

## Nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžiu sergančiųjų mikrobiomas, imuninių žymenų raiška bei kriobiopsijos diagnostinė vertė

MICROBIOME, IMMUNE MARKERS, AND CRYOBIOPSY DIAGNOSTIC YIELD IN THE PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

VYTAUTAS ANKUDAVIČIUS  
LSMU MA Pulmonologijos klinika

**Santrauka.** 2024 m. gegužės 23 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto viešajame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje Vytautas Ankudavičius sėkmingai apgynė daktaro disertaciją „Nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžiu sergančiųjų mikrobiomas, imuninių žymenų raiška bei kriobiopsijos diagnostinė vertė“. Disertacija rengta 2019–2023 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Pulmonologijos klinikoje. Šiame straipsnyje pateikiami pagrindiniai disertacijos rezultatai.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Marius Žemaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacijos gynimo taryba:

prof. dr. Elona Juozaitytė (Lietuvos sveikatos mokslo universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

doc. dr. Asta Dambrauskienė (Lietuvos sveikatos mokslo universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

doc. dr. Audrius Ivanauskas (Lietuvos sveikatos mokslo universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

prof. dr. Edvardas Danila (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

prof. dr. Alan Altraja (Tartu universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Summary.** Vytautas Ankudavičius successfully defended a doctoral dissertation “Microbiome, immune markers, and cryobiopsy diagnostic yield in the patients with non-small cell lung cancer” at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on May 23, 2024. The Dissertation has been prepared at the Department of Pulmonology of the Faculty of Medicine of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2019–2023 year. The article presents the main results of the dissertation.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Marius Žemaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The Defense Council:

Prof. Dr. Elona Juozaitytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Assoc. Prof. Dr. Asta Dambrauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Assoc. Prof. Dr. Audrius Ivanauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Prof. Dr. Edvardas Danila (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Prof. Dr. Alan Altraja (University of Tartu, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1483>

### IVADAS

Plaučių vėžys yra viena dažniausių mirties priežasčių Europoje, Azijoje ir Amerikoje. Kasmet nuo šios ligos pasaulyje miršta apie 1,6–1,7 mln. žmonių [1]. Mokslininkai atlieka naujus tyrimus ieškodami dar neatrastų vėžio patogenezės grandžių, mole-

kulinių mechanizmų bei ankstyvos diagnostikos ir gydymo būdų. Periferinių plaučių pažeidimų (PPP) diagnostika yra viena svarbiausių plaučių tyrimų sričių, nes periferiniai plaučių pažeidimai yra vieni iš dažniausiai nustatomų pokyčių krūtinės ląstos rentgenogramoje ir kompiuterinės tomografijos (KT)

tyrimais. Morfologinis ir radiologinis šių pokyčių vertinimas yra sudėtingas ir kompleksinis procesas dėl plataus spektro patologijų – nuo nepiktybinių ligų iki plaučių vėžio. Ankstyva periferinių plaučių pažeidimų ir plaučių vėžio diagnostika yra viena iš prioritetinių sveikatos sistemos sričių [2, 3]. Transbronchinė plaučių darinio biopsija yra diagnostikos standartas, tačiau diagnostinė tyrimo vertė yra santykinai maža [4–6]. Transbronchinė žnyplinė plaučių biopsija (TBŽB), kontroliuojama endobronchinio ultragarso radialinio daviklio (EBUG-RD), gali diagnostinę tyrimo vertę padidinti beveik iki 73 proc. [7], tačiau šio tyrimo diagnostinė vertė sumažėja iki 40 proc., kai EBUG-RD yra ekscentrinėje padėtyje darinio atžvilgiu [8]. Elektromagnetinės navigacinės bronchoskopijos (ENB) diagnostinė tyrimo vertė yra apie 88 proc. diagnozuojant PPP, tačiau ENB prieinamumas yra ribotas dėl brangios medicininės įrangos ir vienkartinių priemonių išsigijimo kainos [9]. Alternatyvi didelės diagnostinės vertės procedūra yra transtorakalinė biopsija, kontroliuojant KT, tačiau ši procedūra gali sukelti gana daug komplikacijų, kurių dažnis siekia 23–27 proc. [6, 10, 11]. Transbronchinė plaučių kriobiopsija (TBKB) yra santykinai naujas intersticinių plaučių ligų diagnostikos metodas [12], turintis didelę diagnostinę vertę (80–96 proc.) ir ganėtinai mažą komplikacijų dažnį (3–26 proc.) [13, 14]. Dėl šių priežasčių transbronchinė kriobiopsija bei įvairios šios procedūros modifikacijos (EBUG-RD, rentgenoskopija ir kt.) yra aktyviai tyrinėjamos diagnozuojant periferinius plaučių pažeidimus, ypač plaučių vėžį. Iki šiol atlikti tik keli šios srities bandomieji tyrimai [15, 16].

Šiuo metu viena labiausiai tyrinėjamų ir naujausių mokslo kryptių yra žmogaus mikrobiomo įtaka plaučių vėžio patogenezei, gydymo galimybėms ir išgyvenamumo rodikliams. Pradiniais mikrobiomo tyrimais nustatytas ryšys tarp specifinių mikroorganizmų rūšių ir įvairių ligų, įskaitant vėžį [17–19]. Naujausi moksliniai kvėpavimo takų tyrimai rodo, kad tam tikros bakterijų rūšys gali būti susijusios su plaučių vėžio atsiradimu [20–25]. Vis tik duomenys yra prieštaringi, nes tos pačios bakterijų rūšys gali būti ir normaliosios kvėpavimo takų mikrofloros dalimi [26, 27]. Naujausiuose tyrimuose nustatytas ryšys tarp programuoto ląstelės mirties ligando 1 (PD-L1) raiškos navikiniame audinyje, klinikinio atsako į gydymą imunoterapija ir žmogaus žarnyno mikrobiomo sudėties pokyčių sergant vėžiu. Šie duomenys rodo, kad mikrobiomas ir PD-L1 raiška navikiniame audinyje gali būti laikoma prognostiniu imunoterapijos veiksmu. Deja, šiuo metu nėra žinoma, kaip žarnyno ir plaučių mikrobiomas sąveikauja su imuninėmis ląstelėmis naviko mikroadplinkoje [28, 29]. Sąsajos tarp plaučių mikrobiomo kompozicijos, klinikinio

duomenų ir molekulinio žymenų tirtos tik nedaugelyje nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžio (NSLPV) sergančių pacientų tyrimų [30–32].

Apibendrinant, šie duomenys suteikia tvirtą pagrindą tolesniems moksliniams tyrimams, kuriuose būtų tiriami nauji intervencinių tyrimų arba esamų tyrimų deriniai. Taip pat šie tyrimai galėtų padėti pagerinti periferinių plaučių pažeidimų diagnostiką bei žarnyno ir plaučių mikrobiomo sudėties pokyčius sergant NSLPV.

Tyrimo tikslas – įvertinti nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžio sergančių pacientų transbronchinės kriobiopsijos diagnostinę vertę ir saugumą, taip pat žarnyno ir plaučių mikrobiomo ašį ir imuninius žymenis.

#### **Tyrimo uždaviniai:**

1. Įvertinti transbronchinės kriobiopsijos diagnostinį tikslumą, jautrumą, specifiškumą, teigiamą ir neigiamą prognostinę vertę bei saugumą, atliekant šią procedūrą kontroliuojant EBUG-RD ir rentgenoskopija pacientams, kuriems nustatytas PPP.
2. Nustatyti NSLPV sergančių pacientų plaučių ir žarnyno mikrobiomo alfa ir beta įvairovę bei palyginti ją su kontroline grupe.
3. Ištirti sąsajas tarp žarnyno ir plaučių mikrobiomo ašies, klinikinių duomenų bei imuninių žymenų (PD-L1 raiškos ir CD8+ T limfocitų skaičiaus navikiniame plaučių audinyje, interleukino 17, lipopolisacharido, C reaktyviojo baltymo kiekio bei neutrofilų ir limfocitų santykio periferiniame kraujyje).
4. Nustatyti sąsajas tarp žarnyno ir plaučių mikrobiomo ašies, imuninių žymenų bei NSLPV sergančių pacientų išgyvenamumo rodiklių.

#### **Tyrimo naujumas**

Transbronchinė kriobiopsija – tai santykinai naujas intersticinių plaučių ligų diagnostikos metodas, turintis didelę diagnostinę vertę (80–96 proc.) ir sukeliantis mažai komplikacijų (3–26 proc.) [33]. Dėl šios priežasties transbronchinė kriobiopsija, atliekant ją su rentgenoskopija ir (arba) kontroliuojant EBUG-RD, yra aktyviai tyrinėjama diagnozuojant periferinius plaučių pažeidimus ir plaučių vėžį [34]. Iki šiol atlikta mažai mokslinių šios srities tyrimų, o jų duomenys yra riboti dėl mažos tiriamųjų imties.

Pastaraisiais metais atsiradusi ir išpopuliarėjusi naujos kartos genomo sekoskaitos technologija leido pradėti naują kvėpavimo takų tyrimų erą. Šie pasiekimai atskleidė reikšmingus kvėpavimo takų mikrobiomos pokyčius tarp sveikų savanorių ir piktybiniais navikais sergančių tiriamųjų [35]. Vis tik moksliniuose tyrimuose aprašoma mikrobiomos sudėtis tarp panašių sveikatos būklių yra gana skirtinga [36]. Dėl šios priežasties supratimas apie plaučių ir žarnyno mikrobiomos sudėtį, tarpusavio ryšį bei sąveiką, sergant įvairiomis patologijomis, įskaitant ir plaučių vėžį, yra gana ribotas.

# Disertacijos

Turimais duomenimis, tai yra pirmasis tyrimas, kuriame analizuojama transbronchinės kriobiopsijos diagnostinė vertė ir saugumas, žarnyno ir plaučių mikrobiomo ašies, klinikinių duomenų bei imuninių žymenų sąveika sergant NSLPV.

## METODAI IR TYRIMO EIGA

Tyrimas atliktas 2019–2023 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Pulmonologijos, Patologinės anatomijos klinikose ir Virškinimo sistemos tyrimų institute, gavus Kauno regiono biomedicininę tyrimų etikos komiteto leidimą (protokolo Nr. BE-2-51). Tyrimas taip pat buvo užregistruotas Jungtinių Amerikos Valstijų Nacionalinio sveikatos instituto tyrimų registre (Nr. NCT05164445).

Visi į tyrimą įtraukti asmenys susipažino ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Šis tyrimas sudarytas iš dviejų dalių – intervencinės ir mikrobiomo. Intervencinėje tyrimo dalyje iš viso dalyvavo 200 pacientų, kuriems krūtinės ląstos kompiuterine tomografija nustatytas PPP, įtartinas kaip navikinis plaučių darinys. Atrankos metu 98 pacientai buvo neįtraukti į tyrimą, nes procedūros metu per 30 min. EBUG-RD nevizualizuotas periferinis plaučių pažeidimas. Kitiems pacientams (n = 102) atlikta TBŽB, iš kurių 48 pacientams, kuriems nebuvo kontraindikacijų, papildomai atlikta ir transbronchinė kriobiopsija (1 pav.).

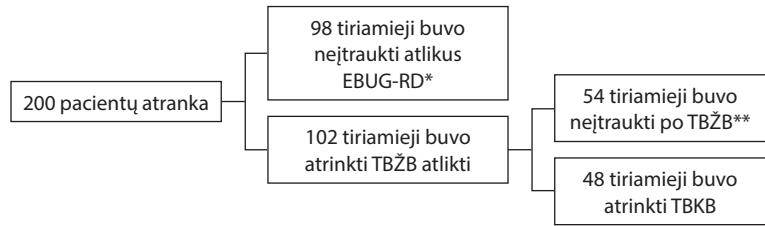
Mikrobiomo tyrimo dalyje dalyvavo 100 pacientų, kuriems įtartas plaučių vėžys ir kurie per pastaruosius 6 mėn. nevartojo antibiotikų. Į šį tyrimą taip pat įtraukta 50 kontrolinės grupės savanorių, kurie per pastaruosius penkerius metus nesirgo onkologine liga ir 6 mėn. iki įtraukimo į tyrimą nevartojo antibiotikų (2 pav.). Tiriant išmatų mikrobiomą, kontrolinės grupės mėginiai – sveikų savanorių išmatų mėginiai, o tiriant plaučių mikrobiomą, kontrolinės grupės mėginiai – plaučių parenchimos biopsijos (nenavikinis plaučių audinys).

Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Vyrai ir moterys, kurių amžius yra 18–99 metai.
2. Pacientai, kuriems radiologiškai nustatytas PPP, įtartinas kaip plaučių vėžys.
3. Kontrolinė grupė – sveiki savanoriai, nesergantys vėžiu, uždegiminėmis arba infekcinėmis ligomis.
4. Pacientai, kurie perskaitė ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą.

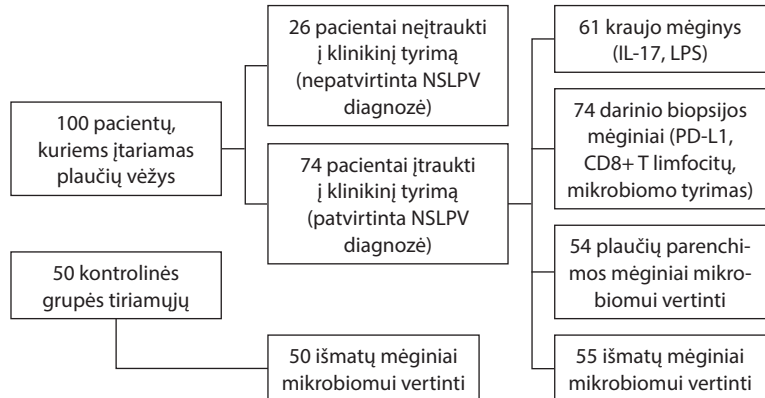
Neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Antibiotikų vartojimas per pastaruosius 6 mėn.
2. Ūminė infekcija.
3. Nėštumas.



1 pav. Intervencinės tyrimo dalies algoritmas

EBUG-RD – endbronchinis ultragarsas radialinis daviklis; TBKB – transbronchinė kriobiopsija; TBŽB – transbronchinė žnyplinė biopsija. \* Tiriant 30 min. EBUG-RD nevizualizuojamas periferinis plaučių pažeidimas. \*\* Remiantis papildomais neįtraukimo kriterijais.



2 pav. Mikrobiomo tyrimo dalies algoritmas

IL-17 – interleukinas 17; LPS – lipopolisacharidas; PD-L1 – programuotos ląstelių žūties ligandas 1; CD8+ T limfocitai – citotoksiniai T limfocitai; NSLPV – nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys.

4. Diagnozuota onkologinė liga per pastaruosius penkerius metus.
5. Socialiai pažeidžiamos grupės pacientai (pacientai, turintys protinę negalią, nuteistieji ir kt.).
6. Kraujavimo sutrikimai ir koagulopozija.
7. Tiriant 30 min. EBUG-RD nevizualizuojamas PPP.
8. Šalia darinio nustatytos stambios kraujagyslės, kurių skersmuo didesnis nei trys milimetrai, vertinant KT tyrimo duomenis.
9. Pacientai, kuriems dėl sveikatos būklės negalima atlikti bronchoskopijos taikant bendrinę nejautrą (pagal ASA (angl. *American Society of Anesthesiologists*) – 4–6 klasės).

Papildomi neįtraukimo į TBKB pacientų grupę kriterijai:

1. Neįmanoma įkišti kriozondo ir (arba) endbronchinio blokatoriaus į bronchus, kurie yra susiję su PPP.
2. Po TBŽB atsiradęs didelis kraujavimas, kuriam sustabdyti prireikė papildomos intervencijos.
3. Sunki hipoksemija, kai dalinis deguonies slėgis (pO<sub>2</sub>) nesiekė 60 mm Hg.
4. Sunki hiperkapnija, kai dalinis anglies dioksido slėgis (pCO<sub>2</sub>) viršijo 50 mm Hg.
5. Plaučių difuzinė geba anglies monoksidui (DLCOc), kuri 35 proc. mažesnė nei numatyta vertė.

6. Forsuoto iškvėpimo tūris per pirmą sekundę (FEV<sub>1</sub>) viršija 800 ml arba FEV<sub>1</sub> nesiekia 30 proc. numatytos vertės.

Visos transbronchinės biopsijos atliktos naudojant bendrinę nejautra, intubavus pacientus 8,5 skersmens nelanksčiu bronchoskopu („KARL STORZ Endoscope“, Tuttingenas, Vokietija). Kitos procedūros atliktos naudojant lankstų vaizdo fibrobronchoskopą („BF-H190“, „Olympus Evis Exera III“, „Olympus“, Tokijas, Japonija), rentgenoskopiją („Philips BV Pulsera Fluoroscopy C-arm“, Tokijas, Japonija) ir kontroliuojant EBUG-RD, be kreipiamojo apvalkalo. Nustačius PPP, esant EBUG-RD, biopsijos vieta papildomai pažymima rentgenoskopo ekrane, o radialinis daviklis pašalinamas. TBŽB atlikta naudojant lankstų fibrobronchoskopą, turintį 2,0 mm skersmens darbinį kanalą ir vienkartines standartines ovalias biopsijos žnyples („Olympus“, Tokijas, Japonija). Žnyplės buvo įkišamos į anksčiau pažymėtą biopsijos vietą ir, kontroliuojant rentgenoskopu, paimama 10–12 biopsijos gabaliukų. Jei nėra komplikacijų ir kontraindikacijų po TBŽB, toliau atliekama kriobiopsija. Endobronchinis blokatorius („Olympus“, Tokijas, Japonija) selektyviai įstumiamas į pasirinktą broncho segmentą, susijusį su PPP. Tada 1,1, 1,7 arba 1,9 mm skersmens kriozondas („ERBE CRYO2“ sistema, Tiubingenas, Vokietija) įkišamas į biopsijos vietą per bronchoskopo darbinį kanalą. Kriozondo skersmens pasirinkimas pagrįstas PPP vieta plaučiuose. Pavyzdžiui, jei PPP lokalizuotas viršutinėje skiltyje, naudojamas 1,1 mm skersmens kriozondas, nes jį lengviau įkišti į viršutinės skilties bronchus, palyginti su 1,7 arba 1,9 mm skersmens kriozondu. Siekiant įsitikinti, kad kriozondas yra

tinkamoje biopsijos vietoje, jo padėtis papildomai patikrinama rentgenoskopu. Tęsiant procedūrą, kriozondas šaldomas vidutiniškai 4–11 sek. ir staigiu judesiu ištraukiamas kartu su fibrobronchoskopu. Iškart po šio manevro išpučiamas endobronchinis blokatorius, siekiant sustabdyti galimą kraujavimą. Minėtos manipuliacijos atliekamos pakartotinai, kad būtų paimti 1–6 gabalėliai kriobiopsijos. Kriozondo šaldymo trukmė parenkama pagal kriozondo skersmenį ir gautos biopsijos dydį. Kriobiopsijų skaičius šiame tyrime pagrįstas mėginio dydžiu, numanomomis komplikacijomis ir jų galimu valdymu po kriobiopsijos.

Transbronchinė plaučių parenchimos biopsija atlikta naudojant lankstų fibrobronchoskopą ir vienkartines standartines ovalias biopsijos žnyples. Šios procedūros metu rentgenoskopija naudojama siekiant užtikrinti, kad biopsija būtų paimta iš struktūriškai nepakitusių plaučių audinio dalies, esančios daugiau nei 5 cm nuotoliu nuo PPP biopsijos vietos. Procedūros metu paimami ne mažiau kaip penki plaučių parenchimos mėginiai. Kiekvienos transbronchinės procedūros metu naudojamos naujos vienkartinės priemonės.

PPP mėginiai histologiniam tyrimui sudedami į du skirtingus mėgintuvėlius su 10 proc. formalino tirpalu (pirmas mėgintuvėlis skirtas TBŽB, antras – kriobiopsijai) ir išsiunčiami patologiniam tyrimui. Po histologinio tyrimo vertinimo, patvirtinus NSLPV diagnozę, navikiniame plaučių audinyje papildomai analizuojama PD-L1 raiška ir CD8+ T ląstelių kiekis. Dalis PPP ir plaučių parenchimos biopsijos mėginių iškart perkeliama į du skirtingus sterilius mėgintuvėlius ir užšaldomi –80 °C temperatūroje, kad vėliau juos

1 lentelė. Transbronchinių biopsijų diagnostikos rodiklių palyginimas pagal skirtingus parametrus

Parametrai	TBŽB (n = 48)			TBKB (n = 48)			Kompleksinės procedūros (n = 48)		
	Jautrumas (proc.)	NPV (proc.)	Tikslumas (proc.)	Jautrumas (proc.)	NPV (proc.)	Tikslumas (proc.)	Jautrumas (proc.)	NPV (proc.)	Tikslumas (proc.)
<b>EBUG-RD padėtis</b>									
Šalia pažeidimo	64,3	9,1	82,1	85,7a	20	92,8	86,2b	25	94,6
Pažeidimo	88,9	33,3	94,4	94,4	50	97,2	100	100	100
<b>Pažeidimo dydis</b>									
≤ 3,0 cm	73,1	12,5	86,5	88,5	25	94,2	92,3c	33,3	96,2
> 3,0 cm	75	16,7	87,5	85	25	92,5	95	50	97,5
≤ 2,0 cm	72,7	0	N/A	90,9	0	N/A	100	0	N/A
> 2,0 cm	74,3	18,2	87,1	85,7	28,6	92,9d	91,4e	40	95,7f
<b>Broncho požymis</b>									
Nėra	58,3	28,6	75	75	40	87,5g	83,3	50	91,7h
Yra	79,4	0	N/A	91,2	0	N/A	100j	0	N/A

cm – centimetrai; EBUG-RD – endobronchinis ultragarsas radialinis daviklis; n – tiriamųjų skaičius; NPV – neigiama prognostinė vertė; TBŽB – transbronchinė žnyplinė biopsija; TBKB – transbronchinė kriobiopsija. p – statistinio reikšmingumo lygmuo; N/A – plotas po ROC kreive neapskaičiuotas; a – p = 0,07 TBKB, palyginti su TBŽB; b – p = 0,016 sudėtinės procedūros, palyginti su TBŽB; c – p = 0,063 kompleksinės procedūros, palyginti su TBŽB; d – p = 0,031 TBKB, palyginti su TBŽB; e – p = 0,021 kompleksinės procedūros, palyginti su TBŽB; f – p = 0,031 kompleksinės procedūros, palyginti su TBŽB; g – p = 0,07 TBKB, palyginti su TBŽB; h – p = 0,07 kompleksinės procedūros, palyginti su TBŽB; j – p = 0,002 kompleksinės procedūros, palyginti su TBŽB.

# Disertacijos

būtų galima naudoti mikrobiomo tyrimui ir tolesnei duomenų analizei.

Siekiant išsamiau įvertinti mikrobiomą, surinkti 55 išmatų mėginiai iš NSLPV sergančių pacientų ir 50 išmatų mėginių iš kontrolinės grupės savanorių. Mėginiai iškart perkelti į skirtingus sterilius mėgintuvėlius ir užšaldyti  $-80^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, kad vėliau juos būtų galima naudoti mikrobiomui tirti ir tolesnei analizei atlikti.

Iš NSLPV sergančių pacientų papildomai paimta kraujo, siekiant nustatyti lipopolisacharido, interleukino 17, C reaktyviojo baltymo kiekius, limfocitų ir neutrofilų santykį periferiniame kraujyje.

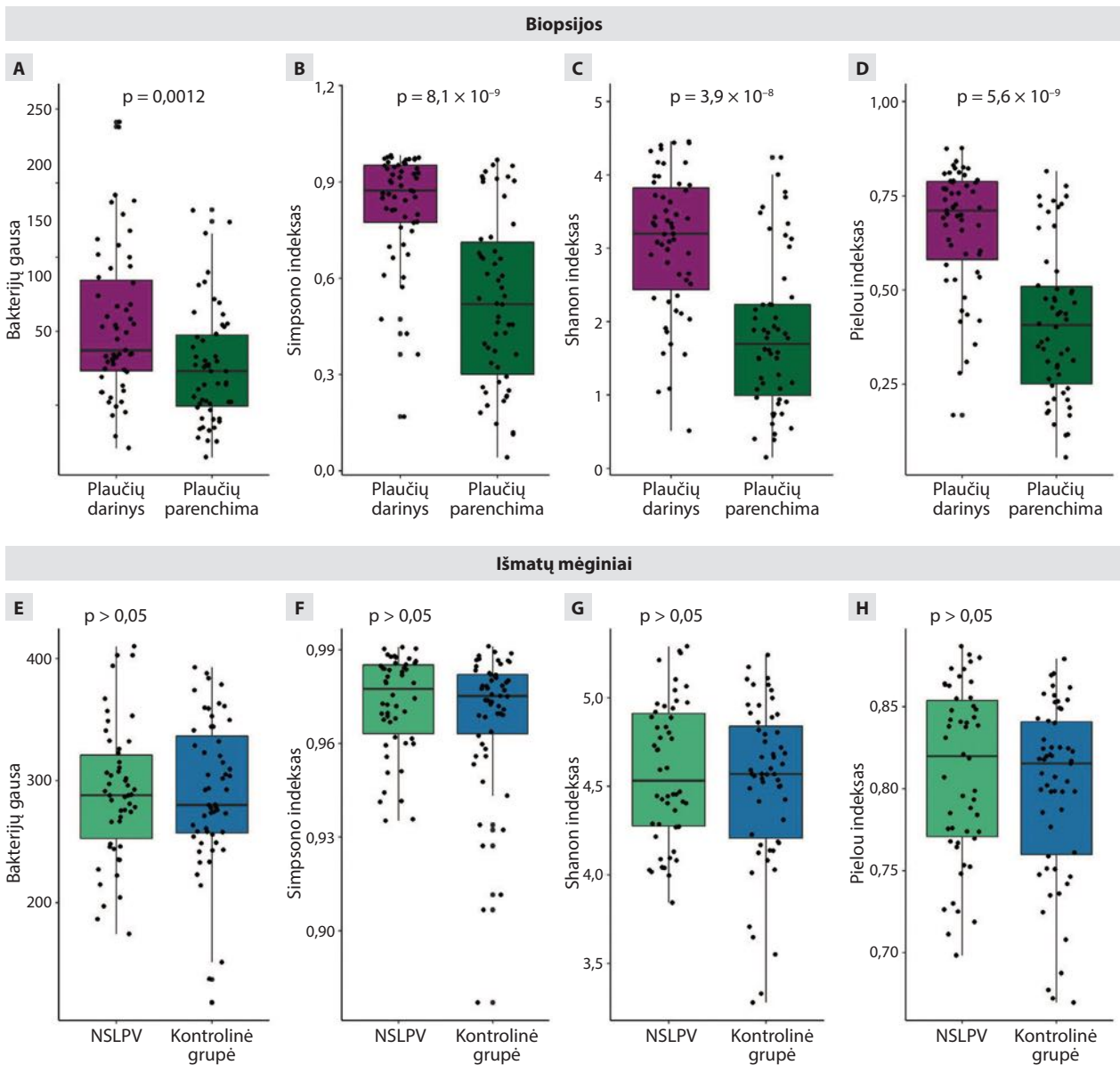
Iš plaučių naviko, plaučių parenchimos ir išmatų mėginių išskirta bakterijų deoksiribonukleorūgštis (DNR), naudojant komercinius rinkinius pagal

gamintojo instrukcijas („Thermo Fisher Scientific“, Masačusetas, JAV). Sudarant 16S rRNR bibliotekas naudojami 16S rRNR geno 27A ir 338R pradmenys, kurie pagausinti polimerazinės grandininės reakcijos metodu. „MiSeq“ platforma naudojama V1–V2 regionų sekai nustatyti ( $2 \times 300$  bp, „Illumina“, Kalifornija, JAV). Bioinformatinė ir statistinė analizė atlikta naudojant „R“ bei „SPSS“ programinių įrangų paketus.

## REZULTATAI

### Intervencinė tyrimo dalis

TBŽB ir TBKB atliktos 48 pacientams, kuriems radiologiniais tyrimais įtartas periferinis plaučių vėžys. Vidutinis pacientų amžius šioje pacientų grupėje – 69 metai. Dauguma tiriamųjų buvo rūkantys vyrai. Didžioji dalis PPP lokalizuoti viršutinėse plaučių skytelyse.



3 pav. Plaučių biopsijų ir išmatų mėginių alfa įvairovės palyginimas: biopsijų mėginiai (A–D); išmatų mėginiai (E–H)

NSLPV – nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys. p – statistinio reikšmingumo lygmuo.

Be to, daugiau nei 50 proc. šių pažeidimų skersmuo buvo mažesnis nei 3,0 cm. Transbronchinių procedūrų diagnostikos rodikliai išanalizuoti pagal šiuos kriterijus: EBUG-RD padėtis PPP atžvilgiu, PPP dydis bei bronchų požymio buvimas KT tyrimo vaizduose. Išsamūs rezultatai pateikiami 1 lentelėje.

Šiame tyrime taip pat vertintas transbronchinių biopsijų saugumas ir galimos komplikacijos. Iš viso užregistruotos šešios komplikacijos, įvykusios atliekant transbronchines biopsijas: keturiems pacientams (8,33 proc.) nustatytas lengvas kraujavimas po TBŽB ir dviem pacientams (4,16 proc.) nustatytas vidutinio sunkumo kraujavimas po TBKB. Po atliktų intervencijų nė vienam pacientui nenustatytas sunkus kraujavimas, pneumotoraksas, ūminis kvėpavimo nepakankamumas arba nekonstatuota mirtis.

## Mikrobiomo tyrimo dalis

Atlikta išsami bakterijų įvairovės analizė, siekiant nustatyti alfa ir beta įvairovės pokyčius NSLPV sergančių pacientų mėginiuose (navikiniame plaučių audinyje, parenchimoje ir išmatose), atsižvelgiant į demografinius veiksnius, rūkymo įpročius, lėtinę obstrukcinę plaučių ligą (LOPL), histologinį naviko tipą bei ligos stadiją, PD-L1 raiškos lygį bei CD8+ T ląstelių skaičių navikiniame audinyje, lipopolisacharido, interleukino 17 kiekį serume, C reaktyviojo baltymo kiekį serume, neutrofilų ir limfocitų santykį periferiniame kraujyje bei išgyvenamumo duomenis.

Atlikus alfa įvairovės analizę, nustatyta, kad plaučių navikiniame audinyje bakterijų gausa, įvairovė ir homogeniškumas buvo didesni, palyginti su plaučių parenchimos mėginiais (3 pav.).

Išmatų mėginių alfa įvairovės analizė nerodo reikšmingų skirtumų tarp NSLPV sergančių pacientų ir kontrolinės grupės tiriamųjų, tačiau bakterijų kompozicija išmatų mėginiuose tarp NSLPV sergančių pacientų ir kontrolinės grupės tiriamųjų buvo skirtinga (4 pav.).

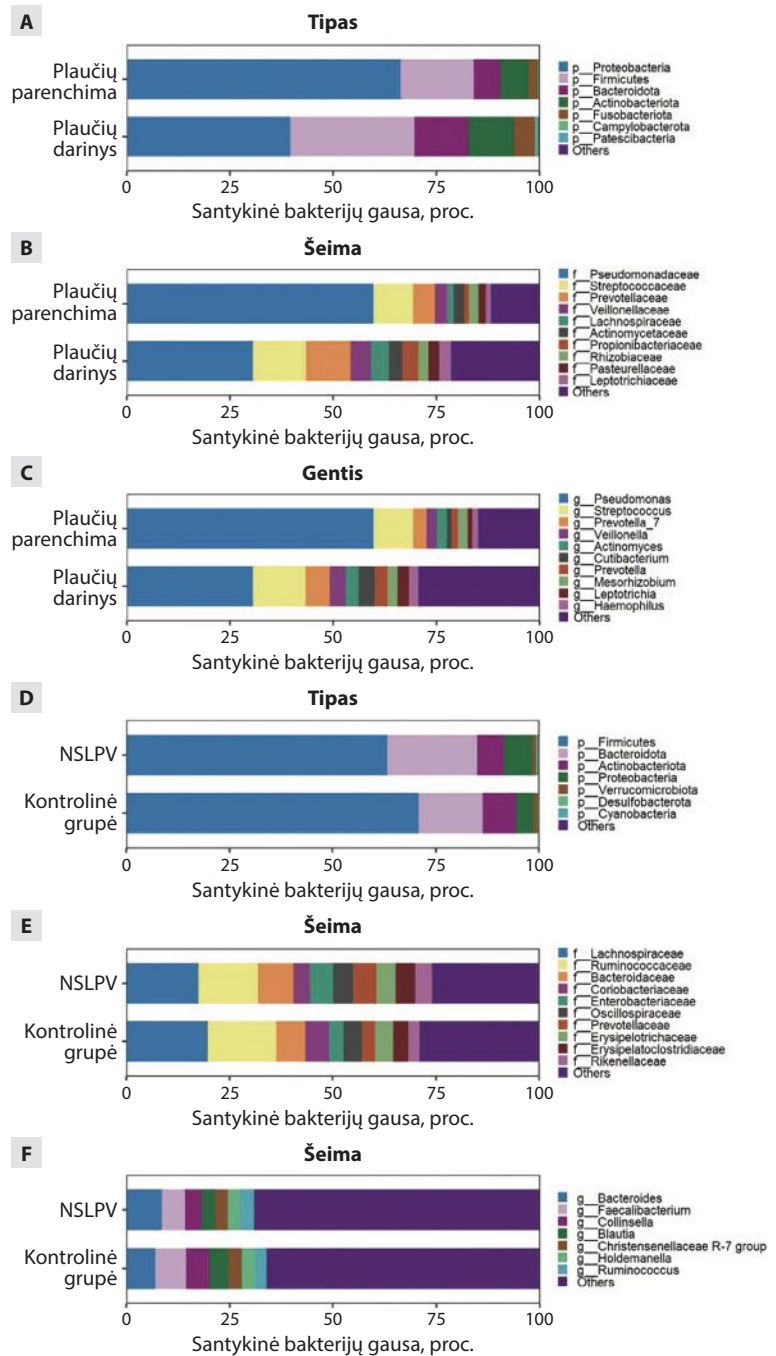
Išsanaizavus alfa įvairovę tarp žarnyno ir plaučių ašies bakterijų, nenustatyta statistškai reikšmingų skirtumų. Beta įvairovės analizė parodė teigiamą koreliaciją tarp *Romboutsia* ir *Alistipes* bakterijų (geno lygmeniu) NSLPV sergančių pacientų plaučių naviko biopsijos ir išmatų mėginių.

Plaučių navikinio audinio mėginiai, paimti iš rūkančių asmenų, papildyti *Alloprevotella tanneriae* ir *Streptococcus salivarius*,

o išmatų mėginiai – *Ruminococcus*, *Holdemanella*, *Sellimonas*, *Solobacterium* ir *Succinivibrio*.

Plaučių navikinio audinio mėginiai, paimti iš plokščiųjų ląstelių karcinoma sergančių pacientų, papildyti *Neisseria subflava*, o NSLPV pacientų, sergančių adenokarcinoma, išmatų mėginiai – *Dialister*, *Ligilactobacillus*, *Haemophilus*, *Megasphaera*, *Veillonella* ir *Butyrivibrio crossotus*.

*Streptococcus* ir *Actinomyces* bakterijos papildė navikinius plaučių audinius, jei NSLPV sergantiems



4 pav. Bakterijų kompozicijos diagrama: biopsijų mėginiai (A–C); išmatų mėginiai (D–F)

NSLPV – nesmulkiųjų ląstelių plaučių vėžys; proc. – procentai.

# Disertacijos

pacientams diagnozuota ankstyva ligos stadija, o *Neisseria* – navikinius plaučių audinius, sergant įsisenėjusia ligos stadija. NSLPV sergančių pacientų išmatų mėginiai papildyti *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia-Shigella*, *Lachnospiraceae* bakterijomis, esant labiau išplitusiai ligos stadijai.

Plaučių navikiniai audiniai papildyti *Lachnospirales*, *Burkholderiales*, *Christensenellales* ir *Staphylococcales*, jei CD8+ T ląstelių skaičius didesnis už medianą.

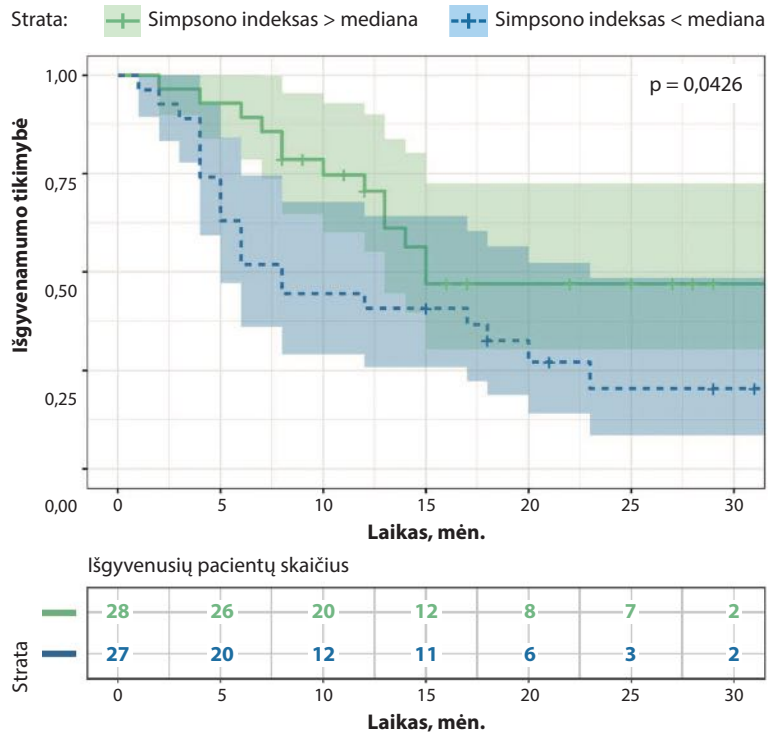
Plaučių navikiniai audiniai papildyti *Corynebacterium* ir *Streptococcus salivarius*, jei lipopolisacharido kiekis yra didesnis, o NSLPV sergančių pacientų išmatų mėginiai papildyti *Hungatella*, jei lipopolisacharido kiekis yra mažesnis.

Bakterijų gausa plaučių navikiniame audinyje atitinkamai mažesnė, kai PD-L1 raiška atitinkamai didesnė. Plaučių navikiniai audiniai, kurių PD-L1 raiška mažesnė, papildyti *Neisseria* ir *Streptococcus infantis*, o išmatų mėginiai, kurių PD-L1 raiška didesnė, papildyti *Olsenella*, *Erysipelotrichaceae* UCG-006, *Parasutterella*, *Klebsiella pneumoniae*.

Atlikus NSLPV sergančių pacientų išgyvenamumo analizę, nustatyta statistiškai reikšminga koreliacija tarp bakterijų įvairovės išmatų mėginiuose Simpsono indekso ir bendro išgyvenamumo (5 pav.). NSLPV sergančių pacientų, kurių Simpsono įvairovės indeksas buvo didesnis už medianą, palyginti su tais, kurių Simpsono indeksas buvo mažesnis už medianą, išgyvenamumas buvo statistiškai reikšmingai ilgesnis ( $p = 0,0426$ ).

## IŠVADOS

1. TBKB, atliekama kontroliuojant rentgenoskopija ir EBUG-RD, yra saugi procedūra, kuri turi labai didelę diagnostinę vertę, palyginti su TBŽB, diagnozuojant PPP ir plaučių vėžį. TBKB ir TBŽB derinys gali dar labiau padidinti bendrą procedūrų jautrumą ir diagnostinį tikslumą, įskaitant ir tuos atvejus, kai PPP yra ekscentrinėje padėtyje EBUG-RD atžvilgiu.
2. Atlikus alfa įvairovės analizę, nustatyta, kad NSLPV sergančių pacientų plaučių naviko audiniuose bakterijų gausa, įvairovė ir homogeniškumas buvo didesni, palyginti su plaučių parenchimos mėginiais. Bakterijų kompozicija išmatų mėginiuose tarp NSLPV sergančių pacientų ir kontrolinės grupės tiriamųjų buvo skirtinga, tačiau alfa įvairovės analizė reikšmingų skirtumų neparodė. NSLPV sergančių pacientų beta įvai-



5 pav. Kaplan-Meier išgyvenamumo analizė, atsižvelgiant į Simpsono indeksą NSLPV sergančių pacientų išmatų mėginiuose

mėn. – mėnesiai; p – statistinio patikimo lygmuo.

rovės analizė parodė skirtingą plaučių navikų ir parenchimos bakterijų kompoziciją, kaip ir tarp NSLPV sergančių pacientų ir kontrolinės grupės išmatų mėginių.

3. NSLPV sergančių pacientų žarnyno ir plaučių mikrobiomo ašyje nustatytas teigiamas ryšys tarp dviejų bakterijų *Romboutsia* ir *Alistipes* genčių lygmeniu. Mažesnė alfa įvairovė, rodanti bakterijų gausumą, siejama su didesne PD-L1 raiška NSLPV sergančių pacientų navikiniame plaučių audinyje. Be to, beta įvairovės analizė atskleidė specifinius bakterijų sudėties pokyčius, susijusius su rūkymo įpročiais, histologijos tipu, naviko diferencijavimo laipsniu, CD8+ T ląstelių skaičiumi naviko mikroaplinkoje, lipopolisacharido kiekiu ir PD-L1 raiška navikiniame plaučių audinyje.
4. Atlikus išgyvenamumo duomenų analizę, nustatyta, kad didesnė alfa įvairovė, kurią rodo bakterijų gausa išmatų mėginiuose, susijusi su ilgesniu NSLPV sergančių pacientų išgyvenamumu.

## PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Dėl didesnės diagnostinės vertės (jautrumo ir tikslumo) ir panašaus saugumo TBKB, atliekama kontroliuojant rentgenoskopija ir EBUG-RD, gali būti rekomenduojama kaip įprastos transbronchinės žnyplinės biopsijos alternatyva arba papildoma intervencinė procedūra, ypač esant ekscentrinei PPP padėčiai. Remiantis atlikto ty-

- rimo duomenimis, rekomenduojamas optimalus kriobiopsijos biopstatų skaičius yra 2–4 mėginiai. Be to, vidutiniškai reikia 30 procedūrų, kad pulmonologas įgytų reikiamos patirties TBKB atlikti.
2. Atsižvelgiant į tai, kad alfa ir beta įvairovė rodo skirtumus tarp plaučių navikinio darinio ir parenchimos, taip pat tarp NSLPV sergančių pacientų ir kontrolinės grupės išmatų mėginių, būtina atlikti tolesnę žarnyno ir plaučių ašies mikrobiomo, kaip galimo patogenetinio plaučių vėžio veiksnio, analizę.
  3. Atsižvelgiant į tai, kad alfa ir beta įvairovė rodo sąsajas tarp PD-L1 raiškos navikiniame plaučių audinyje ir CD8+ T limfocitų skaičiaus naviko mikroaplinkoje, plaučių naviko ir išmatų mikrobiomo analizė galėtų būti toliau tiriama kaip papildomas nuspėjamas biologinis žymuo NSLPV sergantiems pacientams, gydomiems imuninės kontrolės taško inhibitoriais.
  4. Atsižvelgiant į tai, kad bendras NSLPV sergančių pacientų išgyvenamumas buvo ilgesnis, kai Simpsono įvairovės indeksas viršijo išmatų mėginių medianą, išmatų mikrobiomas galėtų būti tiriamas kaip papildomas prognostinis biologinis žymuo bendrajam NSLPV sergančių pacientų išgyvenamumui prognozuoti.

## STRAIPSNIAI, KURIUOSE PASKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI

1. **Ankudavicius V, Miliuskas S, Poskiene L, Vajauskas D, Zemaitis M.** Diagnostic yield of transbronchial cryobiopsy guided by radial endobronchial ultrasound and fluoroscopy in the radiologically suspected lung cancer: a single institution prospective study. *Cancers (Basel)*. 2022;14(6):1563.
2. **Ankudavicius V, Nikitina D, Lukosevicius R, Tilinde D, Saltienė V, Poskiene L, et al.** Detailed characterization of the lung-gut microbiome axis reveals the link between PD-L1 and the microbiome in non-small-cell lung cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(4):2323.

## LITERATŪRA

1. **Hanahan D.** Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
2. **Callister MEJ, Baldwin DR, Akram AR, Barnard S, Cane P, Draffan J, et al.** British Thoracic Society guidelines for the investigation and management of pulmonary nodules. *Thorax*. 2015;70(2):ii1–54.
3. **Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E, et al.** European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer. *Ann Oncol*. 2020;31(5):650–8.
4. **Jois DS, Mutreja D, Handa A, Moorchung N.** Correlation between transbronchial lung biopsy and lung cytology. *Rev Esp Patol*. 2020;53(2):75–8.
5. **Chen A, Chenna P, Loïselle A, Massoni J, Mayse M, Misselhorn D.** Radial probe endobronchial ultrasound for peripheral pulmonary lesions. A 5-year institutional experience. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(4):578–82.
6. **Rivera MB, Mehta AC, American College of Chest Physicians.** Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3):131S–148S.
7. **Steinfort DP, Khor YH, Manser RL, Irving LB.** Radial probe endobronchial ultrasound for the diagnosis of peripheral lung

- cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011;37(4):902–10.
8. **Dhillon SS, Harris K.** Bronchoscopy for the diagnosis of peripheral lung lesions. *J Thorac Dis*. 2017;9(10):S1047–58.
  9. **Folch EE, Labarca G, Ospina-Delgado D, Kheir F, Majid A, Khandhar SJ, et al.** Sensitivity and safety of electromagnetic navigation bronchoscopy for lung cancer diagnosis: systematic review and meta-analysis. *Chest*. 2020;158(4):1753–69.
  10. **Padrão E, Rodrigues M, Guimarães S, Caetano Mota P, Melo N, Souto Moura C, et al.** Diagnostic yield of computed tomography-guided transthoracic lung biopsy in diffuse lung diseases. *Respiration*. 2018;96(5):455–63.
  11. **Şahin C, Yılmaz O, Üçpınar BA, Uçak R, Temel U, Başak M, et al.** Computed tomography guided transthoracic core needle biopsy of lung masses: technique, complications and diagnostic yield rate. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*. 2020;54(1):47–51.
  12. **Troy LK, Grainge C, Corte TJ, Williamson JP, Vallely MP, Cooper WA, et al.** Diagnostic accuracy of transbronchial lung cryobiopsy for interstitial lung disease diagnosis (COL-DICE): a prospective, comparative study. *Lancet Respir Med*. 2020;8(2):171–81.
  13. **Lentz RJ, Argento AC, Colby TV, Rickman OB, Maldonado F.** Transbronchial cryobiopsy for diffuse parenchymal lung disease: a state-of-the-art review of procedural techniques, current evidence, and future challenges. *J Thorac Dis*. 2017;9(7):2186–203.
  14. **Ravaglia C, Wells AU, Tomassetti S, Dubini A, Cavazza A, Piciocchi S, et al.** Transbronchial lung cryobiopsy in diffuse parenchymal lung disease: comparison between biopsy from 1 segment and biopsy from 2 segments – diagnostic yield and complications. *Respiration*. 2017;93(4):285–92.
  15. **Johansson KA, Marcoux VS, Ronksley PE, Ryerson CJ.** Diagnostic yield and complications of transbronchial lung cryobiopsy for interstitial lung disease. A Systematic review and metaanalysis. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(10):1828–38.
  16. **Arimura K, Kondo M, Nagashima Y, Kanzaki M, Kobayashi F, Takeyama K, et al.** Comparison of tumor cell numbers and 22C3 PD-L1 expression between cryobiopsy and transbronchial biopsy with endobronchial ultrasonography-guide sheath for lung cancer. *Respir Res*. 2019;20(1):185.
  17. **Khatoun J, Rai RP, Prasad KN.** Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: Updates. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(2):147–58.
  18. **Zhang T, Joubert P, Ansari-Pour N, Zhao W, Hoang PH, Lokanga R, et al.** Genomic and evolutionary classification of lung cancer in never smokers. *Nat Genet*. 2021;53(9):1348–59.
  19. **Garrett WS.** The gut microbiota and colon cancer. *Science*. 2019;364(6446):1133–5.
  20. **Yu G, Gail MH, Consonni D, Carugno M, Humphrys M, Pesatori AC, et al.** Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome Biol*. 2016;17(1):163.
  21. **Cameron SJS, Lewis KE, Huws SA, Hegarty MJ, Lewis PD, Pachebat JA, et al.** A pilot study using metagenomic sequencing of the sputum microbiome suggests potential bacterial biomarkers for lung cancer. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177062.
  22. **Lee SH, Sung JY, Yong D, Chun J, Kim SY, Song JH, et al.** Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Sep 1];102:89–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500216305153>
  23. **Druzhinin VG, Matskova LV, Demenkov PS, Baranova ED, Volobaev VP, Minina VI, et al.** Taxonomic diversity of sputum microbiome in lung cancer patients and its relationship with chromosomal aberrations in blood lymphocytes. *Sci Rep*. 2020;10(1):9681.
  24. **Laroumagne S, Lepage B, Hermant C, Plat G, Philippeau M, Bigay-Game L, et al.** Bronchial colonisation in patients with lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J*. 2013;42(1):220–9.
  25. **Vernocchi P, Gili T, Conte F, Del Chierico F, Conta G, Miccheli A, et al.** Network analysis of gut microbiome and metabolome to discover microbiota-linked biomarkers in patients affected by non-small cell lung cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8730.



# Disertacijos

26. Stasiewicz M, Karpiński TM. The oral microbiota and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2022;86(Pt 3):633–42.
27. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Falkowski NR, Huffnagle GB, et al. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *mBio.* 2017;8(1):e02287–16.
28. Chellappan DK, Sze Ning QL, Su Min SK, Bin SY, Chern PJ, Shi TP, et al. Interactions between microbiome and lungs: paving new paths for microbiome based bio-engineered drug delivery systems in chronic respiratory diseases. *Chem Biol Interact.* 2019;310:108732.
29. Sommariva M, Le Noci V, Bianchi F, Camelliti S, Balsari A, Tagliabue E, et al. The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(14):2739–49.
30. Oosterlinck B, Ceuleers H, Arras W, De Man JG, Geboes K, De Schepper H, et al. Mucin-microbiome signatures shape the tumor microenvironment in gastric cancer. *Microbiome.* 2023;11(1):86.
31. Xia L, Liu Y, Wang Y. PD-1/PD-L1 blockade therapy in advanced non-small-cell lung cancer: current status and future directions. *Oncologist.* 2019;24(11):S31–41.
32. Krawczyk P, Kowalski DM, Krawczyk KW, Szczyrek M, Mlak R, Rolski A, et al. Predictive and prognostic factors in second- and third-line erlotinib treatment in NSCLC patients with known status of the EGFR gene. *Oncol Rep.* 2013;30(3):1463–72.
33. Maldonado F, Danoff SK, Wells AU, Colby TV, Ryu JH, Liberman M, et al. Transbronchial cryobiopsy for the diagnosis of interstitial lung diseases: CHEST guideline and expert panel report. *Chest.* 2020;157(4):1030–42.
34. Tang Y, Tian S, Chen H, Li X, Pu X, Zhang X, et al. Transbronchial lung cryobiopsy for peripheral pulmonary lesions. A narrative review. *Pulmonology.* 2023;S2531-0437(23)00163-0.
35. Zhou H, Suo J, Zhu J. [Therapeutic relevance of human microbiota and lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2019;22(7):464–9.
36. Yang JJ, Yu D, Xiang YB, Blot W, White E, Robien K, et al. Association of dietary fiber and yogurt consumption with lung cancer risk: a pooled analysis. *JAMA Oncol.* 2020;6(2):e194107.