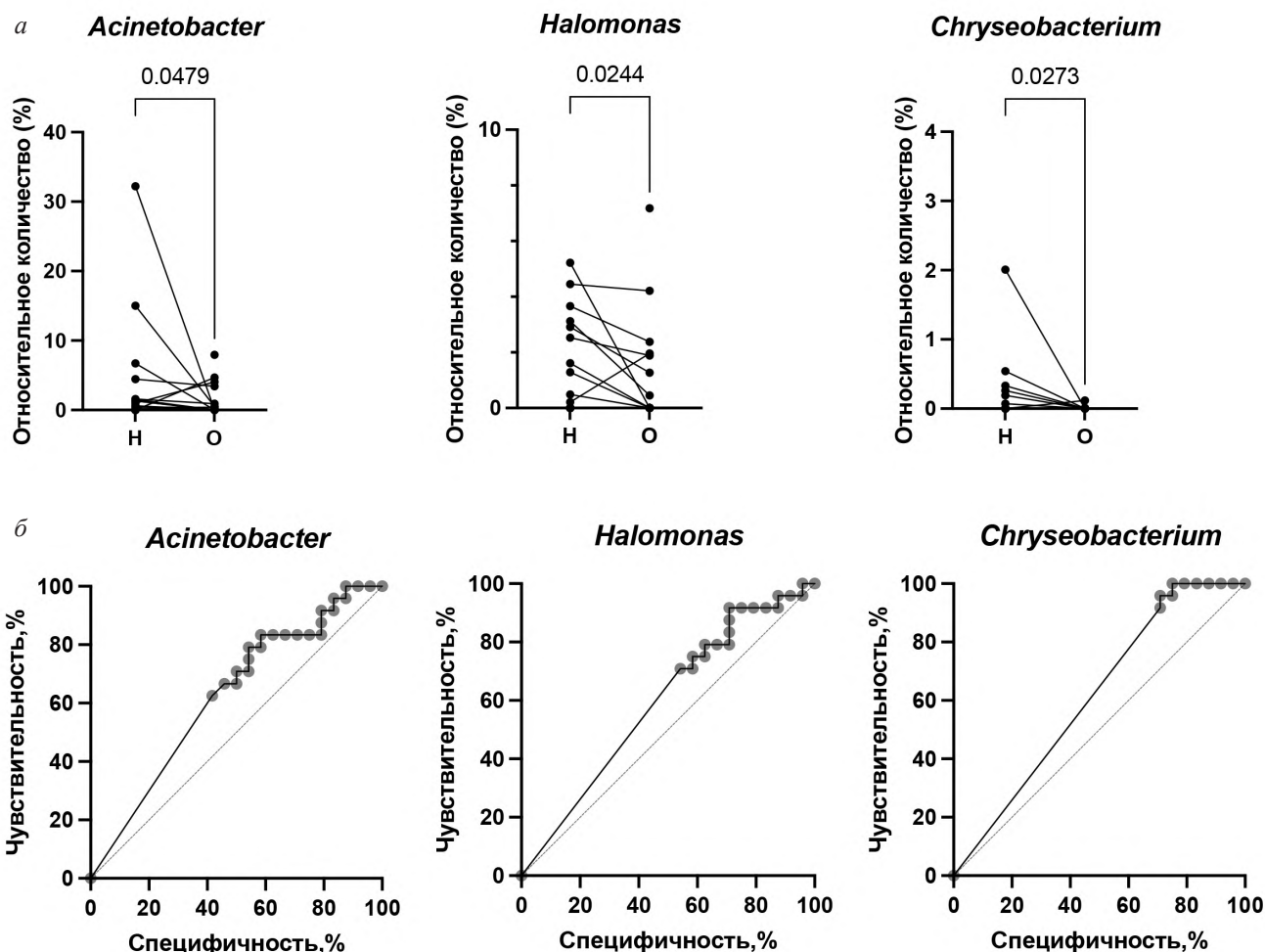
Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Манна–Уитни и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Сравнение статистической значимости различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В данной работе проведен анализ таксономического состава резидентного микробиома НМРЛ и парных образцов условно нормальной ткани легкого для выявления микроорганизмов, ассоциированных с развитием и течением данно-

Клинико-морфологические характеристики больных НМРЛ

Характеристика	Число случаев,%
Возраст, годы:	
≤61	13 (50%)
>61	13 (50%)
Гистология:	
Аденокарцинома	14 (54%)
Плоскоклеточный рак	12 (46%)
Стадия:	
I-II	12 (46%)
III-IV	14 (54%)
Локализация:	
Центральная	12 (46%)
Периферическая	14 (54%)
Размер опухоли (T):	
T1-T2	16 (62%)
T3-T4	10 (38%)
Наличие регионарных метастазов (N):	
N0	9 (35%)
N+	17 (65%)
Степень дифференцировки (G):	
G1-G2	14 (54%)
G3	12 (46%)

го заболевания. Проведенный анализ выявил 10 типов бактерий, как в опухоли, так и в нормальной ткани легкого. Доминирующими типами были *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Отличий относительного количества бактерий различных типов между опухолевой и условно нормальной тканью не выявлено. Далее проведен анализ таксономического состава микробиома легкого на уровне родов. Всего по результатам секвенирования в образцах опухолей легкого и условно нормальной ткани выявлено 280 родов и 788 видов микроорганизмов. Для дальнейшего исследования выбрали 62 доминирующих рода, относительное содержание которых составило более 0,1%. Проведенный анализ показал значимое отличие относительного количества бактерий 3-х родов: *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* (см. рисунок, а). Следует отметить, что относительное количество данных видов снижалось в опухоли, по сравнению с условно нормальной тканью. Провели анализ информативности диагностического метода с помощью оценки его чувствительности и специфичности путем построения ROC кривых и вычисления площади под ними (AUC). Результаты представлены на рисунке, б.



Анализ бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* при НМРЛ.

а – сравнительный анализ относительного содержания бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* в опухолевой и условно нормальной ткани НМРЛ. б - ROC-анализ для бактерий *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* у больных НМРЛ.

Проведенный анализ показал, что, несмотря на значимое снижение в опухоли бактерий данных родов, площадь под ROC-кривой, равная 0,624 для *Acinetobacter*, 0,593 для *Halomonas* и 0,615 для *Chryseobacterium* свидетельствует о среднем качестве модели, что не позволяет использовать полученные данные в диагностических целях.

Дополнительно провели анализ родов бактерий, относительное количество которых повышалось в опухоли, по сравнению с условно нормальной тканью легкого, но данное изменение не достигло статистической значимости, хотя и было близко к нему. Выявили единственный род грамотрицательных аэробных бактерий *Sphingomonas*, содержание которого в опухоли составляло 10,58% в то время как в нормальной ткани легкого 1,59% ($p=0,08$). Полученные нами данные подтверждаются литературными, свидетельствующими о том, что содержание бактерий рода *Acinetobacter* снижается при НМРЛ, в то время как относительное количество бактерий рода *Sphingomonas* увеличивается [8].

Рак легкого является гетерогенным заболеванием. Двумя наиболее распространенными типами НМРЛ легкого являются плоскоклеточный рак и аденокарцинома, которые характеризуются различными молекулярными механизмами возникновения и терапевтическими стратегиями [9]. Ввиду того, что плоскоклеточный рак легкого часто ассоциирован с неблагоприятным воздействием внешних факторов (например, курением), можно предположить у таких пациентов колонизацию легкого бактериями, содержащимися в табаке [10].

Далее провели корреляционный анализ между относительным содержанием бактерий доминирующих родов и клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ. Однако, опухоли легкого различных гистологических типов, как по результатам настоящего исследования, так и по литературным данным, не отличаются по таксономическому разнообразию микробиома [11, 12]. Также проведенный анализ не выявил корреляций между содержанием бактерий преобладающих родов и локализацией опухоли, а также возрастом пациентов. Интереснее оказалась ситуация с прогрессией заболевания, а именно: со стадией заболевания коррелировало 15 бактериальных родов. Необходимо отметить, что относительное количество бактерий родов *Burkholderia* ($r=-0,4258$ $p=0,030$), *Aquabacterium* ($r=-0,459$; $p=0,018$) снижается со стадией заболевания, в то время как относительное количество родов *Corynebacterium* ($r=0,449$; $p=0,021$), *Sphingomonas* ($r=0,444$; $p=0,023$), *Streptococcus* ($r=0,460$; $p=0,018$), *Neisseria* ($r=0,421$; $p=0,032$), *Halomonas* ($r=0,408$; $p=0,038$), *Pseudomonas* ($r=0,4488$; $p=0,022$), *Parvimonas* ($r=0,448$; $p=0,022$), *Rothia* ($r=0,501$; $p=0,009$), *Kocuria* ($r=0,421$; $p=0,032$), *Actinomyces* ($r=0,448$; $p=0,022$), *Veillonella* ($r=0,393$; $p=0,047$), *Lactobacillus* ($r=0,393$; $p=0,047$), *Fusobacterium* ($r=0,393$; $p=0,047$) повышается при прогрессии заболевания. Аналогичные результаты были получены в исследовании, которые продемонстрировали изменение содержания бактерий некоторых родов в процессе развития и прогрессии НМРЛ [12]. Анализ взаимосвязи относительного содержания бактерий с регионарным метастазированием выявил обратную корреляцию для бактерий 3-х родов: *Burkholderia*, *Roseomonas* и *Chryseobacterium*.

Анализ таксономического состава микробиома опухолей различной степени дифференцировки выявил отличия в относительном содержании бактерий 7 ро-

дов. Интересно отметить, что относительное содержание бактерий 6 родов (*Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Nesterenkonia*, *Arthrobacter*) было выше в низкодифференцированных опухолях по сравнению с высокодифференцированными, в то время как для бактерий рода *Pseudoclavibacter* наблюдали обратную закономерность.

В литературе представлены единичные работы, посвященные исследованию динамики количественных и качественных изменений микробиома в процессе прогрессирования рака легкого [11, 12]. Так показано, что у пациентов с метастатическим плоскоклеточным раком легкого относительное содержание бактерий родов *Veillonella* и *Rothia* выше, чем у пациентов без верифицируемых метастазов [12]. Полученные нами данные частично согласуются с литературными, что свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования структуры микробиома, ассоциированного с НМРЛ.

Далее нами проведен анализ прогностической значимости 62 исследованных родов бактерий. Корреляционный анализ показал взаимосвязь относительного содержания бактерий 4-х родов (*Serinicoccus*, *Enterobacter*, *Variovorax* и *Pseudoclavibacter*) с выживаемостью пациентов. Для подтверждения данных корреляционного анализа дополнительно провели анализ выживаемости путем построения кривых дожития по методу Каплана-Мейера. Проведенный анализ подтвердил прогностическую значимость 2-х родов: *Variovorax* (HR=7,233; $p=0,0016$) и *Pseudoclavibacter* (HR=0,2477; $p=0,0320$). Следует отметить, что содержание бактерий рода *Variovorax* может служить маркером плохого прогноза (HR=7,233; $p=0,0016$), в то время как высокое содержание бактерий рода *Pseudoclavibacter* - маркером благоприятного прогноза.

Исследований, посвященных прогностической значимости резидентного микробиома легкого в литературе немного. Так, показано, что в целом таксономическое разнообразие микробиома опухолей не является прогностически значимым, в то время как высокое содержание бактерий семейств *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* ассоциировано со снижением выживаемости больных НМРЛ [13]. Все это свидетельствует о необходимости продолжения и масштабирования подобных исследований.

Заключение. Изучение развития и прогрессии рака легкого под воздействием бактериальной составляющей долгое время оставалось в тени, однако сейчас, обнаружены некоторые закономерности между данным видом рака и микробиомом. Изучение микробиома легких представляет собой весьма сложную и интересную задачу. На сегодняшний день известно, что легкие обладают уникальным составом микроорганизмов, независимо от популяции и географических особенностей. В настоящее время очевидно, что микробиом легких непосредственно связан с различными, в том числе и онкологическими заболеваниями. Также, следует отметить, что спектр условно-патогенных микроорганизмов, активность которых возрастает существенным образом при развитии в легких онкологических заболеваний, достаточно широк и ежегодно пополняется новыми видами. Диагностический потенциал резидентного микробиома легкого неоднозначен, однако его прогностическая и терапевтическая значимость имеют значительные перспективы. Все это создает предпосылки для дальнейшего изучения состава микробиома легких и его роли при развитии опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lee S.H., Sung J.Y., Yong D., Chun J., Kim S.Y., Song J.H. et al. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer*. 2016; 102: 89-95. DOI:10.1016/j.lungcan.2016.10.016.
2. Bourigault M.L., Vacher R., Rose S., Olleros M.L., Janssens J.P., Quesniaux V.F. et al. Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances *Mycobacterium tuberculosis* clearance and reduces lung pathology. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2013; 2(1): 124-34.
3. Laroumagne S., Salinas-Pineda A., Hermant C., Murriss M., Gourraud P.A., Do C. et al. Incidence and characteristics of bronchial colonisation in patient with lung cancer: a retrospective study of 388 cases. *Rev. Mal. Respir.* 2011; 28(3): 328-35. DOI:10.1016/j.rmr.2010.05.020.
4. Hosgood H.D., Sapkota A.R., Rothman N., Rohan T., Hu W., Xu J. et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ Mol. Mutagen.* 2014; 55(8): 643-51. DOI:10.1002/em.21878/.
5. Chang S.H., Mirabolfathinejad S.G., Katta H., Cumpian A.M., Gong L., Caetano M.S. et al. T-helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(15): 5664-9. DOI:10.1073/pnas.1319051111.
6. Mao Q., Jiang F., Yin R., Wang J., Xia W., Dong G. et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Letters*. 2018; 415: 40-8. DOI:10.1016/j.canlet.2017.11.036.
7. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(1): e1. https://doi.org/10.1093/nar/gks808.
8. Yang J., Mu X., Wang Y., Zhu D., Zhang J., Liang C. et al. Dysbiosis of the Salivary Microbiome Is Associated With Non-smoking Female Lung Cancer and Correlated With Immunocytochemistry Markers. *Frontiers in oncology*. 2018; 8: 520. DOI:10.3389/fonc.2018.00520.
9. Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M. Lung cancer. *New Engl. J. Med.* 2008; 359(13): 1367-80. DOI:10.1056/NEJMra0802714.
10. Pauly J.L., Paszkiewicz G. Cigarette smoke, bacteria, mold, microbial toxins, and chronic lung inflammation. *J. Oncol.* 2011; 2011: 819129. DOI:10.1155/2011/819129.
11. Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Sucena M. et al. Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 12838. DOI:10.1038/s41598-019-49195-w.
12. Huang D., Su X., Yuan M., Zhang S., He J., Deng Q. et al. The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology. *Am. J. Cancer Res.* 2019; 9(9): 2047-63.
13. Peters B.A., Hayes R.B., Goparaju C., Reid C., Pass H.I., Ahn J. The Microbiome in Lung Cancer Tissue and Recurrence-Free Survival. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2019; 28(4): 731-40. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-18-0966.