

DOI 10.18699/vjgb-24-25

Состав бактериального микробиома мокроты пациентов с разными патоморфологическими формами немелкоклеточного рака легкого

В.Г. Дружинин ^{1,2} , Е.Д. Баранова ¹, П.С. Деменков ³, Л.В. Мацкова ⁴, А.В. Ларионов ¹

¹ Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

² Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

 druzhinin_vladim@mail.ru

Аннотация. Исследования последних лет показали, что бактериальный микробиом респираторного тракта влияет на развитие рака легкого. Изменение состава микробиома у пациентов связывают с хроническими воспалительными процессами, так как многие бактерии вызывают окислительный стресс, а также способны прямо или опосредованно повреждать геном в клетках организма хозяина. До настоящего времени состав респираторного микробиома у больных с различными гистологическими вариантами рака легкого не изучен. В настоящем исследовании для анализа таксономического состава микробиома мокроты 52 пациентов с плоскоклеточным раком легкого, 52 пациентов с аденокарциномой легкого и 52 здоровых доноров контрольной группы использовали технологию массового параллельного секвенирования региона V3-V4 16S рPHK. Микробиомы мокроты больных с разными гистологическими типами рака легкого и контроля не имели значимых различий по индексу видового богатства (Шеннона), однако у пациентов они отличались от контроля по индексу выравненности (Пиелу). Структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) между аденокарциномой и плоскоклеточным раком также были близкими. Тем не менее матрица, построенная по Брэю–Кёртису, позволила выявить различия между пациентами с плоскоклеточным раком и здоровыми субъектами, но не между аденокарциномой и контролем. Метод LEFse позволил идентифицировать в мокроте больных плоскоклеточным раком увеличение содержания *Bacillota* (*Streptococcus* и *Bacillus*) и *Actinomycetota* (*Rothia*) при сопоставлении с образцами пациентов с аденокарциномой. Не найдено различий в содержании бактерий между образцами больных аденокарциномой и контроля. В микробиоме образцов мокроты пациентов с плоскоклеточным раком по сравнению с контролем было повышено содержание представителей родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Peptostreptococcus* (филум *Bacillota*), *Prevotella*, *Macellibacteroides* (филум *Bacteroidota*), *Rothia* (филум *Actinomycetota*) и *Actinobacillus* (филум *Pseudomonadota*). Таким образом, бактериальный микробиом мокроты пациентов с разными гистологическими типами немелкоклеточного рака легкого имеет существенные различия. Дальнейшие исследования должны быть посвящены поиску микробиомных биомаркеров рака легкого на уровне бактериальных видов с использованием полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого; плоскоклеточный рак легкого; аденокарцинома легкого; бактериальный микробиом; мокрота; таксономический состав; 16S рPHK; NGS секвенирование.

Для цитирования: Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Деменков П.С., Мацкова Л.В., Ларионов А.В. Состав бактериального микробиома мокроты пациентов с разными патоморфологическими формами немелкоклеточного рака легкого. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):204-214. DOI 10.18699/vjgb-24-25

Composition of the sputum bacterial microbiome of patients with different pathomorphological forms of non-small-cell lung cancer


V.G. Druzhinin ^{1,2} , E.D. Baranova ¹, P.S. Demenkov ³, L.V. Matskova ⁴, A.V. Larionov ¹

¹ Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

² Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

 druzhinin_vladim@mail.ru

Abstract. Recent studies have shown that the bacterial microbiome of the respiratory tract influences the development of lung cancer. Changes in the composition of the microbiome are observed in patients with chronic inflammatory processes. Such microbiome changes may include the occurrence of bacteria that cause oxidative stress and

that are capable of causing genome damage in the cells of the host organism directly and indirectly. To date, the composition of the respiratory microbiome in patients with various histological variants of lung cancer has not been studied. In the present study, we determined the taxonomic composition of the sputum microbiome of 52 patients with squamous cell carcinoma of the lung, 52 patients with lung adenocarcinoma and 52 healthy control donors, using next-generation sequencing (NGS) on the V3-V4 region of the bacterial gene encoding 16S rRNA. The sputum microbiomes of patients with different histological types of lung cancer and controls did not show significant differences in terms of the species richness index (Shannon); however, the patients differed from the controls in terms of evenness index (Pielou). The structures of bacterial communities (beta diversity) in the adenocarcinoma and squamous cell carcinoma groups were also similar; however, when analyzed according to the matrix constructed by the Bray–Curtis method, there were differences between patients with squamous cell carcinoma and healthy subjects, but not between those with adenocarcinoma and controls. Using the LEfse method it was possible to identify an increase in the content of *Bacillota* (*Streptococcus* and *Bacillus*) and *Actinomycetota* (*Rothia*) in the sputum of patients with squamous cell carcinoma when compared with samples from patients with adenocarcinoma. There were no differences in the content of bacteria between the samples of patients with adenocarcinoma and the control ones. The content of representatives of the genera *Streptococcus*, *Bacillus*, *Peptostreptococcus* (phylum *Bacillota*), *Prevotella*, *Macellibacteroides* (phylum *Bacteroidota*), *Rothia* (phylum *Actinomycetota*) and *Actinobacillus* (phylum *Pseudomonadota*) was increased in the microbiome of sputum samples from patients with squamous cell carcinoma, compared with the control. Thus, the sputum bacterial microbiome of patients with different histological types of non-small-cell lung cancer has significant differences. Further research should be devoted to the search for microbiome biomarkers of lung cancer at the level of bacterial species using whole-genome sequencing.

Key words: non-small cell lung cancer; squamous cell lung cancer; lung adenocarcinoma; bacterial microbiome; sputum; taxonomic composition; 16S rRNA; NGS sequencing.

For citation: Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Matskova L.V., Larionov A.V. Composition of the sputum bacterial microbiome of patients with different pathomorphological forms of non-small-cell lung cancer. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):204–214. DOI 10.18699/vjgb-24-25

Введение

Исследования последнего времени показывают, что многие бактерии, обитающие в организме человека, имеют отношение к развитию злокачественных опухолей. Уже описаны микробные экосистемы, способные инициировать онкогенную трансформацию, вызывать метаболические изменения в микроокружении опухоли или модулировать ответ на иммунотерапию рака (Xavier et al., 2020; Chen et al., 2022). Предполагается, что комплексные метагеномные подходы позволяют точно идентифицировать профили микробиома, связанные с опухолью, и раскрывать механизмы влияния бактерий на возникновение и прогрессирование рака (Chiu, Miller, 2019). Кроме того, недавние исследования выявили микробные профили, специфичные для определенных типов рака, которые могут служить биомаркерами для диагностики риска развития опухолей (Wu et al., 2021).

Рак легкого (РЛ) возникает в паренхиме легкого или бронхах и ежегодно диагностируется примерно у 1.2 млн человек во всем мире (Cheng T.Y. et al., 2016). Смертность от РЛ остается высокой отчасти из-за отсутствия раннего выявления диагностических биомаркеров, в том числе метагеномных. Поэтому поиск бактерий, связанных с риском развития РЛ, в последние годы резко активизировался, особенно в связи с применением технологии массового параллельного секвенирования ДНК (Mao et al., 2018; Maddi et al., 2019). Предыдущие исследования показали, что существуют особенности состава микробиоты в образцах слюны, бронхоальвеолярного лаважа, легочной ткани, которые могут быть связаны с РЛ, но результаты этих исследований в отношении значимости конкретных бактерий во многом противоречивы (Hasegawa et al., 2014; Lee et al., 2016; Liu H.X. et al., 2018; Tsay et al., 2018; Peters et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Cheng C. et al., 2020; Zhuo et al., 2020).

Важный источник информации о составе микробиоты респираторного тракта – мокрота, которая пока мало изучена у больных РЛ (Hosgood et al., 2014, 2019; Cameron et al., 2017; Druzhinin et al., 2020; Ran et al., 2020). Хотя мокрота не отражает микробиом какой-либо конкретной части дыхательных путей, она может быть полезной для поиска метагеномных биомаркеров РЛ, поскольку ее сбор относительно прост и неинвазивен.

Несмотря на тот факт, что все формы РЛ происходят из эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей, современная классификация включает несколько различных гистологических типов этого заболевания (Tsao, Yoon, 2018). Рак легкого принято разделять на мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), на долю которого приходится 85 % всех случаев РЛ (Molina et al., 2008). Немелкоклеточный рак легкого в свою очередь подразделяется на крупноклеточный рак легкого, аденокарциному легкого (АКЛ) и плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ). Разные гистологические типы РЛ характеризуются своеобразием биологических паттернов, различием молекулярных маркеров и особенными стратегиями лечения (Herbst et al., 2008). Исходя из этого, можно предположить, что состав микробиома респираторного тракта также может различаться у пациентов, страдающих аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком легкого. На сегодняшний день этот вопрос остается открытым с учетом крайне малого числа опубликованных исследований, посвященных сопоставлению респираторного микробиома с отдельными гистологическими типами рака легкого.

В настоящей работе впервые представлены результаты сравнительного изучения таксономического состава бактериального микробиома мокроты больных АКЛ, ПРЛ и здоровых доноров, жителей Кузбасского региона Западной Сибири.

Материалы и методы

Состав микробиоты изучен в образцах мокроты 52 пациентов с АКЛ (37 мужчин, 15 женщин; средний возраст 62.5 года); 52 пациентов с ПРЛ (49 мужчин, 3 женщины; средний возраст 59.9 года) и 52 здоровых доноров (39 мужчин, 13 женщин; средний возраст 62.5 года). Выборка пациентов с НМРЛ была сформирована из лиц, впервые поступивших на обследование в Кемеровский областной онкологический диспансер (Кемерово, Российская Федерация). Материал для исследования был собран за период с марта 2018 г. по март 2022 г. На каждого участника была заполнена анкета, содержащая информацию о месте и дате рождения, среде проживания, роде занятий, подверженности профессиональным вредностям, состоянии здоровья, приеме лекарственных препаратов, рентгенологических процедурах, курении и употреблении алкоголя. Для пациентов с НМРЛ дополнительно учитывали результаты клинического и гистологического анализов, первичную локализацию опухоли, стадию заболевания в соответствии с классификацией TNM (tumor,

nodus, metastasis) (Goldstraw, 2013). Демографические и клинические данные о пациентах и контрольных донорах представлены в табл. 1.

Критериями включения были: возраст мужчин и женщин ≥ 40 лет, сдача мокроты и подписание письменного информированного согласия. Критерии исключения – любое острое или хроническое состояние, которое ограничивало бы возможность пациента участвовать в исследовании, использование антибиотиков в течение 4 нед. до сбора материала, невозможность получить образец мокроты или отказ дать информированное согласие. Все участники были проинформированы о целях, возможных рисках исследования и подписали информированное согласие. Исследование одобрено комиссией по биомедицинской этике Кемеровского государственного университета (протокол № 17/2021 от 05.04.2021). При включении пациентов и контрольных доноров в исследование соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2000).

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

| Показатели | ПРЛ, n = 52 | АКЛ, n = 52 | Контроль, n = 52 |
|-----------------------------------|-------------|-------------|------------------|
| Возраст, лет (M) | 59.9 | 62.5 | 62.5 |
| Пол (n/%): | | | |
| Мужчины | 49/94.0 | 37/71.0 | 39/75.0 |
| Женщины | 3/6.0 | 15/29.0 | 13/25.0 |
| Место жительства (n/%): | | | |
| Город | 35/67.0 | 40/77.0 | 46/88.0 |
| Село | 17/33.0 | 12/23.0 | 6/12.0 |
| Профессиональные вредности (n/%): | | | |
| Да | 19/37.0 | 23/44.0 | 12/23.0 |
| Нет | 33/63.0 | 29/56.0 | 40/77.0 |
| Статус курения (n/%): | | | |
| Да | 38/73.0 | 25/48.0 | 20/38.5 |
| Нет | 14/27.0 | 27/52.0 | 32/61.5 |
| Употребление алкоголя (n/%): | | | |
| Да | 34/65.0 | 35/67.0 | 39/75.0 |
| Нет | 18/35.0 | 17/33.0 | 13/25.0 |
| Хронические заболевания (n/%): | | | |
| Сердечно-сосудистые | 29/56.0 | 40/77.0 | 20/38.5 |
| Бронхиты | 16/31.0 | 12/23.0 | 4/8.0 |
| ХОБЛ | 24/45.0 | 6/12.0 | 0 |
| Желудочно-кишечные | 7/15.0 | 7/15.0 | 11/21.0 |
| Диабет | 1/2.0 | 3/6.0 | 4/8.0 |
| Астма | 3/6.0 | 1/2.0 | 1/2.0 |
| Ожирение | 4/8.0 | 15.0 | 1/2.0 |
| TNM (n/%): | | | |
| I, II | 28/54.0 | 32/61.5 | – |
| III, IV | 24/46.0 | 20/38.5 | – |
| Локализация опухоли (n/%): | | | |
| Центральный | 27/52.0 | 3/6.0 | – |
| Периферический | 22/42.0 | 47/90.0 | – |
| Не установлена | 3/6.0 | 2/4.0 | – |

Примечание. TNM (tumor-node-metastasis) – опухоль-узел-метастаз; M – среднее значение.

Для анализа таксономического состава микробиома дыхательных путей образцы (2–3 мл) мокроты от пациентов с НМРЛ и доноров контрольной группы получали неинвазивным способом посредством продуктивного кашля. Эти образцы немедленно помещали в стерильные пластиковые флаконы и замораживали (–20 °С). Замороженные образцы транспортировали в лабораторию и хранили при –80 °С до процедуры выделения бактериальной ДНК.

Экстракцию ДНК, амплификацию и секвенирование 16S рРНК на приборе MiSeq (Illumina, США) выполняли в соответствии с рекомендациями производителя. Подробное описание процедур приведено ранее (Druzhinin et al., 2021).

Обработку данных, полученных по итогам секвенирования микробиомов, проводили при помощи пакета программ QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Была осуществлена проверка качества и создана библиотека последовательностей. Объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (OTU) выполняли на основе 99 % порога сходства нуклеотидного состава с использованием библиотек референсных последовательностей Greengenes (версии 13-8) и SILVA (версия 138) с последующим удалением синглтонов (OTU, содержащих только один сиквенс). Соответствие наименований бактериальных филумов современной международной номенклатуре определяли с использованием ресурса LPSN (Parte et al., 2020).

Общее разнообразие (альфа-разнообразие) прокариотических сообществ мокроты оценивали по количеству выделенных OTU (аналог видового богатства) и индексам Шеннона ($H = \sum p_i \ln p_i$, где p_i – доля i -го вида в сообществе). Равномерность распределения видов по их обилию в сообществе оценивали индексом Пиелу. Различия структуры бактериальных сообществ разных образцов (бета-разнообразие) анализировали при помощи UniFrac (Lozupone, Knight, 2005) – метода, распространенного в экологии микроорганизмов, оценивающего различие между сообществами на основе филогенетического родства представленных таксонов. При расчете индексов разнообразия использовали нормализацию выборок по 1070 сиквенсам (минимальное количество полученных сиквенсов на образец). Достоверность различий между группами образцов оценивали методом PERMANOVA (Adonis). Построение графа анализа главных координат (PCOA) проводили с помощью пакета QIIME2. Для сравнения относительного процентного содержания отдельных бактериальных таксономических единиц в микробиомах сопоставляемых групп использовали показатель размера эффекта линейного дискриминантного анализа (LEFse) (Segata et al., 2011).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с применением пакета программ STATISTICA.10 (Statsoft, США). Оценку количественных показателей осуществляли посредством вычисления средних значений (M). Для оценки достоверности различий относительного процентного содержания отдельных бактериальных таксонов в образцах применяли ранговый U-тест Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Для устранения эффекта множественных

сравнений при оценке значимости различий использовали поправку False Discovery Rate (FDR). Для оценки взаимосвязей между содержанием отдельных бактерий в мокроте пациентов с наличием сопутствующих заболеваний, курением, употреблением алкоголя, местом жительства, профессиональных вредных факторов применяли метод множественного регрессионного анализа.

Результаты

В ходе секвенирования области V3-V4 гена 16S рРНК в мокроте идентифицировано в общей сложности девять типов бактерий с относительной частотой выше 0.1 %. Преобладающими типами бактерий в микробиомах пациентов с ПРЛ, пациентов с АКЛ и в контроле были *Bacillota* и *Bacteroidota*, которые вместе составляли около 70 % общей микробиоты. В целом относительное процентное содержание, а также соотношение доминантных бактериальных типов в мокроте оказалось близким к параметрам, описанным ранее для микробиома мокроты у больных РЛ (Hosgood et al., 2014; Huang et al., 2019).

Для оценки альфа-разнообразия использован индекс Шеннона. Результаты анализа показали отсутствие различий между сопоставляемыми выборками пациентов и здоровыми донорами (рис. 1). Вместе с тем значимое снижение альфа-разнообразия по индексу Пиелу (evenness) было обнаружено в мокроте пациентов с АКЛ и с ПРЛ по сравнению с контролем (тест Краскела–Уоллиса; $p = 0.0001$). При этом не было достоверных различий в равномерности между разными гистологическими типами РЛ (рис. 2).

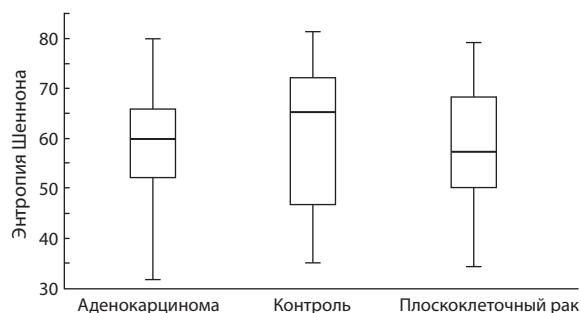


Рис. 1. Индекс разнообразия Шеннона микробиомов пациентов с аденокарциномой, плоскоклеточным раком легкого и контрольных доноров.

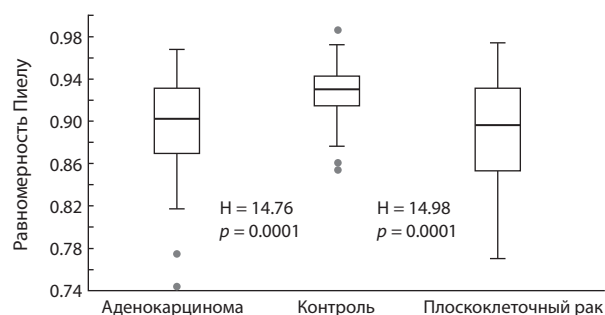


Рис. 2. Индекс Пиелу микробиомов пациентов с аденокарциномой, плоскоклеточным раком легкого и контрольных доноров.

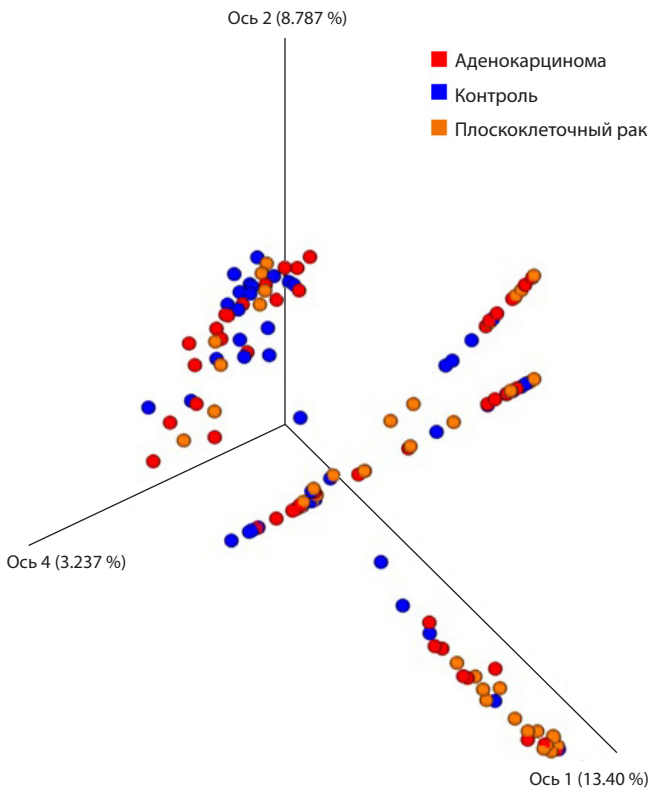


Рис. 3. Трехмерная диаграмма, построенная методом анализа главных компонент, демонстрирующая филогенетическое разнообразие прокариотических сообществ в мокроте пациентов с аденокарциномой, плоскоклеточным раком легкого и контрольных доноров.

Различия в структуре бактериальных сообществ (бета-разнообразии) в образцах мокроты больных АКЛ, ПРЛ и здоровых лиц оценивали с помощью теста PERMANOVA (Адониса), используя матрицу различий, построенную по методу Брэя–Кёртиса (рис. 3). Анализ показал, что различия в бета-разнообразии имеются только между сообществами ПРЛ и контроля (псевдо-F = 3.89; $p = 0.007$).

Различия в таксономическом составе бактерий между исследуемыми выборками были изучены с помощью линейного дискриминантного анализа (LEFse), который дает возможность оценить размер эффекта представленности различных бактерий. Метод LEFse позволил выявить значимое увеличение представительства отдельных бактериальных таксонов в мокроте больных с ПРЛ по сравнению с аденокарциномой легкого. Это относится, в частности, к типу *Bacillota*, классу *Bacilli* и роду *Streptococcus* (рис. 4). Сопоставление таксономического состава пациентов с ПРЛ и здоровых доноров показало увеличение содержания в мокроте больных представителей типов *Bacillota* и *Pseudomonadota*, класса *Bacilli*, родов *Streptococcus*, *Rothia*, *Bacillus*, *Macellibacteroides* и др. (рис. 5). Существенно меньшим оказалось число бактериальных таксонов, по которым LEFse-анализ обнаружил различия между здоровыми донорами и пациентами с АКЛ (рис. 6). Конкретно, в мокроте здоровых лиц найдено увеличение содержания представителей порядка *Clostridiales*, класса *Clostridia* и рода *Moryella*, тогда как у пациентов с АКЛ

увеличено представительство порядка *Flavobacteriales* и класса *Flavobacteriia*.

Метод множественного регрессионного анализа (МРА) был использован для оценки возможных связей между содержанием отдельных бактерий в мокроте больных ПРЛ с целым рядом других факторов, потенциально способных повлиять на состав микробиоты. Помимо значимых для ПРЛ родов бактерий (*Streptococcus*, *Rothia*, *Bacillus*, *Macellibacteroides*), модели МРА включили пол, возраст пациентов, сопутствующие заболевания, курение, употребление алкоголя, место жительства и наличие профессиональных вредных факторов (см. табл. 1). В результате установлено, что среди изученных конфаундеров только наличие сердечно-сосудистых заболеваний (ишемия, гипертоническая болезнь и др.), хронических бронхитов и/или хронической обструктивной болезни легких было связано с плоскоклеточным раком легкого.

Отдельно было изучено влияние возраста и статуса курения на состав микробиоты у пациентов и в контрольной группе. Корреляционный анализ (Спирмена) обнаружил значимое увеличение с возрастом содержания представителей рода *Prevotella* в мокроте пациентов с АКЛ ($p = 0.0196$) и пациентов с ПРЛ ($p = 0.0274$) (рис. 7). Одновременно с этим у пациентов с АКЛ наблюдается положительная корреляция возраста с содержанием представителей родов *Atopobium* ($p = 0.03$) и *Leptotrichia* ($p = 0.03$). Для контрольных доноров выявлены увеличение с возрастом содержания бактерий из родов *Porphyromonas* ($p = 0.01$) и *Veillonella* ($p = 0.045$) и одновременно – уменьшение содержания представителей родов *Lachnoanaerobaculum* ($p = 0.02$), *Stomatobaculum* ($p = 0.006$) и *Oribacterium* ($p = 0.02$).

Статус курения не оказывал никакого влияния на состав микробиома мокроты у пациентов с аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком легкого. Для выборки контроля обнаружено увеличение содержания *Streptococcus* в мокроте курящих доноров по сравнению с некурящими (20.87 против 15.16 %; $p = 0.0007$), а также достоверное уменьшение содержания *Neisseria* в мокроте курильщиков (2.75 против 5.68 %; $p = 0.001$).

Отдельный интерес представляет вопрос о возможном влиянии стадии опухолевого процесса на состав бактерий в мокроте. В табл. 2 сведены результаты сопоставления процентного содержания бактериальных таксонов, значительно различающихся между пациентами с НМРЛ, находящимися на I–II и III–IV стадиях заболевания. Из данных этого анализа следует, что в мокроте пациентов на поздних стадиях опухолевого процесса наблюдается увеличение содержания бактерий, относящихся к четырем родам.

Первичная локализация опухоли при РЛ может быть еще одним фактором, потенциально способным влиять на состав бактериальной микробиоты респираторного тракта. Поэтому было выполнено сопоставление среднего процентного содержания родов бактерий в мокроте пациентов с центральным НМРЛ и периферическим НМРЛ (табл. 3).

Как следует из результатов анализа, центральная локализация опухоли сопровождается увеличением представителей рода *Bacteroides*. В то же время у пациентов с пери-

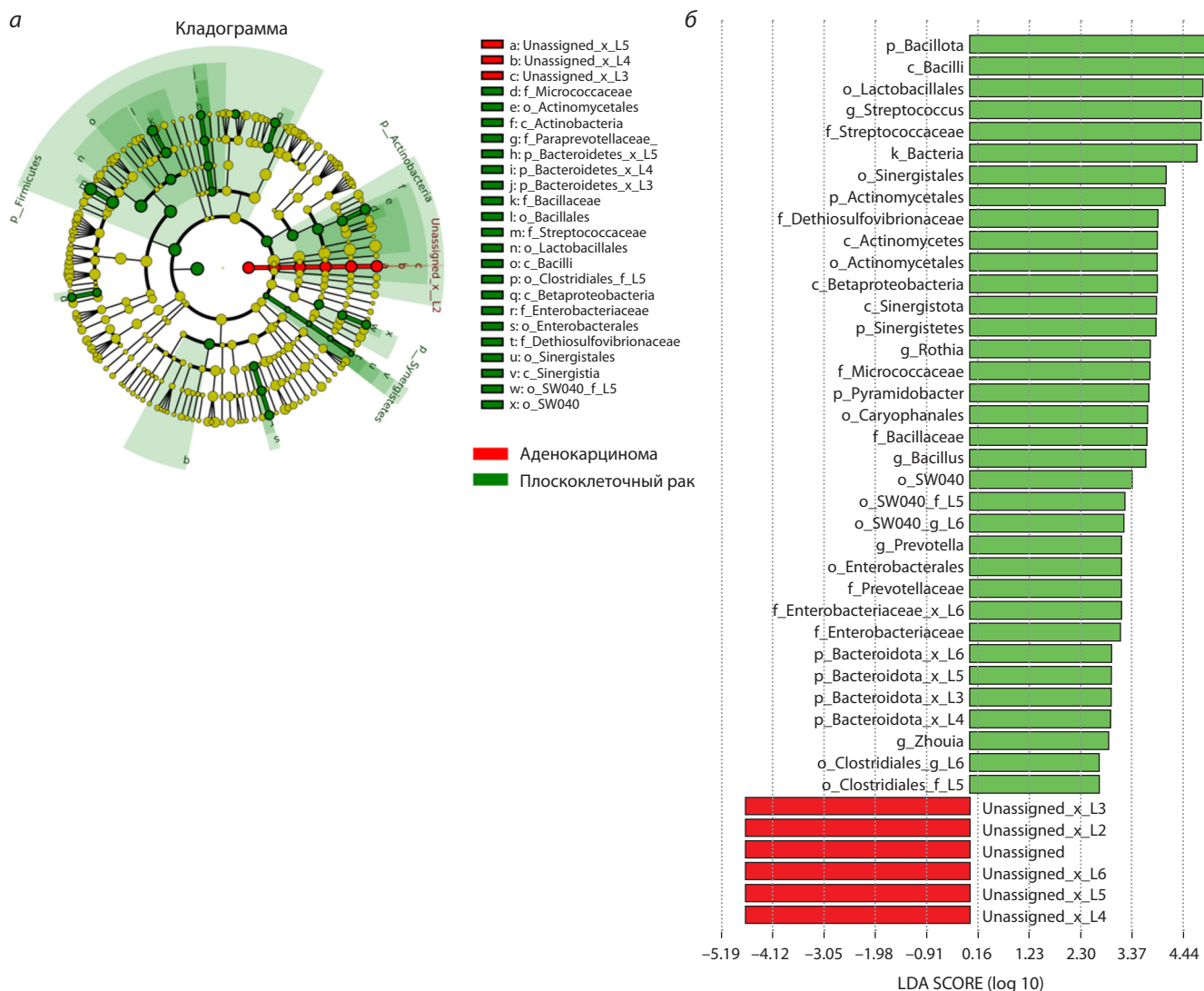


Рис. 4. Разная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты пациентов с плоскоклеточным раком и аденокарциномой легкого.

Здесь и на рис. 5 и 6: а – кладограмма, дающая представление о близости различающихся таксономических групп; б – график, показывающий результаты LEFse-анализа; LDA – линейный дискриминантный анализ.

ферическим НМРЛ наблюдается увеличение содержания бактерий рода *Veillonella* по сравнению с центральной локализацией опухоли (12.79 % против 7.99 %; $p = 0.01$).

Обсуждение

Различия в таксономическом составе бактериального микробиома респираторного тракта человека уже признаны важным патогенетическим фактором рака легкого (Maddi et al., 2019; Yagi et al., 2021), однако до настоящего времени вопрос о значении микрофлоры у пациентов с разными гистологическими типами НМРЛ остается открытым. Здесь мы сопоставили таксономический состав микробиома в образцах мокроты пациентов с двумя наиболее распространенными формами НМРЛ – аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого.

Согласно результатам предыдущих исследований, респираторная микробиота больных РЛ имеет тенденцию к снижению альфа-разнообразия по сравнению со здоровы-

ми людьми, в то время как бета-разнообразие существенно не отличается (Lee et al., 2016; Liu N.N. et al., 2020). Эта же тенденция отмечена для микробиомов пораженных и непораженных раком тканей легкого (Kim et al., 2022).

Сведений о сходстве или различиях между параметрами разнообразия сообществ дыхательных путей и тканей легкого пациентов с разными гистологическими типами РЛ к настоящему времени немного, и эти результаты противоречивы. В частности, альфа-разнообразие микробиома оказалось выше в мокроте больных АКЛ по сравнению с ПРЛ, и было также обнаружено значимое различие в бета-разнообразии между этими группами, но сопоставляемые выборки были слишком малы (6 и 7 случаев соответственно) (Ran et al., 2020). В другом исследовании показано, что микробиота бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) более разнообразна в ПРЛ, чем при АКЛ (Gomes et al., 2019). Никаких различий в альфа-разнообразии, как и в бета-разнообразии микробиомов из образцов мокроты

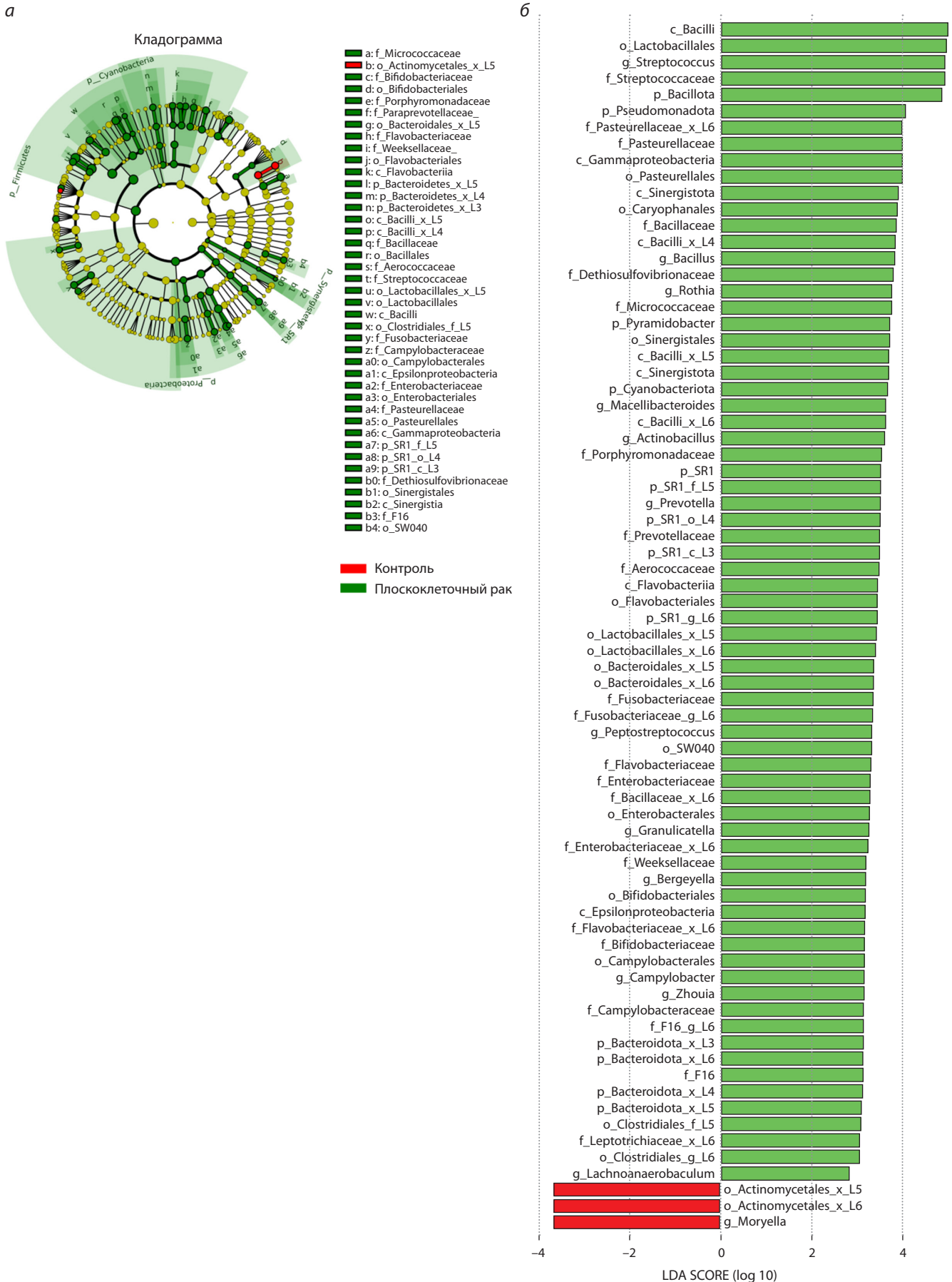


Рис. 5. Разная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты пациентов с плоскоклеточным раком и здоровых доноров.

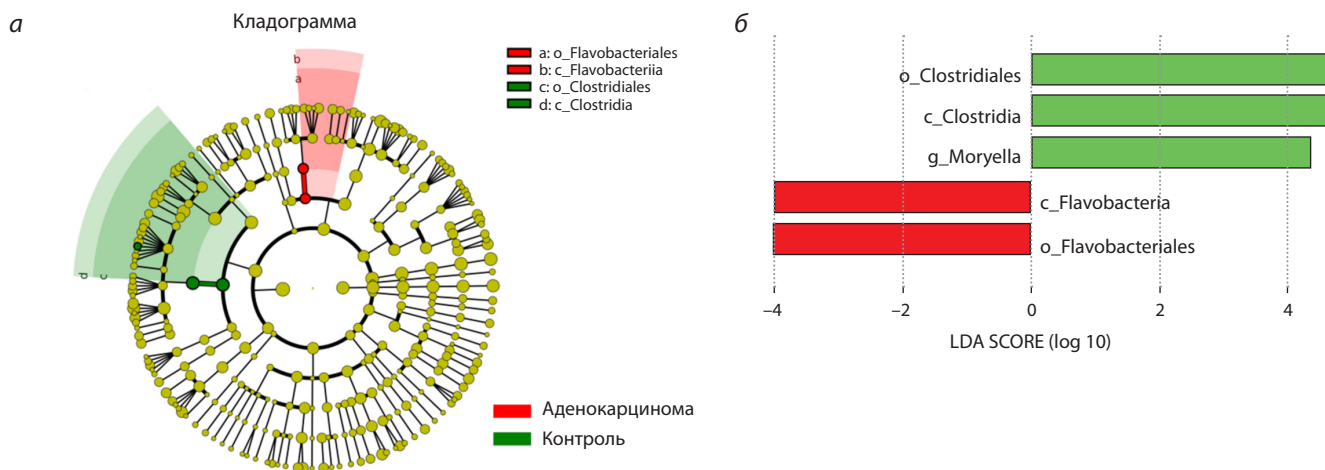


Рис. 6. Разная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты пациентов с аденокарциномой легкого и здоровых доноров.

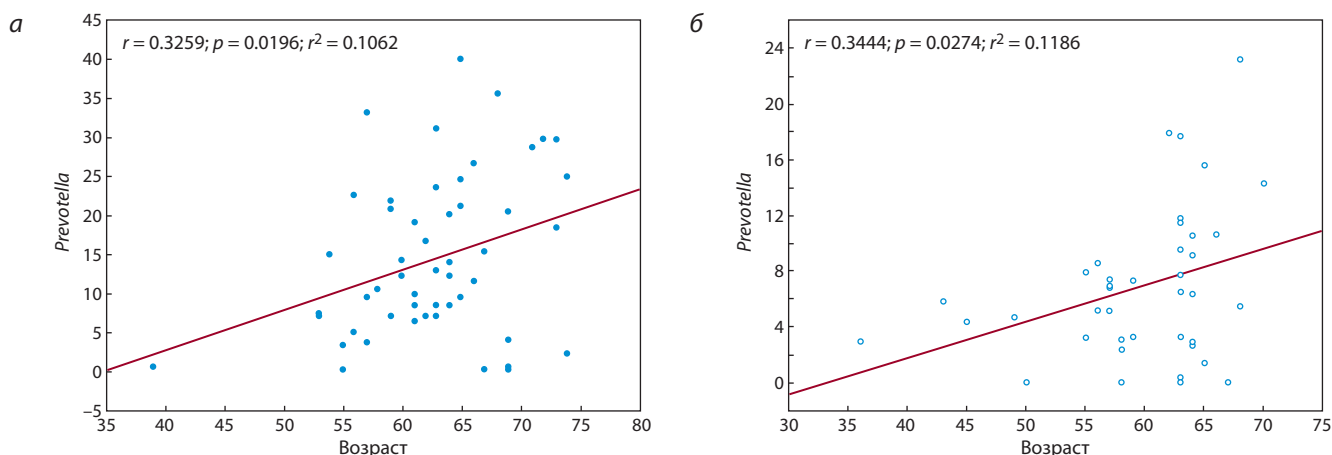


Рис. 7. Содержание представителей *Prevotella* в мокроте больных аденокарциномой легкого (а) и плоскоклеточным раком легкого (б) в зависимости от возраста.

Таблица 2. Среднее процентное содержание таксонов бактерий в микробиоме мокроты больных немелкоклеточным раком легкого на разных стадиях заболевания

| Род бактерий | I–II (n = 60), M, % | III–IV (n = 44), M, % | p* |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------|
| <i>Porphyromonas</i> | 3.09 | 3.99 | 0.004* |
| <i>Alloprevotella</i> | 1.75 | 3.86 | 0.002* |
| <i>Selenomonas</i> | 1.1 | 1.4 | 0.007* |
| <i>Megasphaera</i> | 0.88 | 1.45 | 0.03 |
| <i>Oribacterium</i> | 0.48 | 0.72 | 0.01* |
| <i>Filifactor</i> | 0.05 | 0.09 | 0.03 |

* Здесь и в табл. 3: значение p меньше, чем значение p с поправкой на FDR.

и БАЛ, не выявлено между выборками больных с АКЛ и ПРЛ (Huang et al., 2019). Микробиом тканей опухолей пациентов с АКЛ не отличался по альфа-разнообразию от ПРЛ, хотя в группе аденокарцином было зафиксировано достоверное увеличение содержания грамположительных бактерий (Kovaleva et al., 2020).

Таблица 3. Среднее процентное содержание таксонов бактерий в микробиоме мокроты больных немелкоклеточным раком легкого с различной локализацией опухоли

| Род бактерий | Центральный рак легкого (n = 31), M, % | Периферический рак легкого (n = 68), M, % | p |
|-----------------------|--|---|--------|
| <i>Veillonella</i> | 8.76 | 12.79 | 0.01* |
| <i>Bacillus</i> | 3.52 | 1.87 | 0.03 |
| <i>Granulicatella</i> | 1.63 | 0.94 | 0.04 |
| <i>Bacteroides</i> | 1.62 | 0.52 | 0.002* |
| <i>Oribacterium</i> | 0.43 | 0.18 | 0.03 |

Наше исследование показало, что значения индекса Шеннона, отражающего видовое богатство микробиоты, близки в сопоставляемых когортах пациентов и контрольных доноров. Существенное снижение в обеих когортах пациентов по сравнению с контролем отмечено для индекса равномерности (evenness), основанного на

измерении относительной численности различных видов в сообществе и являющегося одной из метрик, характеризующих альфа-разнообразие. Структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) между АКЛ и ПРЛ также были близкими, однако согласно матрице, построенной по методу Брэя–Кёртиса, различия имелись между сообществами бактерий пациентов с ПРЛ и здоровыми субъектами, но не между АКЛ и контролем (см. рис. 3). Таким образом, наше исследование показало, что α - и β -разнообразие бактериальных сообществ мокроты пациентов с разными гистологическими типами являются схожими. Тем не менее следует отметить, что микробиом пациентов с ПРЛ значительно отличается от микробиома здоровых людей.

Для ответа на вопрос о различиях между составами микробиома мокроты в когортах пациентов с разными гистологическими типами РЛ нами был использован метод LEFse, который наиболее часто применяется в микробиомных исследованиях. Анализ LEFse позволил идентифицировать различия между сравниваемыми выборками пациентов (см. рис. 4). Мокрота больных ПРЛ имела значимое обогащение представителями *Bacillota* (род *Streptococcus* и *Bacillus*) и *Actinomycetota* (род *Rothia*) при сопоставлении с образцами пациентов с аденокарциномой. Сравнение состава респираторного микробиома в группах пациентов с ПРЛ и здоровых субъектов также дало возможность выявить ряд значимых различий. По итогам анализа LEFse (см. рис. 5) в мокроте пациентов по сравнению с контролем повышено содержание представителей филумов *Bacillota* и *Pseudomonadota*; родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rothia*, *Macellibacteroides*, *Prevotella*, *Actinobacillus* и *Peptostreptococcus*. У здоровых участников исследования отмечено увеличение представительства отряда *Actinomycetales* и рода *Moryella*.

Несколько предыдущих исследований показало, что состав бактериальной микробиоты в респираторном тракте больных РЛ может быть гистологически зависим. Например, Q. Leng с коллегами (2021) использовали цифровую капельную ПЦР для анализа 25 родов бактерий, ассоциируемых обычно с НМРЛ, в мокроте 17 больных НМРЛ и 10 здоровых субъектов. В мокроте пациентов с ПРЛ обнаружено значимое увеличение содержания представителей родов *Acidovorax*, *Streptococcus*, *H. pylori* и *Veillonella*, тогда как повышенное обилие *Capnocytophaga* найдено в мокроте больных аденокарциномой. Эти же бактериальные биомаркеры мокроты затем были подтверждены в когорте, состоящей из 69 случаев НМРЛ и 79 контрольных доноров. В другом исследовании изучена связь между микрофлорой слюны и раком легкого. Были секвенированы образцы ДНК 20 больных РЛ (10 ПРЛ и 10 АКЛ) и контрольных субъектов ($n = 10$) (Yan et al., 2015). На уровне бактериальных родов содержание *Capnocytophaga*, *Selenomonas* и *Veillonella* было повышено как при АКЛ, так и при плоскоклеточном раке, а *Neisseria* было снижено как при аденокарциноме легкого так и при плоскоклеточном раке легкого.

В нашем исследовании пациенты с ПРЛ имели значимое увеличение содержания представителей родов *Streptococcus*, *Bacillus* и *Rothia* по сравнению с аденокарциномой. В мокроте больных АКЛ по сравнению с ПРЛ, как и

в предыдущем исследовании (Leng et al., 2021), имелось увеличение содержания *Capnocytophaga* (1.46 против 1.08 %), однако эти различия не были достоверны. Таким образом, можно констатировать с одной стороны, что две основные гистологические формы РЛ имеют различающиеся респираторные микробиомы, однако, с другой стороны, нет единого набора бактериальных таксонов, маркирующих эти различия. Возможно, этот факт отражает исходно неодинаковый состав бактерий, населяющих дыхательный тракт пациентов с НМРЛ, проживающих в разных регионах мира, т. е. является следствием действия экологических факторов (Costello et al., 2012).

Важная находка, полученная в результате данного исследования, – существенная разница содержания бактериальных таксонов в микробиоме мокроты у больных с разными гистологическими формами РЛ по сравнению со здоровыми субъектами. Если для ПРЛ выявляется значимое обогащение в мокроте представителей родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rothia*, *Macellibacteroides*, *Prevotella*, *Actinobacillus* и *Peptostreptococcus* (см. рис. 5), то для выборки пациентов с аденокарциномой не обнаружено каких-либо существенных различий в составе бактерий по сравнению с контролем (см. рис. 6). Этот факт означает, что поиск метагеномных биомаркеров, связанных с РЛ, может быть корректным только при раздельном анализе состава микробиоты в зависимости от гистологической принадлежности опухоли.

Размер выборок, использованных в нашем исследовании, позволил изучить, помимо гистологического типа опухоли, другие отдельные факторы (возраст, статус курения, стадию злокачественного процесса, локализацию опухоли), потенциально способные влиять на состав микробиоты при немелкоклеточном раке легкого. Интересным представляется однонаправленное увеличение с возрастом содержания представителей рода *Prevotella*, которое было зарегистрировано в обеих выборках пациентов (см. рис. 7). Это не согласуется с результатами исследования образцов БАЛ у больных НМРЛ, где в подгруппе больных старше 60 лет регистрировали снижение содержания *Prevotella* (*P. oryzae*) по сравнению с более молодыми пациентами (Zheng et al., 2021).

Сравнение состава микробиома мокроты у курящих и некурящих пациентов с ПРЛ и АКЛ не показало никаких различий в составе бактерий. Вместе с тем в группе контроля отмечено увеличение содержания *Streptococcus*, а также заметное снижение *Neisseria* в мокроте курильщиков по сравнению с некурящими, что согласуется с ранее опубликованными результатами (Huang, Shi, 2019; Ying et al., 2022). Примечателен тот факт, что в верхних отделах желудочно-кишечного тракта у курильщиков также наблюдаются увеличение представительства *Streptococcus* и снижение *Neisseria* по сравнению с некурящими донорами (Shanahan et al., 2018). Согласно последним данным (Halдар et al., 2020), влияние курения на микробиоту мокроты остается неясным и требует дальнейшего изучения.

Оценка возможного влияния стадии НМРЛ на структуру микробиома мокроты показала, что в мокроте пациентов на поздних стадиях опухолевого процесса наблюдается увеличение содержания бактерий, относящихся к родам *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Selenomonas*, *Megasphaera*,

Oribacterium и *Filifactor*. У больных НМРЛ с центральным раком легкого было увеличено содержание в мокроте бактерий из рода *Bacteroides*. В то же время у пациентов с периферическим раком легкого отмечено увеличение содержания *Veillonella* по сравнению с центральной локализацией опухоли. Эти результаты следует считать предварительными, так как анализ был выполнен для суммарной выборки пациентов без учета гистологического типа немелкоклеточного рака легкого.

Заключение

Проведен сравнительный анализ таксономического состава бактериального микробиома мокроты больных с двумя основными гистологическими типами НМРЛ и здоровых доноров мокроты на основе последовательности участка гена, кодирующего 16S рРНК, идентифицированной с использованием технологии массового параллельного секвенирования. Выявлены значимые различия в содержании представителей целого ряда родов бактерий в мокроте пациентов с плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой легкого. В частности, присутствие *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rothia* и других родов повышено в мокроте больных ПРЛ по сравнению со здоровыми субъектами.

Представленные результаты требуют подтверждения в независимых крупномасштабных исследованиях для дальнейшего понимания роли микробиоты мокроты в развитии немелкоклеточного рака легкого. Кроме того, поиск бактериальных «сигнатур», связанных риском развития рака легкого, требует полногеномного секвенирования для получения точной оценки таксономического состава на видовом уровне.

Список литературы / References

- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., ... Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019;37(8):852-857. DOI 10.1038/s41587-019-0209-9
- Cameron S.J.S., Lewis K.E., Huws S.A., Hegarty M.J., Lewis P.D., Pachebat J.A., Mur L.A.J. A pilot study using metagenomic sequencing of the sputum microbiome suggests potential bacterial biomarkers for lung cancer. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177062. DOI 10.1371/journal.pone.0177062
- Chen Y., Wu F.H., Wu P.Q., Xing H.Y., Ma T. The role of the tumor microbiome in tumor development and its treatment. *Front. Immunol.* 2022;13:935846. DOI 10.3389/fimmu.2022.935846
- Cheng C., Wang Z., Wang J., Ding C., Sun C., Liu P., Xu X., Liu Y., Chen B., Gu B. Characterization of the lung microbiome and exploration of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 2020;9(3):693-704. DOI 10.21037/tlcr-19-590
- Cheng T.Y., Cramb S.M., Baade P.D., Youlden D.R., Nwogu C., Reid M.E. The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics. *J. Thorac. Oncol.* 2016;11(10):1653-1671. DOI 10.1016/j.jtho.2016.05.021
- Chiu C.Y., Miller S.A. Clinical metagenomics. *Nat. Rev. Genet.* 2019;20(6):341-355. DOI 10.1038/s41576-019-0113-7
- Costello E.K., Stagaman K., Dethlefsen L., Bohannan B.J., Relman D.A. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science.* 2012;336(6086):1255-1262. DOI 10.1126/science.1224203
- Druzhinin V.G., Matskova L.V., Demenkov P.S., Baranova E.D., Volobaev V.P., Minina V.I., Apalko S.V., Churina M.A., Romanyuk S.A., Shcherbak S.G., Ivanov V.I., Larionov A.V. Taxonomic diversity of sputum microbiome in lung cancer patients and its relationship with chromosomal aberrations in blood lymphocytes. *Sci. Rep.* 2020;10(1):9681. DOI 10.1038/s41598-020-66654-x
- Druzhinin V.G., Matskova L.V., Demenkov P.S., Baranova E.D., Volobaev V.P., Minina V.I., Larionov A.V., Titov V.A., Fucic A. Genetic damage in lymphocytes of lung cancer patients is correlated to the composition of the respiratory tract microbiome. *Mutagenesis.* 2021;36(2):143-153. DOI 10.1093/mutage/geab004
- Goldstraw P. New staging system: How does it affect our practice? *J. Clin. Oncol.* 2013;31(8):984-991. DOI 10.1200/JCO.2012.42.7922
- Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Suceana M., Sousa C., Vaz Rodrigues L., Teixeira G., Pinto P., Tavares de Abreu T., Bárbara C., Semedo J., Mota L., Carvalho A.S., Matthiesen R., Pereira L., Seixas S. Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2019;9(1):12838. DOI 10.1038/s41598-019-49195-w
- Haldar K., George L., Wang Z., Mistry V., Ramshah M.Y., Free R.C., John C., Reeve N.F., Miller B.E., Tal-Singer R., Webb A.J., Brookes A.J., Tobin M.D., Singh D., Donaldson G.C., Wedzicha J.A., Brown J.R., Barer M.R., Brightling C.E. The sputum microbiome is distinct between COPD and health, independent of smoking history. *Respir. Res.* 2020;21(1):183. DOI 10.1186/s12931-020-01448-3
- Hasegawa A., Sato T., Hoshikawa Y., Ishida N., Tanda N., Kawamura Y., Kondo T., Takahashi N. Detection and identification of oral anaerobes in intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *Microbiol. Immunol.* 2014;58(7):375-381. DOI 10.1111/1348-0421.12157
- Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(13):1367-1380. DOI 10.1056/NEJMra0802714
- Hosgood H.D. 3rd, Sapkota A.R., Rothman N., Rohan T., Hu W., Xu J., Vermeulen R., He X., White J.R., Wu G., Wei F., Mongodin E.F., Lan Q. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ. Mol. Mutagen.* 2014;55(8):643-651. DOI 10.1002/em.21878
- Hosgood H.D. 3rd, Mongodin E.F., Wan Y., Hua X., Rothman N., Hu W., Vermeulen R., Seow W.J., Rohan T., Xu J., Li J., He J., Huang Y., Yang K., Wu G., Wei F., Shi J., Sapkota A.R., Lan Q. The respiratory tract microbiome and its relationship to lung cancer and environmental exposures found in rural China. *Environ. Mol. Mutagen.* 2019;60(7):617-623. DOI 10.1002/em.22291
- Huang C., Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J. Transl. Med.* 2019;17(1):225. DOI 10.1186/s12967-019-1971-7
- Huang D., Su X., Yuan M., Zhang S., He J., Deng Q., Qiu W., Dong H., Cai S. The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology. *Am. J. Cancer Res.* 2019;9(9):2047-2063
- Kim O.H., Choi B.Y., Kim D.K., Kim N.H., Rho J.K., Sul W.J., Lee S.W. The microbiome of lung cancer tissue and its association with pathological and clinical parameters. *Am. J. Cancer Res.* 2022;12(5):2350-2362
- Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., Samoilova D., Petrenko A., Zborovskaya I., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y., Plotnikov A., Gratchev A. 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
- Lee S.H., Sung J.Y., Yong D., Chun J., Kim S.Y., Song J.H., Chung K.S., Kim E.Y., Jung J.Y., Kang Y.A., Kim Y.S., Kim S.K., Chang J., Park M.S. 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
- Leng Q., Holden V.K., Deepak J., Todd N.W., Jiang F. Microbiota biomarkers for lung cancer. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(3):407. DOI 10.3390/diagnostics11030407

- Liu H.X., Tao L.L., Zhang J., Zhu Y.G., Zheng Y., Liu D., Zhou M., Ke H., Shi M.M., Qu J.M. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects. *Int. J. Cancer*. 2018;142(4):769-778. DOI 10.1002/ijc.31098
- Liu N.N., Ma Q., Ge Y., Yi C.X., Wei L.Q., Tan J.C., Chu Q., Li J.Q., Zhang P., Wang H. Microbiome dysbiosis in lung cancer: from composition to therapy. *NPJ Precis. Oncol.* 2020;4(1):33. DOI 10.1038/s41698-020-00138-z
- Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(12):8228-8235. DOI 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Maddi A., Sabharwal A., Violante T., Manuballa S., Genco R., Patnaik S., Yendamuri S. The microbiome and lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 2019;11(1):280-291. DOI 10.21037/jtd.2018.12.88
- Mao Q., Jiang F., Yin R., Wang J., Xia W., Dong G., Ma W., Yang Y., Xu L., Hu J. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Lett.* 2018;415:40-48. DOI 10.1016/j.canlet.2017.11.036
- Molina J.R., Yang P., Cassivi S.D., Schild S.E., Adjei A.A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 2008;83(5):584-594. DOI 10.4065/83.5.584
- Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70(11):5607-5612. DOI 10.1099/ijsem.0.004332
- 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 Epidemiol. Biomark. Prev.* 2019;28(4):731-740. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-18-0966
- Ran Z., Liu J., Wang F., Xin C., Shen X., Zeng S., Song Z., Xiong B. Analysis of pulmonary microbial diversity in patients with advanced lung cancer based on high-throughput sequencing technology. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2020;23(12):1031-1038. DOI 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.103.16 (in Chinese)
- Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W.S., Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60. DOI 10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Shanahan E.R., Shah A., Koloski N., Walker M.M., Talley N.J., Morrison M., Holtmann G.J. Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota. *Microbiome.* 2018;6(1):150. DOI 10.1186/s40168-018-0531-3
- Tsao M.S., Yoon J.Y. The eighth TNM classification for lung cancer – What is next? *Lung Cancer.* 2018;121:97-98. DOI 10.1016/j.lungcan.2018.04.018
- Tsay J.J., Wu B.G., Badri M.H., Clemente J.C., Shen N., Meyn P., Li Y., Yie T.A., Lhakhang T., Olsen E., Murthy V., Michaud G., Sulaiman I., Tsigos A., Heguy A., Pass H., Weiden M.D., Rom W.N., Sterman D.H., Bonneau R., Blaser M.J., Segal L.N. Airway microbiota is associated with upregulation of the PI3K pathway in lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2018;198:1188-1198. DOI 10.1164/rccm.201710-2118OC
- Wang K., Huang Y., Zhang Z., Liao J., Ding Y., Fang X., Liu L., Luo J., Kong J. A preliminary study of microbiota diversity in saliva and bronchoalveolar lavage fluid from patients with primary bronchogenic carcinoma. *Med. Sci. Monit.* 2019;25:2819-2834. DOI 10.12659/MSM.915332
- Wu Y., Jiao N., Zhu R., Zhang Y., Wu D., Wang A.J., Fang S., Tao L., Li Y., Cheng S., He X., Lan P., Tian C., Liu N.N., Zhu L. Identification of microbial markers across populations in early detection of colorectal cancer. *Nat. Commun.* 2021;12(1):3063. DOI 10.1038/s41467-021-23265-y
- Xavier J.B., Young V.B., Skufca J., Ginty F., Testerman T., Pearson A.T., Macklin P., ... Johnson W.E., Jobin C., Ridlon J.M., Koh A.Y., Yu M., Kelly L., Wargo J.A. The cancer microbiome: distinguishing direct and indirect effects requires a systemic view. *Trends Cancer.* 2020;6(3):192-204. DOI 10.1016/j.trecan.2020.01.004
- Yagi K., Huffnagle G.B., Lukacs N.W., Asai N. The lung microbiome during health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10872. DOI 10.3390/ijms221910872
- Yan X., Yang M., Liu J., Gao R., Hu J., Li J., Zhang L., Shi Y., Guo H., Cheng J., Razi M., Pang S., Yu X., Hu S. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2015;5(10):3111-3122
- Ying K.L., Brasky T.M., Freudenheim J.L., McElroy J.P., Nickerson Q.A., Song M.A., Weng D.Y., Wewers M.D., Whiteman N.B., Mathe E.A., Shields P.G. Saliva and lung microbiome associations with electronic cigarette use and smoking. *Cancer Prev. Res. (Phila).* 2022;15(7):435-446. DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-21-0601
- Zhang W., Luo J., Dong X., Zhao S., Hao Y., Peng C., Shi H., Zhou Y., Shan L., Sun Q., Li Y., Zhao X. Salivary microbial dysbiosis is associated with systemic inflammatory markers and predicted oral metabolites in non-small cell lung cancer patients. *J. Cancer.* 2019;10(7):1651-1662. DOI 10.7150/jca.28077
- Zheng L., Sun R., Zhu Y., Li Z., She X., Jian X., Yu F., Deng X., Sai B., Wang L., Zhou W., Wu M., Li G., Tang J., Jia W., Xiang J. Lung microbiome alterations in NSCLC patients. *Sci. Rep.* 2021;11(1):11736. DOI 10.1038/s41598-021-91195-2
- Zhuo M., An T., Zhang C., Wang Z. Characterization of microbiota in cancerous lung and the contralateral non-cancerous lung within lung cancer patients. *Front. Oncol.* 2020;10:1584. DOI 10.3389/fonc.2020.01584

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00022P).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2023. После доработки 21.07.2023. Принята к публикации 23.07.2023.