

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДОМИНИРУЮЩИХ РОДОВ РЕЗИДЕНТНОГО МИКРОБИОМА ОПУХОЛЕЙ ПОЧКИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

*Исследование посвящено изучению клинической значимости резидентного микробиома опухолей почки различных гистологических типов. С помощью метагеномного секвенирования проведен анализ 30 образцов почечно-клеточного рака. Выявлено 8 типов и 94 рода микроорганизмов. Наибольшее число выявленных таксонов наблюдали в образцах папиллярного рака почки. Статистически значимое различие отмечено только для бактерий рода *Phyllobacterium*, относительное содержание которых более 1% имело тенденцию к благоприятному прогнозу заболевания в случае папиллярных опухолей. Дополнительно проведен корреляционный анализ между содержанием 20 доминирующих родов бактерий и клиническими характеристиками опухоли. Показано, что для светлоклеточного почечно-клеточного рака содержание бактерий рода *Staphylococcus* прямо коррелировало с экспрессией iNOS и общей выживаемостью пациентов. Полученные данные могут указывать на благоприятное влияние опухоль-специфического воспаления в прогнозе светлоклеточного почечно-клеточного рака и необходимость учитывать данные факторы при персонализированном подходе к проведению терапии.*

Ключевые слова: почечно-клеточный рак; микробиом; клиническая значимость; прогноз.

Для цитирования: Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Клиническая значимость доминирующих родов резидентного микробиома опухолей почки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 232-236. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-232-236>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00082, <https://rscf.ru/project/22-25-00082/>.

Поступила 17.08.2022

Принята к печати 21.02.2023

Опубликовано 00.04.2023

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

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE DOMINANT GENUS OF RESIDENT RENAL CANCER MICROBIOME

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115522, Moscow, Russia

*The study is devoted to the research of the clinical significance of the resident microbiome of kidney tumors of various histological types. Using metagenomic sequencing, 30 samples of renal cell carcinoma were analyzed. 8 types and 94 genera of microorganisms were identified. The largest number of identified taxa was observed in samples of papillary kidney cancer. A statistically significant difference was established only for bacteria of the *Phyllobacterium* genus, the relative content of which was more than 1%, which tended to lead to a favorable disease prognosis in the case of papillary tumors. Additionally, a correlation analysis was carried out between the content of 20 dominant genera of bacteria and the clinical characteristics of the tumor. We demonstrated that for clear cell renal cell carcinoma, the content of bacteria of the genus *Staphylococcus* directly correlated with the expression of iNOS and the overall survival of patients. The data obtained may indicate a favorable effect of tumor-specific inflammation in the prognosis of clear cell renal cell carcinoma and the need to take these factors into account in a personalized approach to therapy.*

Key words: renal cell carcinoma; microbiome; clinical relevance; prognosis.

For citation: Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N. Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 232-236 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-232-236>

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>;

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. 22-15-00082, <https://rscf.ru/project/22-15-00082/>.

Received 17.08.2022

Accepted 21.02.2023

Published 00.04.2023

Введение. С появлением данных о присутствии микроорганизмов в различных тканях и органах человека, наряду с доказанной ролью микробиома кишечника и *H. pylori* в патогенезе онкологических заболеваний, роль микробиома в процессе развития и прогрессии опухоли активно изучается. Стоит отметить, что воздействие микробиома может быть как прямым, так и опосредованным. Под прямым воздействием подразумевается прямой контакт бактерий с опухолевыми клетками или клетками микроокружения. Опосредованным считается, например, влияние кишечного микробиома на опухоль другой локализации. Про опосредованные аспекты микробного влияния известно относительно много, особенно в контексте иммунотерапии [1, 2], однако механизмы этого эффекта охарактеризованы не полностью. Для некоторых опухолей описан также резидентный тканевый микробиом. Имеются работы, в которых показано, что состав резидентного микробиома можно использовать в качестве потенциального клинического, диагностического и прогностического маркеров в случаях некоторых опухолей [3, 4]. Для почечно-клеточного рака (ПКР) роль резидентного микробиома в патогенезе заболевания еще не определена и недостаточно описана. В зависимости от своего качественного и количественного состава, резидентный микробиом может оказывать влияние непосредственно как на опухолевые клетки, так и на клетки опухолевого микроокружения, активируя их цитотоксический фенотип и повышая, тем самым, общий воспалительный фон. Является ли этот факт благоприятным в прогнозе течения заболевания, или наоборот носит отрицательный характер, еще предстоит установить. Например, показано, что клетки первичной опухоли для облегчения процесса метастазирования снижают экспрессию провоспалительных молекул [5], что позволяет предположить благоприятную прогностическую роль ло-

кального внутриопухолевого воспаления. Ранее нами показано, что бактериальная нагрузка опухоли может иметь благоприятное прогностическое значение при высокой экспрессии iNOS опухолевыми клетками немелкоклеточного рака легкого [6]. Для ПКР данных о взаимосвязи экспрессии iNOS опухолевыми клетками и микробиологическим сообществом опухоли не представлено. В целом, работ по изучению резидентного микробиома почки представлено крайне мало, что подтверждает актуальность данного исследования. Целью данной работы является изучение клинической и прогностической значимости доминирующих родов резидентных бактерий опухолей почки различных гистологических типов и оценка перспективы использования их анализа в мониторинге заболевания.

Материал и методы. В исследование включены образцы опухолей в виде парафиновых блоков от 30 пациентов с ПКР различных гистологических типов, полученных от пациентов, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных 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 пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей почки (ВОЗ, 2016). Описание исследованной выборки представлено в табл. 1.

Оценку опухоль-ассоциированного воспаления проводили методом иммуногистохимии по стандартной методике с использованием антител к anti-iNOS (clone SP126; Sigma-Aldrich, USA).

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).

При проведении исследования на каждом этапе были использованы соответствующие отрицательные контроли (в том числе, парафин, воздух и инструменты) для выявления и предотвращения возможной контаминации.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия

Таблица 1

Клинико-морфологические характеристики больных ПКР

Показатели	Число случаев, абс(%)
Возраст, годы (среднее±SD)	60,2±11,2
Пол:	
Мужчины	16 (53)
Женщины	14 (47)
Гистология:	
скПКР	10 (33,3)
папПКР	10 (33,3)
хрПКР	10 (33,3)
Стадия:	
I-II	19 (63)
III-IV	11 (37)
Размер опухоли:	
T1-T2	16 (53)
T3-T4	14 (47)
Наличие регионарных метастазов (N):	
N0	29 (97)
N+	1 (3)
Выживаемость, месяцы (среднее±SD)	69,14±38,6

и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ состава микробного сообщества опухолей почки различных гистологических типов проведен посредством метагеномного секвенирования. В состав выборки для проведения секвенирования входило 10 образцов светлоклеточного ПКР (скПКР), 10 образцов папиллярного ПКР (папПКР) и 10 образцов хромофобного ПКР (хрПКР). Анализ таксономического состава микробного сообщества тканей опухолей почки выявил наличие 8 типов и 94 родов.

Стоит отметить, что различные гистологические типы отличались по количеству выявленных типов микроорганизмов. Так, наибольшее число типов было выявлено в образцах скПКР и папПКР, в то время как наименьшее число типов в образцах хрПКР. Самыми распространенными типами выявленных микроорганизмов во всех вариантах опухолей почки были *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*.

Показано, что различные гистологические типы опухолей отличались по своему таксономическому разнообразию на уровне родов. Наибольшее число таксонов было выявлено в образцах папиллярного рака, в то время как наименьшее в образцах хрПКР. Для проведения дальнейшего анализа были выбраны по 20 доминирующих родов, характерных для каждого гистологического типа опухоли. Данные представлены в табл. 2.

Как видно из представленных данных, различные гистологические типы опухолей почки отличаются по составу резидентного микробиома, однако статистически значимые различия наблюдали только для бактерий рода *Phyllobacterium*, наибольшее содержание которых характерно для папиллярных опухолей. Данные представлены на рисунке, а, б.

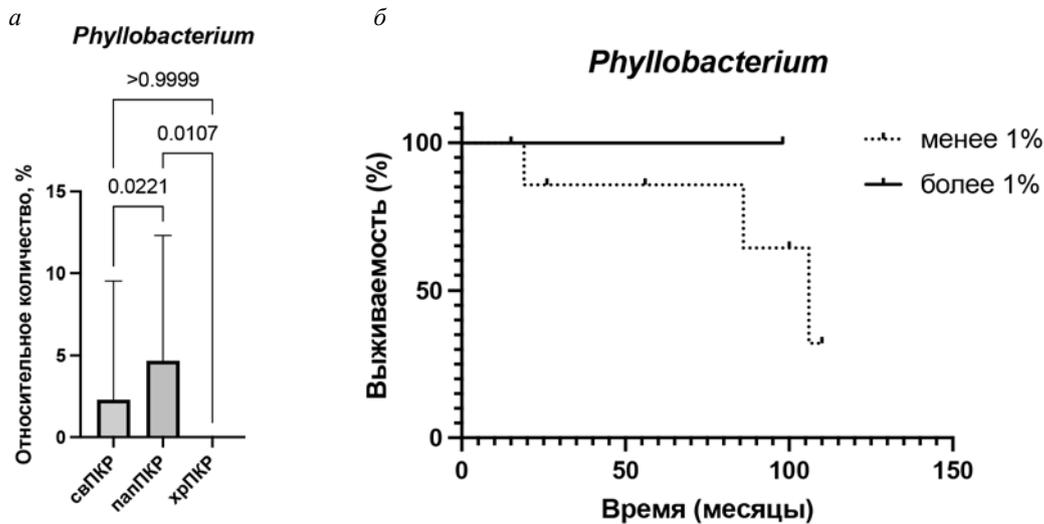
Показано, что высокое содержание бактерий рода *Phyllobacterium* ассоциировано с более благоприятным прогнозом заболевания, однако данные не достигли статистической значимости и требуют подтверждения на более широкой выборке. Однако выявленная закономерность, безусловно, заслуживает внимания при разработке дополнительных инструментов дифференциальной диагностики и прогностических критериев.

На следующем этапе работы провели анализ оценки опухоль-ассоциированного воспаления путем оценки экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в опухолевых клетках методом иммуногистохимии. Экспрессию iNOS выявили в 5-ти исследованных образцах, из которых 3 относились к группе папиллярных и 2 к группе светлоклеточных опухолей. Индуцибельная NO-синтаза (iNOS) является одним из ферментов, который регулирует превращение аминокислоты L-аргинина в эндогенный оксид азота (NO). Функция NO в канцерогенезе многогранна, поскольку он может как способствовать, так и препятствовать прогрессии опухолей в зависимости от раз-

Таблица 2

Доминирующие роды резидентного микробиома опухолей почки различных гистологических типов

Светлоклеточный ПКР		Папиллярный ПКР		Хромофобный ПКР	
Род	%	Род	%	Род	%
<i>Cutibacterium</i>	10,90	<i>Cutibacterium</i>	13,52	<i>Escherichia_Shigella</i>	14,28
<i>Sphingomonas</i>	7,57	<i>Corynebacterium</i>	9,16	<i>Novosphingobium</i>	12,35
<i>Roseomonas</i>	6,33	<i>Escherichia_Shigella</i>	5,95	<i>Cutibacterium</i>	9,22
<i>Staphylococcus</i>	5,91	<i>Clavibacter</i>	5,41	<i>Psychrobacter</i>	7,14
<i>Mesomycoplasma</i>	4,82	<i>Enhydrobacter</i>	4,50	<i>Lactococcus</i>	5,44
<i>Massilia</i>	4,54	<i>Phyllobacterium</i>	3,97	<i>Acinetobacter</i>	4,75
<i>Escherichia_Shigella</i>	4,34	<i>Mesomycoplasma</i>	3,62	<i>Jeotgalicoccus</i>	4,50
<i>Photobacterium</i>	4,29	<i>Simplicispira</i>	2,75	<i>Corynebacterium</i>	4,19
<i>Lawsonella</i>	4,15	<i>Croceibacterium</i>	2,69	<i>Micrococcus</i>	3,15
<i>Blastocatella</i>	4,15	<i>Pseudomonas</i>	2,51	<i>Brachybacterium</i>	2,77
<i>Streptococcus</i>	3,86	<i>Catonella</i>	1,55	<i>Sphingomonas</i>	2,24
<i>Paracoccus</i>	3,24	<i>Lactococcus</i>	1,53	<i>Tetragenococcus</i>	2,20
<i>Anaerobutyricum</i>	2,97	<i>Pedobacter</i>	1,32	<i>Dermabacter</i>	2,18
<i>Aquicella</i>	2,75	<i>Paracoccus</i>	1,02	<i>Cloacibacterium</i>	1,84
<i>Acinetobacter</i>	2,64	<i>Brevundimonas</i>	1,01	<i>Rothia</i>	1,47
<i>Pseudomonas</i>	2,42	<i>Caulobacter</i>	1,00	<i>Aureimonas</i>	1,28
<i>Simplicispira</i>	2,40	<i>Sphingomonas</i>	1,00	<i>Lactobacillus</i>	1,17
<i>Phyllobacterium</i>	2,25	<i>Streptococcus</i>	0,73	<i>Kocuria</i>	0,95
<i>Neisseria</i>	1,86	<i>Acinetobacter</i>	0,62	<i>Massilia</i>	0,87
<i>Rothia</i>	1,46	<i>Nocardioides</i>	0,51	<i>Brevundimonas</i>	0,69



Сравнительный анализ относительного количества бактерий рода *Phyllobacterium* (а) и анализ их прогностической значимости при папиллярном ПКР (б).

личных условий. Ввиду наличия тесной связи между процессами хронического воспаления и развития онкологических заболеваний, роль iNOS активно исследуют в контексте канцерогенеза. Показано, что повышенная экспрессия iNOS ассоциирована с ангиогенезом, устойчивостью к химиотерапии, метастазированием и иммунной резистентностью некоторых злокачественных опухолей. Такая связь обнаружена при колоректальном раке, раке молочной железы, мочевого пузыря, желудка и меланоме [7-10]. Кроме того, в ряде исследований показано, что экспрессия iNOS коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [11-13], однако в целом прогностическое значение экспрессии данного белка в опухолях остается противоречивым. Например, для колоректального рака показано, что экспрессия iNOS ассоциирована с благоприятным прогнозом заболевания [14]. Для ПКР практически нет опубликованных данных о прогностической значимости данного белка в опухолевых клетках, и в проведенном нами исследовании он был использован в качестве маркера воспаления.

Далее мы провели корреляционный анализ между относительным содержанием бактерий 20 доминирующих родов и клинико-морфологическими характеристиками опухоли для каждого гистологического типа ПКР. Для хрПКР и папПКР не выявлено закономерностей между содержанием бактерий определенных родов и клинико-морфологическими характеристиками опухоли. В случае скПКР показано, что содержание бактерий рода *Rothia* обратно коррелировало с размером опухоли ($r = -0,643$; $p = 0,033$). Интересные закономерности выявлены для бактерий рода *Staphylococcus*, а именно: их содержание прямо коррелировало с экспрессией iNOS ($r = 0,649$; $p = 0,05$) и общей выживаемостью пациентов ($r = 0,750$; $p = 0,044$). Из литературных данных известно, что бактерии рода *Staphylococcus* могут индуцировать экспрессию iNOS [15]. Также на клетках почечной карциномы показано, что повышение экспрессии iNOS характеризуется противоопухолевыми свойствами, а именно ингиби-

рованием их пролиферации [16]. Полученные нами данные косвенно указывают на благоприятное влияние опухоль-специфического воспаления, вызванного резидентным опухолевым микробиомом на прогноз скПКР. Известно, что различные гистологические типы ПКР прогностически отличаются. Так наиболее прогностически неблагоприятным типом опухоли является скПКР, в то время как хрПКР отличается более благоприятным прогнозом [17]. Выявленные в данном исследовании закономерности, наблюдали именно в случае светлоклеточного варианта ПКР, что в перспективе может иметь клиническое значение для мониторинга динамики развития заболевания и разработки новых подходов к терапии.

Заключение. Данное исследование продемонстрировало, что различные гистологические типы почечно-клеточного рака различаются по таксономическому составу резидентного микробиома, и для некоторых типов опухолей это может иметь определенную прогностическую значимость. Помимо этого, для комплексного анализа стромы опухоли необходимо учитывать уровень локального воспаления, так как этот факт в совокупности с другими особенностями может также иметь прогностическую ценность и определить стратегию дальнейшей терапии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-17 см. REFERENCES)

- Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В., Голубева И.С., Савлущинская Л.А., Хоченков Д.А. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3 (3): 73-80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80.

REFERENCES

- Frankel A.E., Coughlin L.A., Kim J., Froehlich T.W., Xie Y., Frenkel E.P., Koh A.Y. Metagenomic shotgun sequencing and unbiased metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients. *Neoplasia*. 2017; 19 (10): 848-55. DOI: 10.1016/j.neo.2017.08.004.

MICROBIOLOGY

2. Matson V., Fessler J., Bao R., Chongsuwat T., Zha Y., Alegre M.L., Luke J.J., Gajewski T.F. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018; 359 (6371): 104-8. DOI: 10.1126/science.aao3290.
3. Dey P., Ray Chaudhuri S. Cancer-Associated Microbiota: From Mechanisms of disease causation to microbiota-centric anti-cancer approaches. *Biology (Basel)*. 2022; 11 (5): 757. DOI: 10.3390/biology11050757.
4. Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q., Carpenter C., Fraraccio S., Wandro S. et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature*. 2020; 579 (7800): 567-74. DOI: 10.1038/s41586-020-2095-1.
5. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V., Golubeva I.S., Savluchinskaya L.A., Khochenkov D.A. iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course of tumor growth of different histogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2016; 3 (3): 73-80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80. (in Russian)
6. Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., Samoilova D., Petrenko A., Zborovskaya I. et al. Lung microbiome differentially impacts survival of patients with non-small cell lung cancer depending on tumor stroma phenotype. *Biomedicines*. 2020; 8 (9): 349. DOI: 10.3390/biomedicines8090349.
7. Gao Y., Zhou S., Xu Y., Sheng S., Qian S.Y., Huo X. Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer. *Nitric Oxide*. 2019; 83: 33-9. DOI: 10.1016/j.niox.2018.12.008.
8. Fahey J.M., Girotti A.W. Nitric oxide-mediated resistance to photodynamic therapy in a human breast tumor xenograft model: Improved outcome with NOS2 inhibitors. *Nitric Oxide*. 2017; 62: 52-61. DOI: 10.1016/j.niox.2016.12.003.
9. Ekmekcioglu S., Grimm E.A., Roszik J. Targeting iNOS to increase efficacy of immunotherapies. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2017; 13 (5): 1105-8. DOI: 10.1080/21645515.2016.1276682.
10. Lopez-Rivera E., Jayaraman P., Parikh F., Davies M.A., Ekmekcioglu S., Izadmehr S. et al. Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2. *Cancer Res*. 2014; 74 (4): 1067-78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0588.
11. Garrido P., Shalaby A., Walsh E.M., Keane N., Webber M., Keane M.M. et al. Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017; 8 (46): 80568-88. DOI: 10.18632/oncotarget.19631.
12. Chen C.N., Hsieh F.J., Cheng Y.M., Chang K.J., Lee P.H. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *Journal of surgical oncology*. 2006; 94 (3): 226-33. DOI: 10.1002/jso.20372.
13. Raspollini M.R., Amunni G., Villanucci A., Boddi V., Baroni G., Taddei A., Taddei G.L. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. *Gynecol. Oncol*. 2004; 92 (3): 806-12. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.12.023.
14. Ropponen K.M., Kellokoski J.K., Lipponen P.K., Eskelinen M.J., Alanne L., Alhava E.M., Kosma V.M. Expression of inducible nitric oxide synthase in colorectal cancer and its association with prognosis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2000; 35 (11): 1204-11. DOI: 10.1080/003655200750056709.
15. Li C., Li H., Jiang Z., Zhang T., Wang Y., Li Z., Wu Y., Ji S., Xiao S., Ryffel B., Radek K.A., Xia Z., Lai Y. Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. *PLoS Pathog*. 2014; 10(2):e1003918. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003918.
16. Tate D.J.Jr., Patterson J.R., Velasco-Gonzalez C., Carroll E.N., Trinh J., Edwards D., Aiyar A. et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int. J. Biol. Sci*. 2012; 8(8):1109-20. DOI: 10.7150/ijbs.4694.
17. Muglia V.F., Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol. Bras*. 2015; 48 (3): 166-74. DOI: 10.1590/0100-3984.2013.1927.