



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



**REZEKSİYON YAPILAN AKCİĞER KANSERİ HASTALARI VE AKCİĞER
MİKROBİYOMLARI ARASINDAKİ POTANSİYEL İLİŞKİ**

GÖĞÜS CERRAHİSİ UZMANLIK TEZİ
Dr. Yaman KHORAKİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üye. Burcu KILIÇ

İSTANBUL – 2024

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**REZEKSİYON YAPILAN AKCİĞER KANSERİ HASTALARI VE
AKCİĞER MİKROBİYOMLARI ARASINDAKİ POTANSİYEL
İLİŞKİ**

**GÖĞÜS CERRAHİSİ UZMANLIK TEZİ
Dr. Yaman KHORAKİ**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üye. Burcu KILIÇ**

İSTANBUL – 2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimi boyunca zorlu ama bir o kadar da öğretici bir sürecin içinde yer aldım. Bu süreçte hem mesleki hem de kişisel anlamda büyük bir gelişim yaşadım. Elinizde tuttuğunuz bu tez, uzun bir yolculuğun ürünü olarak ortaya çıktı ve bu yolculukta bana destek olan birçok kişiye şükranlarımı sunmak isterim.

Öncelikle, bu süreçte bana her zaman sevgileri ve destekleriyle güç veren kıymetli **annem** ve **babama**, her zorlu anımda yanımda olan sevgili **kardeşlerime**, hayatımın en büyük destekçisi ve motivasyon kaynağım olan sevgili **eşim Kamar'a** en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Sizlerin varlığı, bu zorlu yolculuğu benim için daha kolay ve anlamlı hale getirdi.

Tez çalışmamın her aşamasında beni sabırla yönlendiren, bilgisi ve rehberliğiyle çalışmalarımı şekillendiren danışman hocam (ablam) **Dr. Öğr. Üyesi Burcu Kılıç'a** minnettarım. Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarımdan her birine, eğitimim boyunca bana kazandırdıkları bilgi ve deneyimlerden dolayı içtenlikle **Prof. Dr. M Kamil Kaynak, Prof. Dr. Akif Turna, Doç. Dr. Ezel Erşen ve Doç. Dr. H Volkan Kara'ya** teşekkür ederim. Özellikle, tez sürecimde bana destek olan ve katkı sağlayan **Doç. Dr. Mert Kuşkucu'** ya ayrıca şükranlarımı sunuyorum.

Bu zorlu süreci birlikte yürüttüğümüz değerli çalışma arkadaşlarım **Op. Dr. İsmail Sarbay, Op. Dr. Merve Ekinci Fidan, Op. Dr. Ömer Faruk Sağlam, Op. Dr. Gizem Özçibık Işık, Op. Dr. Melek Ağkoç, Dr. Gökberk Güler, Dr. Armanç Yıldız, Dr. Zahid Hajiyev, Dr. Levani Chikvaidze ve Dr. Tolunay Turan'a** ayrıca teşekkür etmek isterim. Onların dayanışması, paylaştığımız deneyimler ve birbirimize verdiğimiz destek, bu sürecin en değerli anılarını oluşturdu.

Son olarak, servis, ameliyathane ve poliklinikte görev yapan değerli **hemşirelerimize ve hastane personelleri ve sekreterimize** , özverili çalışmaları ve süreç boyunca verdikleri destek için teşekkür ederim. Ayrıca, bu süreçte bana herhangi bir şekilde katkı sunan, emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma ve desteklerini esirgemeyen herkese minnettarım.

Saygılarımla,

Dr. Yaman Khoraki

Aralık 2024

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR	I
ŞEKİLLER DİZİNİ	III
TABLO DİZİNİ	IV
ETİK KURUL ONAYI	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Primer Akciğer Kanseri	4
2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	4
2.1.2. Histopatolojik Tipleri	11
2.1.3. Akciğer Kanseri Evrenlenmesi	12
2.1.4. Tümör ve Bağışıklık	13
2.2. Mikrobiyota ve Akciğer Kanseri Bağlantısı	16
2.2.1. Mikrobiyota Nedir?	16
2.2.2. Hastalıkta ve Sağlıkta Akciğer Mikrobiyotası	16
2.2.3. Akciğer Kanseri ve Mikrobiyota	20
2.2.4. Örneklem	23
2.2.5. Teknikler: 16S rRNA Gen Dizimi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Hasta Seçimi ve Klinik Değerlendirme	29
3.2. Örneklerin Hazırlanması	29
3.3. 16S rRNA V3-V4 Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	30
3.4. Yeni Nesil Dizileme Kütüphane Hazırlama	31
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	47

5.1. Kısıtlılıklar	50
6. SONUÇ	51
7. KAYNAKLAR	52
8. ÖZGEÇMİŞ	66
9. İNTİHAL TARAMA RAPORU	68



SİMGE VE KISALTMALAR

ALK: Anaplazik Lenfoma Kinaz
BAL: Bronkoalveolar Lavaj
BT: Bilgisayarlı Tomografi
CRP: C-Reaktif Protein
DC: dendritik hücreler
DNA: Deoksiribonükleik Asit
EBUS: endobronşiyal ultrason
EGFR; Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER: Östrojen Reseptörü
ERK: Hücre Dışı Sinyal ile Düzenlenen Kinaz
ETS: Çevresel Sigara Dumanı
EUS: endoözofageal ultrason
FNA: transbronşiyal iğne aspirasyonu
FOXP3: çatal başlı kutu protein 3
GM-CSF: granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HMP: İnsan Mikrobiyomu Projesi
IARC: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IL: İnterlökin
KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KOAİ: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KRAS; Kirsten rat sarcoma virüs
LC: Akciğer Kanseri

MDSC: miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin
MEK: Mitojen-aktif Protein Kinaz/ERK Kinaz
MR: Manyetik Rezonans
NSCLC: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
PAMP: Patojen-İlişkili Moleküler Desenler
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-L1: proteini 1 ligandı
PET/BT: Pozitron Emisyon Tomografisi / Bilgisayarlı Tomografi
RAF: Hızla Hızlanmış Fibrosarkom
ROR γ t: retinoik asitle ilişkili yetim reseptör gama t
rRNA: ribozomal ribonükleik asit
SCC: Skuamöz Hücreli Karsinom
SCT: supraglottik karakteristik taksonlar
STAS: Spread Through Air Space
TKI: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TLR: Toll-benzeri Reseptör
TNF α : tümör nekroz faktörü α
VATS; video yardımcı torakoskopik cerrahi
VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Agaroz jel elektroforezinde PCR ürünleri

Şekil 2. Islak Laboratuvar İş Akış

Şekil 3. BAL ve biyopsi bölüm (phylum) düzeyi

Şekil 4. BAL ve biyopsi mikrobiyom sınıf (Class) düzeyi

Şekil 5. BAL ve biyopsi takım (order) düzeyi

Şekil 6. BAL ve biyopsi aile (family) düzeyi

Şekil 7. BAL ve biyopsi cins (genus) düzeyi

Şekil 8. alfa ve beta çeşitliği

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. PCR Karışımı

Tablo 2 PCR Protokolü

Tablo 3. Hastaların Klinik Özellikleri:

Tablo 4. alfa çeşitliği Kruskal-Wallis testi analizi sonuçları

Tablo 5. beta çeşitliği Kruskal-Wallis testi analizi sonuçları

ETİK KURUL ONAYI

İÜC Tarih ve Sayı: 10.01.2024-883610



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : E-83045809-604.01-883610
Konu : Araş.Gör.Dr.Yaman KHORAKİ etik
kurul kararı

10.01.2024

GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi : 09.11.2023 tarihli 833271 sayılı yazınıza istinaden

Anabilim Dalımızda görevli Dr.Öğr.Üyesi Burcu KILIÇ'ın danışmanlığında, Araş. Gör. Dr. Yaman KHORAKİ'nin yürütücülüğünde yapılacak olan "Rezeksiyon Yapılan Akciğer Kanseri Hastaları ve Akciğer Mikrobiyomları Arasındaki Potansiyel İlişki" başlıklı çalışma 09.01.2024 tarihli etik kurulumuzca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun görülmüştür
Bilgilerinize rica ederim

Prof. Dr. Mehmet Sarper ERDOĞAN
Başkan

Ek:01 Adet karar fiziki olarak teslim alınacaktır

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : BSCPT27K3Z

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-cerrahpasa-chys>

Adres:İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü, 34320 Avcılar-İstanbul
Telefon:0212 404 03 00 Faks:0212 404 07 01
Web:<https://www.iuc.edu.tr>
Kep Adresi:iuc@ihs01.kep.tr

Bilgi için: Hakan CENGİZ
Dahili: 23076



ÖZET

Amaç: Akciğer kanseri, dünya genelinde ölüm oranlarının en yüksek nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir ve patofizyolojik mekanizmaları hâlâ araştırılmaktadır. Bu çalışma, akciğer mikrobiyomuna odaklanarak, akciğer dokusu ve bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerini analiz etmektedir. İki örnek tipi arasındaki mikrobiyomlarda önemli farklılıkların olup olmadığını belirlemeyi ve BAL'ın akciğer mikrobiyomunun güvenilir bir temsilcisi olup olmadığını değerlendirmeyi amaçlıyoruz.

Gereç ve Yöntem: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'da Nisan- Ekim 2024 tarihleri arasında primer akciğer karsinomu tanısı almış 20 hastayı kapsamaktadır. Katılımcılar, 18 yaş ve üstü onam veren bireylerden oluşmakta; 18 yaş altı olanlar ve son bir ayda antibiyotik tedavisi görenler dışlanmıştır. Preoperatif değerlendirmeler kan testleri ve görüntüleme yöntemleriyle yapıldı, bronkoalveolar lavaj (BAL) örnekleme yapıldı, rezeksiyon yapılan akciğer dokusundan parça alındı . Örnekler -20 °C'de saklandı, nükleik asit izolasyonu yapıldı ve 16S rRNA V3-V4 bölgesi PCR ile çoğaltıldı.

Bulgular: Katılımcıların %70'i erkek, %30'u kadın, %60'ı ise 60 yaş ve altındadır. Ayrıca, %80'inin sigara içtiği ve %20'sinin KOAH hastalığı bulunduğu saptanmıştır. TNM evrelemesine göre, hastaların %75'i I-II evresinde, %25'i ise III-IV evresindedir. Histopatolojik incelemelerde adenokarsinom %60, skuamöz hücreli karsinom ise %35 oranında tespit edilmiştir. Mikrobiyom analizleri, BAL'da %54.2 ve biyopsi örneğinde %66.5 oranıyla *Proteobacteria'nın* baskın olduğunu, biyopsi ve BAL arasında alfa ve beta çeşitliğinde anlamlı fark göstermektedir.

Sonuç: Çalışmada elde edilen verilerin, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına katkıda bulunma potansiyeli bulunmaktadır. Çalışmanın sınırlamaları arasında küçük örneklem büyüklüğü ve kontrol grubunun eksikliği yer almakta olup, bu durum bulguların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. Genel olarak, bu araştırma, akciğer kanseri ve mikrobiyota arasındaki ilişkiyi anlamak için önemli bir adım sunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: KHDAK, mikrobiyom, 16s rRNA dizileme

ABSTRACT

Aim: Lung cancer remains a leading cause of global mortality, with its pathophysiological mechanisms still under investigation. This study explores the lung microbiome by analyzing lung tissue and bronchoalveolar lavage (BAL) samples. Our aim is to identify significant differences between the microbiomes of these two sample types and evaluate whether BAL is a reliable representation of the lung microbiome.

Material and Method: The study includes 20 patients diagnosed with primary lung carcinoma at Istanbul University-Cerrahpaşa between April and October 2024. Participants were individuals aged 18 and over who gave consent; those under 18 and those who had received antibiotic treatment in the last month were excluded. Preoperative evaluations were performed with blood tests and imaging methods, bronchoalveolar lavage (BAL) sampling was performed, and samples were taken from resected lung tissue. Samples were stored at -20 °C, nucleic acid isolation was performed, and the 16S rRNA V3-V4 region was amplified by PCR.

Results: Among the participants, 70% were male, 30% female, and 60% were 60 years old or younger. Additionally, 80% were smokers and 20% had COPD. According to TNM staging, 75% were in stages I-II, while 25% were in stages III-IV. Histopathological examinations showed adenocarcinoma in 60% and squamous cell carcinoma in 35%. Microbiome analyses indicated that *Proteobacteria* was dominant, representing 54.2% in BAL and 66.5% in biopsy samples, with significant differences in alpha and beta diversity.

Conclusion: The findings may contribute to personalized treatment approaches. Limitations include a small sample size and absence of a control group, potentially affecting the generalizability of results. This research is a significant step in understanding the relationship between lung cancer and the microbiota.

Keywords: KHDAK, microbiome, s16 rRNA sequencing

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri en yaygın malignite ve kanser ilişkili ölümlerin önde gelen nedenidir. Sadece 2018 yılı için dünya çapında 1,7 milyondan fazla akciğer kanseri nedeni ölüm bildirilmiştir [1]. Primer akciğer karsinomu, dünyada kadınlarda meme kanseri ve erkeklerde prostat kanserinden sonra ikinci en sık görülen malignite olup, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir [2]. Akciğer kanserinin Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) olarak iki histolojik alt tipi mevcuttur. Dünya genelinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom da dahil olmak üzere akciğerlerdeki malignitelerin yaklaşık %85'i KHDAK'tır, kalan %15'ini KHAK oluşturur [3]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, önde gelen prognostik araç, tümörleri boyutlarına (T), lenf düğümlerindeki metastatik değişikliklere (N) ve uzak metastazlara (M) bağlı olarak farklı evrelere ayıran TNM sınıflandırmasına dayalı tümör evrelemesidir [4]. Özellikle metastatik değişiklikler içeriyorsa daha ileri evreler daha kötü sonuçlar ve önemli ölçüde daha kısa genel sağ kalımla ilişkilidir [5].

Akciğer kanseri, daha iyi teşhis ve yeni ilaçların keşfi gibi çok sayıda gelişmesiyle beş yıllık sağ kalımda dramatik bir iyileşme sağlanmasına karşın rağmen hâlen ölümcül bir durumdur. Sonuç olarak, akciğer kanseri biyolojisi hakkında daha derin bir irdeleme gerekmektedir. Sözde "kaçış" mutasyonları, kanser hücrelerinin konakçının bağışıklık tepkisinden kaçınmasının başlıca yolu olarak kabul edildi. Bu, kanser hücrelerinin yüksek devir, tümör baskılayıcıların eksikliği ve dış mutajenik faktörler (örneğin sigara, alkol) nedeniyle konakçının bağışıklık sistemi tarafından tanınmaz hale gelene kadar çeşitli mutasyonlar biriktirdiği anlamına gelir [6]. Beslenme, fiziksel aktivite ve yaşam tarzı gibi çeşitli faktörlerin kanser gözetimini etkilediği artık biliniyor [7]. En sonuncusu ise mikrobiyotadır. Akciğer mikrobiyomu ve ilgili epigenetik modülasyonları anlamak akciğer kanserinin klinik yönetimini iyileştirmek için yeni fırsatlar yaratabilir. İnsan vücudundaki bakterilerin ekolojik topluluğu mikrobiyom olarak adlandırılır [8]. Protozoanlar, mantarlar, bakteriler ve virüsler her organ için özel olan mikrobiyal

ekosistemleri oluşturur [9]. Mevcut tahminlere göre, mikrobiyal hücrelerin sayısı, host hücrelerinin sayısına eşittir ve mikrobiyomun toplam ağırlığı 0,2 kg'dır [10]. Mikrobiyom vücudumuzun toplam kütlesinin yaklaşık %1-3'ünü oluşturur [10]. Bu "organ" besin bozunumu, öncü ve vitamin sentezi yoluyla ve ayrıca bağışıklık sisteminin uyarılması yoluyla konağın homeostazını sağlar [11], ve disbiyozu astım gibi çeşitli bağışıklık bozukluklarıyla ilişkilendirildi [12]. Mikrobiyal organizmalar uzun zamandır insanlarda bulaşıcı hastalıklar ve hastalıkların başlıca kaynağı olarak bilinmektedir. Yine de mikroorganizmaların kanser gibi bulaşıcı olmayan hastalıkların gelişiminde yer aldığına dair giderek artan güçlü kanıtlar vardır [13]. Akciğer mikrobiyomu, mikroplardan, mantarlardan, virüslerden ve bakteriyofajlardan oluşur, host ile mutualist bir ilişki kurar. Bu mikrobiyotada dengesizlik çok sayıda ciddi akciğer hastalığı ile ilişkilidir [14,15]. Liu ve ark. son çalışmasında akciğer kanseri ile bağlantılı mikrobiyal dysbiosis hakkında kapsamlı tartışma ortaya koydular [15]. Mikrobiyotanın özelliklerine ve konakla etkileşime olan ilginin artması, dünya çapındaki bilim insanlarının ortak güçleriyle insan mikrobiyomunun tam bir karakterizasyonunu elde etmeyi amaçlayan İnsan Mikrobiyomu Projesi'nin (HMP) kurulmasına yol açtı. Ancak, başlangıçta tüm mikrobiyotalar dahil edilmedi, örneğin akciğerlerin mikrobiyotası [16], bu da çalışmasına olan genel ilgiyi azalttı. Akciğer mikrobiyotasının araştırılmasında bir diğer sakınca, tekniklerin invaziv olması nedeniyle örneklenmesinin zor olmasıdır. Bu, çalışmaların çoğunu bronkoskopi ile elde edilen bronkoalveolar lavaj sıvısına (BAL) dayandırmıştır, ancak bronkoskopun geçişi nedeniyle üst hava yollarından kontaminasyon riski de eşlik etmektedir [14,17,18]. Şimdiye kadar akciğer mikrobiyotasını inceleyen çalışmaların çoğu kronik obstrüktif akciğer hastalığını (KOAH) ele alıyor [19–21], astım [22] ve kistik fibrozis [23]. Ancak son birkaç yıl, akciğer kanseri mikrobiyotası ve çevresel faktörlerle ilişkisi üzerine ilk çalışmaların yapıldığı yıl oldu [24], veya alt solunum yollarında artan inflamasyon [25]. Her ne kadar bazı çalışmalar bağırsak mikrobiyotasının akciğer kanserine yanıt üzerindeki "sihirli" etkisini ortaya koymuş olsa da [26] , bilim camiası, yeni kurulan "bağırsak-akciğer" eksenini ortaya çıkarabilmek için öncelikle yerel akciğer mikrobiyotasının etkisinin incelenmesi gerektiği konusunda uyarıyor.

Çeşitli araştırmalara göre, akciğer kanseri vakalarında Streptococcus, Staphylococcus, Pseudomonas, Moraxella ve Veillonella yüksek oranda görülmektedir [27,28].

Akciğer kanserinde akciğer mikrobiyotasına dair daha eksiksiz bir görüş sağlama çabasıyla, ameliyattan önce neoadjuvan kemoterapi alan ve almayan NSCLC hastalarında klinik bir çalışma gerçekleştirdik. Çalışmamız, farklı orijinli örneklerle (BAL ve tümör çevresi doku), BAL ile akciğer dokusu arasındaki farklara ve ayrıca lokal bağışıklık tepkileriyle ve metastatik lenf düğümlerinin varlığıyla olan bağlantılarına dayanarak NSCLC hastalarındaki akciğer mikrobiyotasının bileşimi hakkında sonuçlar sağlamıştır. BAL mikrobiyotasının benzersiz bir mikrobiyotadan oluştuğunu ve BAL veya doku mikrobiyotasının örneklemeindeki önyargının haklı olduğunu gösterdik. Bu yazıyı, dört bölümden oluşan bir bibliyografik arka planla başlar. İlk bölüm, akciğer kanserinin sorunsalını (tipler, evreleme), lokal ve sistemik bağışıklık tepkileriyle olan bağlantısını ve risk faktörlerini tanıtmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, konak etkileşimleri ve kansere karşı mikrobiyota yaklaşımının temeli açısından en çok araştırılan ve karakterize edilen mikrobiyota olduğundan, ikinci bölüm bu konudaki temel bilgileri sağlar. Üçüncü bölüm akciğer mikrobiyotasını ve şimdiye kadar bilinen özelliklerini ve bağışıklık sistemiyle etkileşimlerini tanıtmaktadır. Son bölüm bağırsak-akciğer eksenini yayınlanmış inceleme biçiminde ele almaktadır. Bibliyografik genel bakışın ardından, güncel sonuçlar hipotezleri ve hedefleri yanıtlayan makaleler olarak sunulmaktadır. Çalışma, sonuçların ve perspektiflerin genel bir tartışmasıyla sona ermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Primer Akciğer Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Akciğer karsinomu, dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanseri 1985 yılından bu yana dünyada en sık görülen kanser türü olmuştur. Akciğer kanseri hem insidans hem de ölüm oranı açısından dünya çapında en sık görülen kanser türü olmaya devam etmektedir [2]. Günümüzde, küresel akciğer kanseri vakalarının yarısından fazlası (%58) gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Küresel kanser kayıtlarının yakın zamanda yapılan retrospektif incelemesinde, akciğer kanserinden kaynaklanan yaşa göre standardize edilmiş 5 yıllık genel sağ kalım hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde %10 ila %20 arasında değişmektedir [29]. Yirminci yüzyılın başında akciğer kanseri nadir görülen bir hastalıktı. 1912'de Adler, Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa ülkelerindeki hastanelerden alınan otopsi raporlarının kapsamlı bir incelemesini yaptı ve 374 birincil akciğer kanseri vakası buldu. Bu, tüm kanser vakalarının %0,5'inden azını temsil ediyordu. Adler, "akciğerlerin birincil kötü huylu neoplazmaları en nadir hastalık formlarından biridir" sonucuna vardı. Sonraki birkaç on yıl boyunca, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve yurtdışında birçok yazar akciğer karsinomu insidansında bir artış olduğunu kaydetti. 1897 ile 1930 arasında toplanan 185.434 otopsi vakasından oluşan bir seride, Hruby ve Sweany akciğer kanseri insidansının genel olarak kanser insidansı ile orantısız bir şekilde arttığını kaydetti [30].

Yirminci yüzyılın ilk on yıllarında, akciğer kanserinde gözlenen artışın grip, tüberküloz, tahriş edici gazlar, endüstriyel tesislerden ve kömür yangınlarından kaynaklanan atmosfer kirliliği ve kronik bronşit gibi çeşitli etiyolojilerden kaynaklanabileceği varsayılmıştır. Katranın deneysel olarak hayvan derisine uygulandığında akciğer karsinomu üretebileceği düşüncesi, otomobil egzozundan veya katranlı yolların yüzey tozundan kaynaklanan katran ürünlerinin solunmasının akciğer kanseri görülme sıklığındaki artışta önemli faktörler olabileceği yönünde ön endişelere

yol açmıştır. 1930 gibi erken bir tarihte, Roffo, hastalarda yapılan gözlemler ve hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, tütünün yakılmasıyla açığa çıkan tütün katranının kanserojen bir madde olduğu sonucuna varmıştır. 1941'de, Ochsner ve DeBakey [31], akciğer karsinomu üzerine bir incelemede, "Akciğer karsinomu görülme sıklığındaki artışın büyük ölçüde sigara içme alışkanlığındaki artıştan kaynaklandığına dair kesin kanaatimiz var." demişlerdir. 1950'de, tütün içiminin bronkojenik karsinomda etiyolojik bir faktör olarak rolünü değerlendiren iki çığır açıcı epidemiyolojik çalışma yayınlandı. ABD'de Wynder ve Graham [32], kansersiz genel bir erkek hastane popülasyonu ile karşılaştırıldığında erkeklerde 605 akciğer kanseri vakasını inceleyen bir vaka-kontrol çalışması bildirdi. En çarpıcı bulgu, akciğer kanserlerinin %96,5'inin uzun yıllar orta ila yoğun sigara içen erkeklerde bulunmasıydı. Genel popülasyonda ise sigara içme oranı %73,7'di. Sigara dumanı, hem gaz hem de partikül bileşiklerden oluşan karmaşık bir aerosoldür. Ana akım duman ve yan akım duman bileşenlerine ayrılır. Ana akım duman, sigaranın içinden hava solunmasıyla üretilir ve sigara içen için birincil duman maruziyeti kaynağıdır. Yan akım duman, sigaranın nefesler arasında için için yanması sonucu üretilir ve çevresel tütün dumanının (ETS) başlıca kaynağıdır. Tütün bağımlılığıyla ilişkili birincil madde nikotindir. Katran, nikotin ve su çıkarıldıktan sonra sigara dumanının toplam partikül maddesi olarak tanımlanır. Katran maruziyeti, akciğer kanseri riskiyle ana bağlantı gibi görünmektedir. Federal Ticaret Komisyonu, sigaraların nikotin ve katran içeriğini standartlaştırılmış sigara makinelerinde yapılan ölçümlerle belirler. Ancak, ana akım dumanın bileşimi, bireysel sigara içicileri arasında farklılık gösteren soluma yoğunluğuna bağlı olarak değişken olabilir. Filtre uçları ana akım dumandaki nikotin ve katran miktarını azaltsa da, uçların dudaklar veya parmaklar tarafından sıkıştırılmasının solunan dumanın bileşimini etkilediği gösterilmiştir. Ana akım dumanın, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, N-nitrozaminler ve benzen, vinil klorür, arsenik ve krom gibi çeşitli organik ve inorganik bileşikler dahil olmak üzere çok sayıda potansiyel kanserojen içerdiği açıktır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrozaminler gibi bileşiklerin kanserojen potansiyele ulaşması için

metabolik aktivasyona ihtiyacı vardır. Detoksifikasyon yolları da mevcuttur ve aktivasyon ile detoksifikasyon arasındaki denge muhtemelen bireysel kanser riskini etkiler. Radon ve onun ürünleri, bizmut ve polonyum gibi radyoaktif maddeler de tütün dumanında bulunur. Tütün içmenin akciğer kanseri için en önemli değiştirilebilir risk faktörü olduğuna şüphe yoktur. Bireysel duyarlılığın da karsinogenezde bir faktör olduğu açıktır. Akciğer kanserlerinin %80'inden fazlası tütüne maruz kalan kişilerde ortaya çıksa da sigara içenlerin %20'sinden azı akciğer kanserine yakalanacaktır. Duyarlılıkta görülen değişkenliğin muhtemelen diğer çevresel faktörlerden veya genetik yatkınlıktan etkilendiği varsayılmaktadır. Cassidy ve meslektaşları [33], özellikle erken başlangıçlı akciğer kanseri aile geçmişi olan kişilerde (yani 60 yaş altı) akciğer kanseri riskinin önemli ölçüde arttığını vurguladılar. Schwartz ve meslektaşları [34], akciğer kanserinin moleküler epidemiyolojisini inceleyerek, akciğer kanserojenlerine karşı bir dizi konak duyarlılığı genetik belirteci üzerinde durdular. Duyarlılık genetik faktörleri arasında yüksek penetrans, düşük frekanslı genler ve düşük penetrans, yüksek frekanslı genler ile edinilmiş epigenetik polimorfizmler yer almaktadır. 32 çalışmayı içeren yakın tarihli bir meta-analiz, akciğer kanseri aile öyküsü pozitif olan bireylerde akciğer kanseri riskinin iki kat arttığını gösterdi. Matakidou ve meslektaşlarına göre, aile öyküsünden kaynaklanan bu artan risk sigara içmeyenlerde de mevcuttu [35]. Geçtiğimiz on yılda, kolon ve meme kanserinin nedensel yollarında tanımlananlara benzer hedefler bulma amacıyla "sürücü mutasyonlara" çok dikkat edildi. Şu anda akciğer kanserinde en iyi karakterize edilen iki mutasyon KRAS (Kirsten-Ras) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonlarıdır. Şu anda NSCLC'lerin %15 ila %25'inin KRAS mutasyonuna sahip olduğu, %10 ila %15'inin ise EGFR mutasyonuna sahip olduğu tahmin edilmektedir. Mevcut hiçbir tedavi KRAS mutasyonlarını doğrudan hedeflemese de, randomize kontrollü çalışmalar, hastalığın ilerlemesinde umut vadeden azalmalarla KRAS'ın aşağı akış ürünlerini hedef alan ajanların (PAS/RAF/MEK yolu inhibitörleri) kullanımını değerlendirmiştir.

Birkaç malign olmayan akciğer hastalığı, akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bunlardan en güçlü ilişki kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ile gösterilmiştir. Tütün içmek hem akciğer kanserinin hem de KOAH'ın birincil nedenidir. Wu ve meslektaşlarının [36] hiç sigara içmemiş akciğer kanseri olan kadınlarla ilgili bir çalışması, hava akımı tıkanıklığı varlığı ile akciğer kanseri gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, sigara içenler için çeşitli akciğer rahatsızlıklarının akciğer kanseriyle anlamlı ilişki gösterdiğini bulmuştur. Bunlara KOAH (göreceli risk 2.2), kronik bronşit (1.5), amfizem (2.0), zatürre (1.4) ve tüberküloz (1.8) tanıları dahildir. Hiç sigara içmeyenler için ilişkiler zatürre (1.4) ve tüberküloz (1.9) için anlamlı olmaya devam etmiştir [37]. Akciğer kanseri ve skleroderma gibi diğer fibrozan hastalıklarla da bir ilişki bulunmuştur. Abu-Shakra ve meslektaşları [38] tarafından bildirilen 248 skleroderma hastası üzerinde yapılan bir çalışmada, skleroderma hastalarında genel popülasyona göre kanser insidansında 2,1 kat artış olduğu, en sık görülen tiplerin ise akciğer ve meme kanseri olduğu gösterilmiştir. Pulmoner interstisyel hastalığın maligniteye yatkınlık oluşturma mekanizmaları net olmasa da, kronik inflamasyonla ilişkili malign transformasyon, epitel hiperplazisi ve kanserojenlerin bozulmuş temizlenmesi gibi çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır.

Son meta-analizler, erkek sigara içicilerinin kadın sigara içicilerine kıyasla akciğer kanserine daha yatkın olduğunu ileri sürmüştür (RR1.44) [39]. Ancak, bu tür büyük meta-analizlerde dikkatli olunmalıdır; çünkü bunlar genellikle sigaraya başlama yaşını (erkeklerde genellikle daha erken), sigara içme sıklığını (erkeklerde genellikle günde daha fazla sigara) ve günlük kullanımı hesaba katmaz. Bu düşüncelerle sigaraya karşı akciğer kanseri duyarlılığındaki farklılıklar göz önüne alındığında, zıt ilişki (kadınlarda artan duyarlılık, RR 1.7) tanımlanmıştır [40]. Ayrıca, birkaç rapor akciğer kanserinde moleküler düzeyde gözlemlenen cinsiyet farklılıkları hakkında yorumda bulunmuştur. Ryberg ve meslektaşları [41], akciğer kanseri olan kadınların erkeklerden daha yüksek DNA bağımlılık seviyelerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Daha yüksek DNA

bağımlılık seviyelerine sahip hastaların kanserojenlere karşı daha duyarlı olması beklenebilir; bu da kadınların daha düşük yoğunluklu sigara maruziyetinde akciğer kanseri geliştirmesinin nedenini açıklayabilir. Ayrıca, hormonal faktörler de duyarlılıkta rol oynayabilir. Bir vaka-kontrol çalışmasında, Taioli ve Wynder [42] östrojen replasman tedavisinin adenokarsinom için önemli ölçüde artmış bir riskle ilişkili olduğunu (olasılık oranı 1,7) bildirirken, sigara içimi ve östrojen replasmanının birleşimi bu riski önemli ölçüde artırmıştır (olasılık oranı 32,4). Tersine, erken menopoza (40 yaş ve altı) adenokarsinom için azalmış bir riskle ilişkilendirilmiştir (olasılık oranı 0,3). Son olarak, kadınların tütünün kanserojen etkilerine karşı daha fazla duyarlılığa sahip olabilmelerine rağmen, akciğer kanserinin sigara içmeyen kadınlarda sigara içmeyen erkeklerden daha sık görüldüğü anlaşılmaktadır. Hiç sigara içmeyen kadınların, hiç sigara içmeyen erkeklere göre akciğer kanserine yakalanma olasılığının daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Zang ve Wynder tarafından [40] 1.889 akciğer kanseri hastası ve 2.070 kontrol hastası üzerinde yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, hiç sigara içmeyen akciğer kanseri hastalarının oranı kadınlarda erkeklerden iki kat daha fazlaydı. Diğer çalışmalar [43], östrojen reseptör- β ekspresyonunun kadınlarda ve sigara içmeyenlerde de daha yüksek olduğunu göstermiştir. ER- α ve ER- β , erkek ve kadınların akciğer malignitelerinde ekspresyon gösterse de, östrojen maruziyetinden kaynaklanan geri bildirimin kadınlarda erkeklere göre orantısız bir şekilde akciğer kanseri evriminde rol oynaması muhtemeldir.

1999'dan 2011'e kadar, siyah erkekler diğer ırklara kıyasla orantısız bir şekilde en yüksek akciğer kanseri insidansını yaşadılar. Bunu beyaz erkekler, Amerikan Yerlisi/Alaska Yerlisi, Asyalı/Pasifik Adalı ve Hispanik erkekler takip ediyor. Kadınlar için, akciğer kanseri insidansı beyaz kadınlarda en yüksek, ardından siyah, Amerikan Yerlisi/Alaska Yerlisi, Asyalı/Pasifik Adalı ve Hispanik geliyor. Akciğer kanserinden kaynaklanan ölüm oranları eğilimleri, esasen ırka göre insidans eğilimleriyle aynıdır. Önceki on yıllardaki araştırmalar, siyah sigara içicileri arasında mentollü sigaraların popülerliğinin, bu popülasyondaki akciğer malignitelerinin farklı biyolojik özellikleri için kısmi bir açıklama olabileceğini öne sürmüştü; ancak, son incelemeler bu varsayımları

sorguladı [44,45]. Doğu Asya kökenli kişilerde EGFR mutasyonları ifade etme ve TKI tedavisine yanıt verme olasılığı daha yüksektir. Bir seride, Doğu Asya popülasyonundan incelenen örneklerin %88'inin EGFR, HER2 veya ALK'de değişikliklere sahip olduğu bulunmuştur [46]. Diğer çalışmalar, Doğu Asyalı hiç sigara içmeyenlerde bu yaygınlığı doğrulamıştır ve %75'inde EGFR mutasyonları, %6'sında HER2 mutasyonları ve %5'inde ALK füzyonları görülmüştür [47]. Bu nedenle, genetik ekspresyonun akciğer kanserinin neoadjuvan veya adjuvan tedavisinde yardımcı olma vaadi, şu anda bazı hasta alt grupları için diğerlerinden daha yakındır.

Hava kirliliği, küreselleşme ve sanayileşmenin mevcut şaşırtıcı hızı göz önüne alındığında, dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir. Belirli kirleticileri tespit etmek için kimyasal analitik yöntemlerdeki gelişmeler, araştırmacıların bu tür havadaki partikül maddelerin etkilerini daha doğru bir şekilde incelemelerine yardımcı olmuştur. Pershagen ve Simonato'nun [48] kentsel-kırsal karşılaştırmaları içeren erken çalışmaları, bir "kentsel faktörün" akciğer kanseri ölüm oranında %10 ila %40'lık bir artışla ilişkili olduğunu göstermiştir. Binlerce gaz ve ince partikülün karmaşık bir karışımından oluşan dizel egzozu, hava kirliliğinin önemli bir bileşenini temsil eder. Bu gaz bileşenlerinden bazılarının -benzen, formaldehit ve 1,3-bütadien gibi- insanlarda kansere neden olduğu şüpheleniliyor veya biliniyor. Lipsett ve Bhatia tarafından yapılan iki büyük bağımsız meta-analiz, özellikle kamyonculuk sektöründe çalışanlar arasında dizel egzozuna mesleki maruziyetin akciğer kanserine yakalanma riskini yaklaşık %30 ila %50 oranında artırdığına dair güçlü bir destek sağlamıştır [49,50]. Bu çalışmalar, hava kirliliğinin özellikle aktif ve pasif sigara içimi ve mesleki maruziyetler gibi bilinen diğer risk faktörleriyle birlikte akciğer kanseri riskini artırabileceğine dair endişe için makul gerekçeler sunmaktadır.

Birkaç işyeri maddesinin akciğerde kanserojen olduğu kanıtlanmıştır. IARC, arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorür dahil olmak üzere bir dizi bu tür maddeyi tanımlamıştır.

Şu anda, akciğer kanseri için 5 yıllık sağ kalım oranı yalnızca %18'dir. Bu, ABD'deki diğer önde gelen kanser ölüm nedenlerinin 5 yıllık sağ kalım oranlarıyla keskin bir tezat oluşturmaktadır. Bunlara kolon kanseri (%65), cilt kanseri (melanom, %92), meme kanseri (%89) ve prostat kanseri (%99) dahildir. Tütünün akciğer kanserinde etiyolojik faktör olarak rolü ikna edici bir şekilde belirlenmiştir. Aynı şekilde, iyonlaştırıcı radyasyon ve bazı mesleki maruziyetler kanserojen olarak kabul edilmiştir. Bu hastalıkla ilişkili kasvetli ölüm oranı, tıp mesleğinin birincil nedenini sınırlamayı amaçlayan çabalara katkıda bulunmasını gerektirmektedir. Tütün içimi ortadan kaldırılabilirse veya en azından ciddi şekilde azaltılabilirse, akciğer kanserini yirminci yüzyılın başında Adler'in "en nadir hastalık türlerinden biri" olarak adlandırdığı düzeye geri döndürebiliriz.

2.1.2. Histopatolojik Tipleri

Akciğer kanseri, her biri çeşitli etiyoloji, gelişimsel kalıplar ve prognozlarla bağlantılı olan birçok histolojik tipte mevcuttur. Üç ana LC grubu küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) (%10-15 akciğer kanseri), NSCLC (%80-85) ve akciğer karsinoid tümörleridir (%5'ten az) [51]. SCLC bu çalışmaya dahil edilmediğinden, odak çoğunlukla NSCLC üzerinde olacaktır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin üç ana türü vardır: Adenokarsinom, Skuamöz hücreli akciğer karsinomu (epidermoid karsinom), Büyük hücreli akciğer karsinomu, Diğer (sarkomatoid karsinom/tükürük bezi tümörü/sınıflandırılmamış karsinomlar).

2.1.2.1. Adenokarsinom

Adenokarsinom (ADK), LC'nin yaklaşık %40'ını oluşturur [52] ve en yaygın histolojik NSCLC türüdür [53]. "Bez" hücrelerinin erken versiyonlarından gelişir ("adeno" adı) ve sıklıkla (ancak her zaman değil) tümör bölgesinde aşırı mukus üretimi ile diğer tümör türlerinden ayırt edilebilir. Genellikle akciğerin dış kısımlarında yer alır ve diğer tümör türlerinden daha yavaş büyüme eğilimindedir. Kadınlarda erkeklerden daha yaygındır ve sigara içmeyenlerde görülen en yaygın akciğer kanseri türüdür [51]

2.1.2.2. Skuamöz hücreli karsinom (epidermoid karsinom)

Skuamöz hücreli karsinom (SCC), LC'nin %25-30'unu oluşturur [52] Adenokarsinomun aksine, SCC, alveoler lümeni kan damarlarından ayıran hava yollarının iç kısmındaki ince tek tabakayı oluşturan skuamöz hücrelerin erken versiyonlarından kaynaklanır. Bu tümörler çoğunlukla akciğerlerin sentral kısmında, ana bronşun yakınında bulunur. 2015 WHO sınıflandırmasında SCC üç alt tipe ayrılır: keratinize SCC, keratinize olmayan SCC ve bazaloid SCC.[54] Genellikle yaşlı erkeklerde bulunur ve sigara içme öyküsü gelişimiyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. SCC, geç metastaz geliştiren yavaş büyüyen bir tümördür, bu da onu cerrahi rezeksiyonla tedavi için uygun hale getirir [55]. Ancak, bu tümör tipi kemoradyoterapiye karşı yüksek duyarlılık göstermez.

2.1.2.3. Büyük hücreli karsinom

Büyük hücreli karsinom, akciğer kanseri'nin %5-10'unu oluşturur [52]. Hızlı büyüme ve yayılma eğiliminde olan büyük, zayıf farklılaşmış hücrelerle karakterizedir. Bazı alt tipler küçük hücreli akciğer kanserine benzeyebilir, örneğin büyük hücreli nöroendokrin karsinom. Akciğerin herhangi bir yerinde, bölgeye özgü afinite olmadan ortaya çıkabilir [51].

2.1.3. Akciğer Kanseri Evrenlenmesi

Herhangi bir hastanın klinik evresi, kesin tedavinin başlatılmasından önce klinisyenin hastalığın kapsamına ilişkin en iyi ve nihai tahminidir. Bu nedenle, klinik evre tüm kanser tedavisi önerilerinin temelidir. Evreleme, kanserin kapsamını anatomik özelliklerine ve bu özelliklere sahip hastaların benzer sağ kalımlarına göre tanımlar. Akciğer kanseri şüphesi olan her hasta için, tercih edilen tanı prosedürü, tanı olasılığını ve tümörün evre yaygınlığını en üst düzeye çıkarmalı, gereksiz test veya prosedürleri en aza indirmeli ve hastaya ortak tedavi kararlarını kolaylaştırmak için yeterli bilgi sağlamalıdır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), küçük hücreli karsinoma kıyasla daha periferik yerleşme ve daha yavaş büyüme eğiliminde olduğundan genellikle erken evrelerde asemptomatiktir. Bununla birlikte öksürük, balgam çıkarma, hemoptizi, göğüs ağrısı, kilo kaybı ve dispne en sık görülen yakınmalar arasındadır [56]. Lokal ileri evrede hastalar ses kısıklığı, plevral veya perikardiyal efüzyon, frenik sinir paralizisi, süperior vena cava sendromu, Pancoast sendromu, yutma güçlüğü veya kaşeksi gösterebilir. Ayrıca beyin, kemik, adrenal veya karaciğer gibi organlarda uzak metastazların indirekt bulguları olabilir [57]. Fizik muayene sırasında, yer kaplayıcı lezyona, atelektaziye veya plevral efüzyona bağlı olarak azalmış solunum sesleri veya endolüminal yerleşim gösteren tümörlerin varlığına bağlı olarak wheezing olarak bilinen sesler işitilebilir. Bilateral supraklavikuler ve skalen lenf nodu muayenesi, primer akciğer kanseri ön tanısı ile değerlendirilen hastalarda çok önemlidir. İnvaziv olmayan radyolojik değerlendirme, lezyonun boyutunu, çevreleyen yapıların tutulumunu ve genel olarak çıkarılabilirliği değerlendirmek ve belirlemek için adrenal bezler üzerinden göğüs

röntgeni ve göğüs BT taramasıyla başlar. Akciğer kanserini tespit etmede BT taramasının duyarlılığı %50 ile %80 arasındadır. PET taraması akciğer kanserlerini, özellikle uzak metastatik hastalıkları tespit etmede yüksek duyarlılığa (aralığı:%79–%95) sahiptir, ancak hastalık belirlemede daha düşük özgüllüğe sahiptir. Entegre BT/PET hem duyarlı hem de özgüldür ve nihai histopatolojik evrelemeye kıyasla %98 oranında doğru tümör evrelemesi sağlar [58]. Beyin metastazları değerlendirilmesi için kranial manyetik rezonans (MR) görüntüleme kullanılır [59]. Bronkoskopi kullanılarak bir dizi evreleme ve tanı prosedürü geliştirilmiştir. İnvaziv bronkoskopik prosedürler arasında transbronşiyal iğne aspirasyonu, endobronşiyal ultrason biyopsisi (EBUS-FNA), endoözofageal ultrason ince iğne aspirasyonu (EUS-FNA) ve transbronşiyal ve transözofageal iğne biyopsisi yer alır. Histopatolojik tanıda ise en az invaziv olan yöntemden en invaziv yöntem doğru en uygun olan yöntem seçilir. Balgam sitolojisi, bronkoskopi, transtorasik iğne aspirasyonu veya video yardımcı torakoskopik cerrahi (VATS) tercih edilebilir. Klinik ve radyolojik değerlendirme ile hastada tümör (T), lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) klinik evrelemesi yapılır [60]. Evreler 0 ile IV arasında değişir, 0 en erken evredir (aynı zamanda karsinoma in situ olarak da adlandırılır). Benzer şekilde, evre içinde daha erken bir harf/sayı daha düşük bir alt evreyi belirtir. İlginç bir şekilde, kanser evresi, uygun türünden daha önemli görünmektedir, çünkü farklı kanser türlerinin aynı evreleri benzer görünüm gösterir ve genellikle aynı şekilde tedavi edilir [61]. Örneğin, en az agresif evre olan evre IA1 için ameliyattan sonraki 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %90 iken, daha ileri evre olan evre IIIC için yaklaşık %12'dir [4,62] .

2.1.4. Tümör ve Bağışıklık

2001 yılında, 2011 yılında derinlemesine bir güncelleme ile Hanahan ve Weinberg [63], ““Kanser Belirtileri”” adı altında normal hücrelerin tümörijenik bir profile doğru çok adımlı bir başlangıcını, dönüşümünü ve ilerlemesini açıklayan bir çalışma sundular. Bağışıklık sistemimiz, vücudumuzun yakın gözetimi (örneğin dendritik hücreler (DC)) yoluyla bu değişikliklere uyum sağlayacak şekilde tasarlanmıştır; bu da antitümör yanıtı (sözde "eliminasyon" aşaması) ortaya çıkarabilir. Ancak bazı tümör hücreleri, yüzey tanıma moleküllerini azaltarak veya bağışıklık baskılayıcı sitokinler üreterek bu "temizleme" aşamasından kaçınabilmektedir [6]. Hayatta kalan bu hücreler bağışıklık

sistemiyle dinamik bir denge içinde genişlemeye başlar; tanınabilir epitoplarla sonuçlanan genetik değişikliklere sahip hücreler bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılır, diğerleri çoğalmaya devam eder [63,64]. Tümör bağışıklık sistemi tarafından artık tanınmadığında, aynı zamanda vurgulanmış bağışıklık baskılayıcı yapısıyla da karakterize edilen "kaçış" [6] aşamasına girer: Düzenleyici T hücrelerinin (Treg'ler) ve miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin (MDSC) kanser bölgesine alınması [64]. İmmün baskılanmaya dayalı immün ayrıcalıklı bir mikroçevre yaratan tümörler arasında, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) de yer almaktadır. Tümör hücreleri tarafından immünoşüpresif sitokinlerin üretimi, Treg'lerin sıklığında ve baskılayıcı kapasitesinde bir artışa neden olur [65], ancak aynı zamanda baskılayıcı yüzey moleküllerinin ifadesini de artırır. Bu tür moleküllerden biri, tümör yatağındaki programlanmış hücre ölümü proteini 1 ligandına (PD-L1) bağlanan ve anti-tümör yanıtının ortadan kalkmasına yol açan CD8+ T hücrelerindeki programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1) reseptörüdür [66]. Ayrıca, NSCLC tümör hücreleri, olgunlaşmalarını engelleyerek ve dolayısıyla yeterli bağışıklık tepkisini uyararak, son yanıtın "yukarı akışında" DC hücrelerini etkileme olasılığına sahiptir. Bu DC'ler daha yüksek miktarda dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β) üretir ve bu nedenle Treg'lerin güçlü indükleyicileridir [67]. İnterlökin (IL)-17, NSCLC'nin ilerlemesinde bir diğer önemli faktör olarak kabul edildi. CD4+ T yardımcı (Th) Th17 hücreleri, makrofajlar ve CD8+ T hücreleri tarafından salgılanan IL-17'nin [68], diğerlerinin yanı sıra IL-6, IL-8, IL-18, tümör nekroz faktörü α (TNF α) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretimini uyardığı gösterilmiştir [69,70]. Bu sitokinler, tümör ortamında anjiyogenezi ve tümör ilerlemesini uyaran Th2 bağışıklık profilini destekler [71]. Ek olarak, IL-6'nın kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) benzeri inflamasyonu teşvik ederek akciğer kanserinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. IL-17'nin (ve tüm Th17 setinin) akciğer tümörü immünolojisindeki rolü, birçok çalışmada efektör sitotoksik T hücresi üretimi ve anti-tümör yanıtının indüklenmesi üzerinde olumlu etki bildirildiğinden, uzun ve karmaşık bir tartışmanın konusu olmuştur [72–74]. Hatırlatma olarak, CD4+ yardımcı T hücreleri salgılayan sitokinlere ve fonksiyona bağlı olarak farklı profillere ayrılır: Th1, Th2, Th9, Th17 ve Treg. Yakın zamana kadar, akciğer kanserindeki çalışmalar pro ve antitümör yanıtı arasındaki dengenin ana göstergesi olarak yalnızca Th1/Th2 oranını dikkate alıyordu. Uzun süreli

dogma, IL-2 ve interferon gama ($IFN\gamma$) üreten Th1 hücrelerini antitümör yanıt profiline sınıflandırırken, Th2'nin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL13 üreten protümoral yanıtın bir parçası olarak kabul edildiği görülmüştür. Periferik kandaki Th1 ve Th2 arasındaki dengenin sağlıklı kontroller ve akciğer kanseri hastaları arasında farklılık gösterdiği gösterilmiştir [75]. Th2 sitokinlerinin konsantrasyonundaki artışın, dengeyi immünoşüpresif profile kaydıracağı ve bunun sonucunda daha tümör oluşumuna neden olan bir ortam ve daha yüksek nüks oranı yarattığı öne sürülmüştür [76]. Öncelikle, her iki setin de hem retinoik asitle ilişkili yetim reseptör gama t ($ROR\gamma t$) hem de çatal başlı kutu protein 3 (FOXP3) genlerini ve kemokin reseptörleri CCR6 ve CCR4'ü ifade eden ortak bir progenitörü paylaştığını söylemek önemlidir. $TGF\beta$, iki hücre tipini farklılaştıran merkezi bir unsur olarak bulundu. IL-1 β , IL-6 ve düşük doz $TGF\beta$ 'nin varlığı, $ROR\gamma t$ genlerinin ifadesini uyararak ortak progenitörün Th17 hücre setine farklılaşmasını uyarır. Farklılaşmanın kendisi mikroplar tarafından aktive edilen DC'ler tarafından uyarılır [76]. Öte yandan, retinoik asidin varlığı $TGF\beta$ üretimini uyarır ve her ikisi de $ROR\gamma t$ ekspresyonunu (yani Th17 gelişimini) inhibe etme potansiyeline sahiptir, bu da FOXP3 ekspresyonunu ve Treg hücre setine doğru farklılaşmayı destekler [77]. Ancak Treg'lerin IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 gibi inflamatuvar sinyallerin varlığında Th17'ye dönüşebildiği bildirilmiştir [78]. Th17/Treg dengesi, akciğer kanseri hücreleri tarafından $TGF\beta$ 'nin aşırı ekspresyonu nedeniyle akciğer kanserinde özellikle ilgi çekicidir. Bu nedenle, bağışıklık baskılanması ve azalmış anti-tümör yanıtıyla ilişkili Treg farklılaşmasını desteklerler. Bu durum, daha yüksek Th17/Treg oranının tümör evreleriyle, daha yüksek $TGF\beta$ 'nin ise metastaz vakalarıyla negatif korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalarla da desteklenmektedir [78,79].

2.2. Mikrobiyota ve akciğer kanserine bağlantısı

2.2.1. Mikrobiyota nedir?

Çoğunlukla "bakteri" kelimesinin eş anlamlısı olarak kullanılmasına rağmen, "mikrobiyota" organizmamızda farklı tipte komensal ilişkilerde yaşayan bakterileri, arkeleri, mantarları, virüsleri ve protistleri içeren çok daha geniş bir terimdir [80]. Genlerinin bir araya gelmesiyle oluşan topluluğa bu nedenle "mikrobiyom" adı verilir [81]. İnsan genomunu 100 kata kadar aşan ve konakçının homeostazıyla yakından ilişkili olan etkileyici boyutuna uygun olarak "ikinci genom" veya "unutulmuş organ" adı verilir [82–84].

2.2.2. Hastalıkta ve sağlıkta akciğer mikrobiyotası

2.2.2.1. Alt solunum yollarının çevresi

Ses telleri, üst ve alt hava yolları arasında bir sınır olarak kabul edilir ve sürekli bir mukoza tabakasıyla karakterize edilmelerine rağmen, bu iki kısım hem anatomik hem de işlevsel olarak çok farklıdır [85]. Akciğer epiteli, aralarında silli sütunlu mukus salgılayan kadeh hücreleri ve yüzey aktif maddeleri salgılayan hücrelerin sıkı bağlantılarla birbirine bağlı olduğu ince bir skuamöz hücre tabakasından oluşur. Sağlıklı akciğerlerde mukus üretimi düşük orandadır ve homeostazisi korumak için yeterli bir koruyucu tabaka oluşturur (hücrelere mikrobiyal yapışmayı engeller) [86]. Hücrelerin yüzeyinde, virüslerden, bakterilerden, mantarlardan, protozoalardan ve hücre içi parazitlerden PAMP'leri tanımaya yarayan TLR gibi desen tanıma reseptörleri (PRR'ler) bulunur. Hücreler, yanıt olarak, yüzey aktif madde protein A, lizozim, laktoferrin, defensinler, tamamlayıcı bileşenler gibi birden fazla antimikrobiyal peptit salgırlar [87]. Epitelin bir diğer rolü de, senkronize hareketleriyle partiküllerin üst solunum yollarına doğru temizlenmesini kolaylaştıran ve burada öksürme yoluyla nihai olarak uzaklaştırılan sillerde yatmaktadır [86,88].

2.2.2.2. Akciğerler steril değildir

Mikrobiyota araştırmaları için en büyük ortak dünya çapındaki proje olan İnsan Mikrobiyomu Projesi (HMP), araştırma ilgi alanları olarak burun deliklerini ve ağız boşluğunu içeriyordu, ancak ilginç bir şekilde alt solunum yollarını içermiyordu [89]. Bu nedenle, bugüne kadar akciğer mikrobiyal bileşimi ve bunun konak fizyolojisi ve bağışıklık sistemiyle etkileşimi hakkındaki bilgi henüz çok az araştırılmıştır [90,91]. Örneklemenin zorluğu, örneklerin düşük biyokütlesi ve sonuç olarak örnekleme sırasında üst hava yollarıyla kontaminasyon riskinin yüksek olması (akciğerlerde 16S rRNA gen kopyalarının 100 ila 10.000 kat daha az olması) gibi başka sakıncalar da olmuştur [17,92]. Akciğer mikrobiyotası çalışmalarında en sık üç örnek türü bulunur: doku, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) ve balgam. Etik olarak en az kabul edilebilir (yani en nadir) ancak en düşük kontaminasyon riskini temsil eden, başlangıçta akciğer nakli hastalarından elde edilen dokudur. Balgam, en yüksek kontaminasyon riskine sahip ancak elde edilmesi en kolay örnektir. Bu nedenle, çoğu çalışma kabul edilebilir bir uzlaşmayı temsil eden BAL üzerinde gerçekleştirilir; lob yıkama ile alt solunum yolu akciğer mikrobiyotasının doğrudan örnekleme, ancak bronkoskop hava yollarından geçirilir [17,93–96]. Akciğerler, oksijen ve karbondioksit gerginliğinin gradyanlarında sürekli değişiklikler olan, birbirine bağlı dallanan tüplerden oluşan son derece hacimli içi boş bir sistemdir. Bu, alt hava yollarında bulunabilecek mikrobiyal topluluklar üzerinde oldukça seçici bir baskı yaratır. Sağlıklı koşullar altında, hem kùltüre bağımlı hem de bağımsız tekniklerle bildirildiği üzere, alt solunum yollarında bakteri topluluklarının sürekli bir değişimi vardır. Uyarlanmış ada modeli teorisi, üst hava yollarının alt hava yollarının mikrobiyal çeşitliliğinin kaynağı olduğunu ve bu çeşitliliğin merkezi bronştan daha uzak akciğer kısımlarına doğru ilerledikçe azaldığını öne sürmektedir. Dickson ve diğerleri tarafından gündeme getirildi. (2015) mikrobiyotası BAL ile akciğerin farklı kısımlarından örnekleme 15 sağlıklı gönüllüyü kapsayan çalışmaya. Bu deneklerde üst loblardaki BAL mikrobiyotası, alt loblardaki BAL mikrobiyotasından ziyade üst solunum yolu mikrobiyotasına daha çok benziyordu. Ayrıca yazarlar, sağlıklı deneklerdeki akciğer mikrobiyotasının, yerel büyüme koşullarından ziyade göç ve eliminasyon oranından etkilendiğini ileri sürmüşlerdir. İlerlemiş akciğer hastalıklarında bunların daha fazla önem taşıdığını söylüyorlar. Akciğer mikrobiyotası, bileşimi itibariyle ağız, burun, deri, vajina

veya dışkı mikrobiyotası gibi diğer mikrobiyotalardan açıkça farklıydı. Benzer şekilde, Proteobakterilerin dokularda ortalama %60 bağıl bolluğa sahip baskın filum olduğu rapor edildi. Akciğer yüksek oranda havalandan bir organ olmasına rağmen, kültürden bağımsız çalışmalarda anaerob ve aerobların bir arada bulunduğuna ilişkin raporlar, biyofilmlerin alt solunum yolu mikrobiyotasında [97,98] ve ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* vakasında görüldüğü gibi potansiyel patojenitede çok önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir [99].

2.2.2.3. Enfeksiyon ve inflamasyon

Sağlıklı bir durumda akciğerler besin açısından zayıf bir kaynaktır ve bu nedenle çok az sayıda bakteri barındırır [95]. Ancak doğal bariyerlerimiz potansiyel olarak zararlı parçacıkları veya mikropları ortadan kaldırmaya yetmediğinde enfeksiyondan bahsediyoruz. Enfeksiyon, nedenini ortadan kaldırmasına rağmen, yerel gaz gerginliklerini, sıcaklığı veya pH'ı etkileyerek dokuyu değişmiş halde bırakan ve bu nedenle çeşitli bakteriler için daha elverişli büyüme koşulları yaratabilen inflamatuvar yanıtla birlikte görülür [94]. Örneğin, mukus üretimi iltihaplanmanın yaygın bir eş zamanlı oluşumudur ve potansiyel bir besin kaynağı görevi görür [95]. Ayrıca, bağışıklık sistemi kendini bağışıklık sistemi baskılanmış bir durumda bulur, bu da PAMP tanıma için yüzey belirteçlerinin (örneğin makrofajlar veya epitel hücreler üzerindeki TLR'ler gibi) veya hücreler içindeki farklı genetik modifikasyonların enfeksiyondan önceki aynı ifade düzeyine hemen geri dönmeyebileceği anlamına gelir [100,101]. Bu durum akciğerlerin tekrarlayan enfeksiyonlara karşı daha duyarlı olmasına yol açar. Bir örnek olarak akciğer tüberkülozundan sorumlu patojen olan *Mycobacterium tuberculosis* ele alınır. Çalışmalar, kalıcı enfeksiyonun TNF α ve IFN γ üretimini tetiklediğini ve bunun da inflamasyona ve akciğer fibrozuna yol açtığını göstermiştir[102]. Ayrıca, bazı vakalarda akciğer kanseri bu enfeksiyon bölgesi "izlerinden" gelişmiş olup, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun akciğer kanseri gelişimi için bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir[103,104]. Tedavi edici bir amacı olmasına rağmen, antibiyotiklerin uygulanması toplum dengesi ve enfeksiyon üzerinde potansiyel olarak istenmeyen bir etkiye de sahip olabilir. Mikrobiyal toplulukların bozulması, hedef organizmaları temizlerken, fırsatçı patojenler haline gelebilecek veya akciğerde halihazırda bulunan patojenler için bir niş açabilecek belirli hayatta kalan komensallerin yayılmasına yol

açabilir. Her ikisi de aynı enfeksiyon sürecine girer ve inflamatuvar yanıtı tetikler [105]. Hastane zatürresi bu mekanizmaya dayanıyor [106].

2.2.2.4. Yaş

Şu anda bağışıklık yaşlanmasının akciğer tepkilerini nasıl etkilediği hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, akciğer habitatının yaşla birlikte değiştiği kesindir [107]. KOAH veya pulmoner fibroz üzerine yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi akciğerler enfeksiyonlara ve inflamatuvar tepkilere karşı daha duyarlı hale gelir [105]. Yerleşik akciğer mikrobiyotasının rolü ve bunun "yaşlanması" şu an için bilinmiyor.

2.2.2.5. Sigara ve alkol

Daha önce hem alkol hem de sigaranın baş ve boyun kanseri için güçlü risk faktörleri olduğu kabul edilmişti [108]. Akciğer kanseri riskini artırmada sinerjik etkilerinin yanı sıra [109] Ancak, akciğer mikrobiyotasıyla etkileşimleri hakkında çok az şey bilinmektedir. İlginçtir ki, sigara içmek akciğer kanseri gelişimi için ana risklerden biri olmaya devam etse de, şu anda üst solunum yollarının aksine, alt solunum yollarının mikrobiyotasını doğrudan etkilemiyor gibi görünüyor [109]. Bununla birlikte, daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır ve gelecekteki çalışmalar sigara içmenin bu değişikliğin nedeni olmaktan ziyade, hastalığı ve dolayısıyla mikrobiyal kompozisyonu etkileyen bir yardımcı faktör olduğunu belirleyebilir. Lokal hasara ve iltihaplanmaya neden olan bir diğer kötü alışkanlık da alkoldür. Kötülük, alkolü kanserojen asetaldehite dönüştüren alkol dehidrogenaz enziminde yatmaktadır [110]. Bu enzim ve yüksek aktivitesi, diğerlerinin yanı sıra, ağız mukozasında bulunan bir komensal olan Betaproteobacteria sınıfından bakteri cinsi olan Neisseria'da olmak üzere çeşitli mikrobiyal gruplarda kaydedildi. Bu nedenle yüksek alkol tüketimi, akciğere inerek doku hasarına ve subklinik inflamasyona neden olabilen bu ve diğer kanserojen metabolitlerin aşırı üretimine yol açabilir.

2.2.2.6. Mikroaspirasyon ve pnömotipler

Mikroaspirasyon tüm bireylerde görülür ancak KOAH, astım veya akciğer enfeksiyonları gibi bazı hastalıklarda yükselir ve subklinik akciğer iltihabına neden olur [111,112]. İnflamasyonun nedeninin alt solunum yollarının supraglottik taksonlarla zenginleşmesinde yattığı öne sürülmüştür. 29 asemptomatik sağlıklı denekten alınan BAL mikrobiyotası çalışmasında, Segal ve ark. (2013) iki farklı pnömotip tespit etmiştir.

Pnömotip BPT (arkaplan baskın taksonlar), düşük topluluk zenginliği ve rRNA gen konsantrasyonu ile karakterize edilmiş ve TNF α , IL-6 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, pnömotip SCT (supraglottik karakteristik taksonlar), *Veillonella* ve *Prevotella* gibi SCT'nin daha yüksek oranda göreceli bolluğuna, önemli ölçüde daha yüksek lenfosit ve nötrofil sayısına sahipti ve NO miktarları üretti. Diğer çalışmalar, SCT pnömotipine *Rothia*, *Streptococcus* ve *Porphyromonas*'ın eklenmesiyle benzer sonuçlar bulmuştur [112,113].

2.2.2.7. Kronik inflamasyondan akciğer kanserine

Akciğer kanserinde iltihabın rolü doğal olarak ilk akla gelmese de, akciğer kanserinin gelişimi kronik iltihapla yakından ilişkilidir. Akciğer dokusu hasarı veya yabancı epitoplara tanınması durumunda, iltihaplı hücrelerin infiltrasyonu vardır. Ancak, bir sebepten ötürü, inflamasyonda bir çözüm olmaz ve proinflamatuvar faktörlerin uzun süreli atılımı sonunda aşırı doku yıkımına yol açar. Aynı zamanda, doku hasarına yanıt olarak hücre çoğalmasını, anjiyogenezi ve doku yeniden şekillenmesini uyaran sitokinler ve kemokinler gibi doku onarımından sorumlu faktörler, hasarlı veya düzensiz hücrelere hayatta kalma sinyalleri gönderir. Tüm bunlar, mutagenezi ve metastaz için mükemmel bir ortam yaratır [114]. Birkaç çalışma, KOAH ile akciğer kanseri gelişimi arasındaki bağlantıyı zaten ortaya koymuştur. Bu nedenle akciğer kanserinde akciğer mikrobiyotasının rolü dikkate alınması gereken önemli konulardan biri olarak önerilmiştir.

2.2.3. Akciğer kanseri ve mikrobiyota

Soru basit: Akciğer mikrobiyotasındaki değişim akciğer kanseri gelişiminin nedeni mi yoksa akciğer kanseri gelişimi çevredeki mikrobiyotadaki değişime mi neden oluyor? Cevap daha az basit ve muhtemelen her vakaya büyük ölçüde bağlı olacaktır [115,116]. Tümörlerin bakteriler tarafından kolonize edilmesi zaten düşünülmüştür [117]. Büyüyen solid tümörler, kan damarlarını sızdıran ve düzensiz hale getiren neo-anjiyogeneze neden olur. Bu, bakterilerin tümöre girmesine ve bir bağışıklık tepkisini tetiklemesine izin verebilir[118]. Ancak aynı zamanda, hatalı kan temini ilaç iletimini tehlikeye atar ve kendi başına hızla çoğalan tümör hücrelerinin oksijen ihtiyaçları için yeterli değildir [119]. Bu, laktat dehidrogenazın artan aktivitesiyle merkezde nekrotik ve

hipoksik bir ortamın oluşmasına yol açar ve bu da laktat üretimiyle pH'ı düşürür. Bu özel koşullar ayrıca anaerobik asidofilik bakterilerin kolonizasyonunu ve çoğalmasını daha da kolaylaştırabilir [120]. Ayrıca tümör hücrelerinin genetik dönüşümü, normal hücrelerde bulunmayan bakteriyel yapışma noktaları olarak görev yapabilecek belirli epitoplarn ekspresyonunu uyararak tümör kolonizasyonunu kolaylaştırabilir [121,122]. Bu kolonizasyonun karsinogenezde doğrudan rolü olan her iki olumsuz etkisi de diğer bölgelerde (örn. *Helicobacter pylori*, *Fusobacterium nucleatum*) [123,124] ve farklı modellerde [84] iyi bir şekilde belgelenmiştir ve ayrıca örneğin anaerobik *Clostridium* sporlarının bağışıklık uyarıcı özellikleri tümör gözetimini geliştirmektedir [125]. Ancak, şu an için akciğer bakterilerinin akciğer kanseri gelişimi veya baskılanmasındaki rolü bir gizem olarak kalmaktadır.

2.2.3.1. Akciğer kanserinde mikrobiyota

Ayrıca, Akciğer kanserine kronik inflamasyon, yakın zamana kadar akciğer kanseri bir inflamasyon durumuyla ilişkilendirilmemişti ve spesifik patojenle enfeksiyonun bir sonucu olarak tedavi edilmiyordu; bu nedenle, tümör içindeki veya tümör ortamındaki mikrobiyotayı incelemeye yönelik gerçek bir ihtiyaç görülmedi. Benzer şekilde, invaziv ve bu nedenle gerçekleştirilmesi zor olan örnekleme yöntemleri (akciğer dokusu veya tümör örnekleri) bu türde az sayıda çalışmaya katkıda bulundu. BAL'dan mikrobiyota üzerinde yapılan çalışmalar en yaygın olanı olmaya devam ediyor. Şu an için hastalıkla doğrudan bir bağlantısı olmasa da, Gram-negatif basillere (*H. influenzae*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*) ve Gram-pozitif Mikobakterilere ait belirli patojenik bakteriler akciğer kanseri hastalarında tanımlandı [126]. Başka bir çalışmada akciğer kanseri hastaları ve kontrol olarak iyi huylu biyokütlelere sahip hastalar arasında BAL mikrobiyotası karşılaştırıldı. İki phyla, *Firmicutes* ve *TM7* ve iki cins, *Veillonella* ve *Megasphaera'nın* akciğer kanseri hastalarında daha fazla olduğu belirlendi. Yazarlar bu iki cinsin birlikte akciğer kanserini %0,888 doğrulukla tahmin edebileceğini gösterdi. İlginç olan, *TM7'nin* KOAH üzerine yapılan bazı çalışmalarda da yükselmiş olarak bildirilmesidir; bu, onu KOAH'ın akciğer kanserine geçişinde potansiyel bir mikrobiyal aday haline getirir. Yazarlar ayrıca, *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* arasındaki oranın sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir;

bu, sigara içmenin halihazırda yerleşmiş hastalık sırasında mikrobiyal modifikasyonun yardımcı faktörü olabileceğini düşündürmektedir. Liu ve ark. (2018), tümör lobu ile kontralateral lob arasındaki BAL mikrobiyotasını karşılaştırarak, tümör lobunda çeşitlilikte önemli bir azalmanın yanı sıra *Streptococcus* ve *Neisseria* cinslerinin bolluğunda artış olduğunu belirtmiştir. Şu anda, sadece iki çalışma kötü huylu olmayan doku eşleştirilmiş tümörün mikrobiyotasını analiz etti[127,128], Yu ve ark. (2016), kötü huylu olmayan doku örneklerinin %80'inde bulunan çekirdek mikrobiyotayı *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumunun üyeleri olarak tanımladı. İlginç bir şekilde, cins düzeyinde, çekirdek mikrobiyota olarak belirlenen beş cins *Proteobacteria* filumuna aitti: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* ve *Comamonadaceae* ve *Oxalobacteraceae* familyalarından iki cins daha. Tümör dokusuyla karşılaştırıldığında, kötü huylu örneklerde gözlenen alfa çeşitliliği tümör dokusundan daha yüksekti. Tümör histolojisi ile yapılan analiz, adenokarsinomun skuamöz hücreli karsinom ile karşılaştırıldığında filogenetik çeşitliliğinin önemli ölçüde arttığını, *Thermus* cinsinin bolluğunda artış olduğunu ve *Ralstonia*'da azalma olduğunu gösterdi. İlginç bir şekilde, Peters ve ark. (2019) malign olmayan dokudaki daha yüksek çeşitliliği, nüksüz ve hastalısız sağ kalımda azalma ile ilişkilendirirken, tümör mikrobiyotası ile hiçbir bağlantı görülmedi. Akciğer mikrobiyotası sağlıklı deneklerin ve akciğer kanseri hastalarının balgam örneklerinde de analiz edildi. Akciğer kanseri hastalarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında *Synergistetes* ve *Spirochaetes* filumlarının bolluğunda önemli bir azalma görüldü (Hosgood ve ark. 2015). Başka bir retrospektif çalışma, *Streptococcus viridis*'i akciğer kanseri geliştiren hastalarda önemli ölçüde daha bol bulunan tek tür olarak tanımladı. 2015 yılında, akciğer kanseri hastalarında *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Veillonella* ve *Neisseria* cinslerinin sağlıklı kontrollere kıyasla daha fazla bolluğa sahip olduğunu gösteren tükürük mikrobiyotası üzerine bir makale yayınlandı. *Capnocytophaga* ve *Veillonella* üzerindeki sonuçlar qPCR ile daha da doğrulandı. Dahası, bu iki cinsin kombinasyonu, sağlıklı denekleri skuamöz hücreli ve adenokarsinomlu hastalardan ayırt etmede sırasıyla 0,86 ve 0,80'lik bir alıcı işlem karakteristiği (ROC) değeri üretti.

Örnek kaynağı ne olursa olsun, *Granulicatella*, *Streptococcus* ve *Veillonella* gibi bazı bakteri cinsleri birkaç çalışmada önemli görünmektedir (Cameron ve ark. 2017;

Hosgood ve ark. 2015; Lee ve ark. 2016; Liu ve ark. 2018; Yan ve ark. 2015). Ek olarak, *Streptococcus* ve *Granulicatella* cinsleri fakültatif anaerob iken, *Veillonella* zorunlu bir anaerobdur (Mur ve ark. 2018), bu da biyofilmlerin varlığını ve akciğer kanserindeki potansiyel rollerini gösterebilir. Bu bulgular, akciğer kanserinin yerel mikrobiyotadaki spesifik değişikliklerle birlikte olduğu hipotezini doğrulamaktadır. Ancak, bu etkileşimi açıklığa kavuşturmak ve ayrıca örnekleme konumuna (tümör, bitişik doku, kötü huylu olmayan doku, alveoler lümen, balgam, tükürük) bağlı değişiklikleri daha iyi karakterize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.2.4. Örnekleme

İnsan solunum yolu, yüzlerce kilometrelik hava yollarından ve cildin 30 katı büyüklüğünde bir yüzey alanından oluşan muazzam ve mekansal olarak heterojen bir ekosistemdir. Mikrop yoğun farenksten mikrop seyrek alveollere kadar uzanır ve mikrobiyal göç ve eliminasyonun dinamik bir dengesini barındırır. Bu nedenle, akciğer mikrobiyotasının örnekleme özel hususlar gerektirir: anatomik, fizyolojik, mikrobiyolojik ve prosedürel.

2.2.4.1. Bronkoscopi örnekleri

Bronkoskopik olarak alınan örnekleri, balgamla birlikte akciğer mikrobiyomu çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Enfeksiyonlar için iyi bilinen bir tanı aracı olan bronkoskopik örnekleme, yetişkinlerde yalnızca bilinçli sedasyon gerektirmesi, perioperatif antibiyotiklerden kaçınması ve seri örnekleme için izni vermesi gibi balgamdan daha invaziv olmasına rağmen avantajlar sunar [129]. Küçük faringeal kontaminasyon riski taşısa da, çalışmalar bu etkinin minimum olduğunu doğrulamaktadır. Korunmuş örnek fırçaları gibi kontrol örnekleri, bronkoskopik örnekleme önemli faringeal kontaminasyon olmadan alt solunum yolun mikrobiyotasını doğru bir şekilde yansıttığını doğrulamaktadır [129–131]. Distal hava yollarını örnekleme için standart bir yöntem olan bronkoalveolar lavaj (BAL), hem alveolar hem de küçük hava yolu yüzeylerini örnekleme üzere tuzlu su damlatılmasını ve alınmasını içerir. Seyreltme değişkenliğine rağmen, BAL örnekler arasında yüksek bakteriyel DNA varyasyonu nedeniyle yorumlanabilir [17,132]. Teknikler değişse de, çalışmalar içindeki tutarlılık prosedürel önyargıyı önler ve sağ orta lob en sık yıkanır [131]. Lavaj hacimleri ve örnek işlemleri

değişse de, hem tam hem de hücresiz lavaj sıvıları kullanılır ve her biri tespit edilen bakteri çeşitliliğini etkiler [133]. Genellikle kronik hava yolu hastalıkları araştırmalarında kullanılan korumalı örnek fırçalama, kontaminasyona karşı ekstra bir koruma sağlar ancak BAL'a kıyasla daha küçük bir örnekleme alanına sahiptir [96,134,135]Bronkoskopi sırasında kontaminasyon risklerini azaltmak için prosedürel kontroller önerilir, ancak kontrol örneklerindeki bakteri yükü düşüktür. Tek kullanımlık bronkoskoplar çapraz kontaminasyon riskini azaltabilir, ancak kimyasal sterilizasyonla yeniden kullanım minimum bakteri taşınmasını gösterir [136]. Hasta pozisyonu ve örnekleme sırası gibi bazı prosedürel faktörler açıkça test edilmemiş olsa da, kanıtlar bronkopik mikrobiyom çalışmalarında minimum kontaminasyon riski olduğunu göstermektedir [137].

2.2.4.2. Balgam

Astım, Kistik Fibroz ve bronşektazi gibi kronik hava yolu hastalıklarında temel bir örnek türü olan balgam [138] karmaşıktır ve hastalığa göre değişir. Standart bakım, enfeksiyon tedavisine rehberlik eden balgam kültürünü içerir. Balgam genellikle tükürük kontaminasyonunu içerir ve tam olarak hangi solunum yolu bölgesini temsil ettiği belirsizdir. Bronkopinin kontrendike olabileceği ciddi vakalarda balgam, sedasyon olmadan invaziv olmayan, daha sık örnekleme seçeneği sunar. Tüm hastalar balgam üretmez (örn. pediatrik kistik fibroz vakalarının %45'i [139]) ve tedavi sırasında üretim durabilir ve bu da uzunlamasına çalışmaları sınırlar [140]. Balgamın viskozitesi nedeniyle işlenmesi zor olabilir; bazıları ditiyotritol gibi çözücü maddeler ekler, ancak bu mikrobiyom bileşimini etkileyebilir. Spontan üretim olmadığında yararlı olan indüklenen balgam, bileşimde farklılık gösterebilir ve ayrı olarak analiz edilmelidir [141–143]

2.2.4.3. Cerrahi olarak çıkarılan örnekler

Torakotomi steril akciğer dokusu örneklemesine izin verir ve teorik olarak faringeal kontaminasyonu önler. Ancak bu yöntem maliyet, risk ve hastanın perioperatif antibiyotiklere maruz kalmasıyla sınırlıdır [144,145]. Ek olarak, genel anestezi ve entübasyon faringeal salgıların aspirasyonu riskini artırabilir. Küçük doku örnekleri düşük bakteriyel sinyaller verebilir ve yanlış negatif sonuç riski doğurabilir [146]. Formaldehit gibi doku sabitleyicilerden kaçınılmalıdır, çünkü bunlar DNA'yı bozar ve bakteriyel sinyalleri gizler [147].

2.2.4.4. Çıkarılan akciğer

Akciğer mikrobiota için ideal örnek, bütün akciğerlerdir; ancak akciğerler genellikle yalnızca son aşama hastalıklarda çıkarılmakta, bu da ara hastalık evreleri veya sağlıklı akciğerlerle ilgili bilgi edinmeyi sınırlamaktadır. Transplantasyon için uygun olmayan akciğerler normal mikrobiyotayı temsil etmeyebilir ve kullanılmayan akciğerler değişmiş topluluklar gösterebilir. Bu sınırlamalara rağmen, çıkarılan örnekler, akciğer mikrobiyotasının biyocoğrafyasına dair önemli bilgiler sağlamıştır ve akciğer bölgeleri arasında mikrobiyal topluluk farklılıklarını ortaya çıkarmıştır. Çıkarılan örneklerin alt örnekleme, genellikle cerrahiden daha steril olsa da, cerrahi örneklerle bazı sınırlamaları paylaşabilir. [113,146,148].

2.2.4.5. Boğaz ve nazofaringeal sürüntüler

Boğaz ve nazofaringeal sürüntüler, özellikle bronkoskopi yaptıramayan veya balgam üretemeyen viral enfeksiyonlardaki solunum patojenlerini tespit etmek için faydalıdır [149]. Alt solunum yolları tam olarak temsil etmese de, bu sürüntüler Alt solunum yollarından mikrobiyal göç, Alt solunum yolları den önce üst solunum yolların patojen kolonizasyonu ve sık mikro aspirasyon nedeniyle içgörü sağlayabilir [150]. Bunlar solunum mikrobiyotası çalışmaları için düşük maliyetli, minimal invaziv seçeneklerdir, ancak özellikle çocuklarda burun sürüntüleri düşük bakteri yoğunluğu nedeniyle kontaminasyonu önlemek için dikkatli bir şekilde ele alınmalıdır [150,151].

2.2.4.6. Endotrakeal aspiratlar

Endotrakeal aspiratlar, mekanik ventilasyon uygulanan yoğun bakım hastalarında solunum mikrobiyotasını örneklemek için yararlı bir yöntemdir. Endotrakeal tüp aracılığıyla emilerek toplanan bu aspirasyonlar, alveolar boşluğa ulaşmadan alt solunum yollarına ulaşmanın güvenli ve uygun maliyetli bir yolunu sağlar. BAL ile doğrudan karşılaştırmalar mevcut olmasa da, muhtemelen alt solunum yolları ve üst solunum yolların mikrobiyotasının bir karışımını temsil ederler. Endotrakeal aspiratlar, kritik hastalarda solunum mikrobiyotası dinamiklerini incelemede bilgilendirici olmuştur [152–

154], ancak örnekleme stratejilerinin etkinliği ve endotrakeal tüp biyofilmlerinin etkisi henüz incelenmemiştir.

Sonuç olarak, herhangi bir gerekli sıklıkta kullanılabilen, birden fazla analitik teknik için uygun bol miktarda örnek veren ve belirli, bilinen bir solunum yolu konumuyla ilişkili yerinde toplulukları tam olarak temsil eden tek bir mükemmel örnek yoktur. Bu, her örnek türünü ele almanın en iyi uygulama yaklaşımları olmadığı anlamına gelmez ve her türün avantajlarının ve sınırlamalarının farkında olmak, biyolojik sorularınızı anlamak için en uygun örneği veya örnek kombinasyonunu sağlar.

2.2.5. Teknikler: kültür, tanımlama ve 16S rRNA gen dizilimi

Kültüre bağlı yöntemler kullanılarak bakterilerin tanımlanması zaman alıcı olabilir; hedef mikroorganizmaya bağlı olarak, yeterli birincil büyüme ve tanımlamaya izin vermek genellikle 24-72 saat sürer ve bazı bakterilerin yeterli büyümesi haftalar gerektirir [155]. Bu nedenle, nükleik asitler, proteinler veya metabolik bileşikler gibi moleküler sinyallere dayalı teşhisler ortaya çıkmış ve tanımlama hızı artmıştır.

2.2.5.1. Moleküler Teknikler

Bakterilerden elde edilen DNA ve RNA, PCR, hibridizasyon ve dizileme gibi yöntemlerle çeşitli örneklerde mikrobiyal tespiti kolaylaştırır. PCR, belirli genomik bölgeleri olağanüstü hassasiyetle çoğaltarak patojenleri tanımlamak için altın standart haline getirir [156–158]. Kantitatif PCR (qPCR), enfeksiyon izlemede yardımcı olan kantifikasyonu eklerken, damlacık dijital PCR düşük miktarda bulunan hedefler için hassasiyeti artırır. Hibridizasyon yöntemleri, birden fazla patojenin hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlar ancak önceden belirlenmiş hedefler gerektirir [159]. NanoString nCounter sistemi, çeşitli enfeksiyöz ajanları tanımlamak için moleküler barkodlar kullanır ve akciğer çalışmalarında 16S rRNA profilleriyle güçlü bir uyum göstermiştir [160–162].

2.2.5.2. 16S rRNA geni aracılığıyla mikrobiyal topluluk analizi

16S rRNA geni tür evrimini izlemek için idealdir [163]. İlk yöntemler, karışık örneklerde birden fazla türü tanımlamak için klonlama ve Sanger dizilemesiyle PCR'ı birleştirdi [163], daha sonra terminal restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi [164] ve jel elektroforezi [165] gibi daha hızlı profillemeye yöntemleriyle geliştirildi. Yüksek verimli dizileme, Roche 454, Illumina ve Ion Torrent gibi platformların deney başına milyonlarca ampikon okuması ve gelişmiş topluluk profillemeye duyarlılığı sağlamasıyla

mikrobiyal çalışmalarda devrim yarattı. Başlangıçta, Roche 454 insan mikrobiyom projesi gibi projelerde okuma uzunluğu nedeniyle tercih edildi, ancak Illumina MiSeq artık iyileştirilmiş okuma uzunluğu ve kapsamı nedeniyle daha yaygın olarak kullanılıyor [166]. 16S rRNA geni bakteriyel tanımlama için birincil hedef olmaya devam ederken, DNA çıkarma ve analiz süreçlerindeki farklılıklar altın standart bir fikir birliğinin oluşmasını engelliyor [167,168].

2.2.5.3. DNA ekstraksiyon yönteminin ve PCR primer seçiminin önemi

Bir örnekteki tüm bakterilere erişmeye çalışan yöntemler düşünülürken, önyargı oluşmasını önlemek için dikkatli olunmalıdır. Bakterilerin, DNA'larını çıkarmayı zorlaştırabilecek farklı hücre duvarı özellikleri vardır. PCR inhibitörlerinin varlığından kaçınmak ve belirli bakteri taksonlarının temsilinde olası önyargıyı azaltmak için DNA çıkarma yöntemleri dikkatle seçilmelidir [169,170]. Çıkarma işlemi sırasında kimyasal ve mekanik lizis adımlarının dahil edilmesi, Gram pozitif bakterilerden elde edilen verimi artırır [168]. DNA çıkarma kitleri kullanılabilir ancak kendilerinin bir bakteri DNA'sı kaynağı olduğu gösterildiğinden kontaminasyona neden olabilirler; DNA çıkarma kontrollerinin dahil edilmesi bu sorunu hafifletmeye yardımcı olur [171,172]. 16S rRNA geni, belirli primerlerle çoğaltılır. Bu tür primerler evrensel olarak adlandırılır ancak gerçekte, karışık bir şablonla, belirli bakteri alt gruplarının tespitini sınırlayabilecek PCR önyargılarından kaçınmak zordur. Primer seçimi bunu hesaba katmalıdır. Farklı türlerden DNA karışımı olan sahte bir topluluğun dahil edilmesi, yeniden üretilebilirlik için yararlı bir pozitif kontroldür [173,174]. Dizileme için 16S rRNA gen PCR ürünlerini hazırlamak için çeşitli yöntemler vardır ve bunlar platforma özgüdür. Ayrıca, çift uçlu barkodlama gibi verilerin kalitesini artıracak adımlar da vardır [175,176].

2.2.5.4. Dizi analizi

16S rRNA gen dizisi verilerinden DNA dizisi analizi karmaşık bir görevdir, ancak bu süreci basitleştirmeye ve standartlaştırmaya yardımcı olmak için kanallar mevcuttur [177–179]. Diziler başlangıçta hataları belirlemek ve gidermek için filtreleme yoluyla kalite kontrolünden geçirilir. Bu aşamada kalite kontrolünün ihmal edilmesi tamamen yanlış sonuçlara yol açabilir, hatta biyolojik bir statüsü olmayan dizi eserlerinden kaynaklanan görünüşte "yeni" türlerin üretilmesine bile yol açabilir; bu süreç hakkında

daha fazla bilgi edinmek için okuyucuları yukarıdaki kanalların belgelerine yönlendiriyoruz. Analitik kanallarda birçok kullanıcı tarafından belirtilen parametre vardır ve araştırmanın anlaşılması ve yeniden üretilebilir olması için bunların dikkatlice kaydedilmesi ve paylaşılması gerekir. 16S rRNA genlerine dayalı karmaşık bakteri topluluklarının belirteç-gen araştırmaları yürütülürken, topluluk içindeki her tür için 16S rRNA geninin değişken kopya sayılarının mevcut olabileceği gerçeğiyle sonuçlar karışabilir; bazı durumlarda, aynı bakteri türündeki farklı kopyalar arasında dizi varyasyonu olabilir [180]. Bu tür herhangi bir varyasyonu azaltmak için, topluluk içindeki her bakteri suşu için kesin 16S rRNA kopya sayısı ve varyasyonu hakkında önceden bilgi sahibi olmak gerekir. Farklı bakteri türleri veya suşları için 16S rRNA kopya sayısını doğru bir şekilde tanımlayabilmenin doğasında var olan karmaşıklık, bu sorunu ele almak için sağlam araçlar geliştirmeyi zorlaştırmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi ve Klinik Değerlendirme

Bu prospektif çalışma, Nisan 2024 ile Ekim 2024 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı kliniğinde primer akciğer karsinomu tanısı almış olan ve klinik evreleri I-III arasında olan toplam 20 hastayı incelemektedir. Çalışmaya dahil etme kriterleri, 18 yaş ve üstü, onam vermiş ve akciğer kanseri nedeniyle anatomik veya anatomik olmayan rezeksiyon planlanan hastaları kapsamaktadır (segmentektomi, lobektomi, pnömonektomi ve wedge rezeksiyon). Çalışmadan dışlanma kriterleri arasında ise 18 yaş altı hastalar, onam vermeyen bireyler, akciğer kanseri dışında nedenlerle akciğer rezeksiyonu yapılacak hastalar ve son bir ay içinde antibiyotik tedavisi görmüş olan hastalar bulunmaktadır. Tüm hastalar için preoperatif değerlendirmelerde hemogram, CRP, prokalsitonin gibi kan biyokimyası ve koagülasyon parametreleri, posteroanterior (PA) akciğer grafisi, mümkünse karbonmonoksit difüzyonu ile birlikte solunum fonksiyon testi ve arteryal kan gazı ölçümleri yapılmıştır. Klinik evrelemenin belirlenmesi amacıyla, kontrendikasyon yoksa kontrastlı, varsa kontrastsız toraks BT, tüm vücut FDG-PET/BT ve kranial MR tetkikleri uygulanmıştır. Tümörün klinik evresi, toraks BT ve PET/BT bulguları doğrultusunda kaydedilmiştir. Prospektif olarak, akciğer kanseri nedeniyle akciğer rezeksiyonu planlanan hastalara genel anestezi altında entübasyon yapıldıktan sonra supin pozisyonda bronkoskop ile bronkoalveolar lavaj işlemi gerçekleştirildi ve steril bir şekilde 10 cc sıvı alındı. Ameliyat sonrası, rezeke edilen tümörlü akciğer dokusundan, tümörden en az 1 cm uzaklıkta olmak kaydıyla 1 cm³ örnek alındı. Bu örnekler, metagenomik sekanslama uygulanarak analiz edildi. Biyopsi örnekleri, steril kriyo tüplere yerleştirilecek ve soğuk zincir koşullarında Koç Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları Araştırma Merkezi'ne (KUISCID) gönderildi.

3.2. Örneklerin Hazırlanması

Alınan hasta örnekleri soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra çalışmaya kadar -20 °C 'de saklandı. Laboratuvarda örnekler çözüldükten sonra BAL örnekleri vortekslendi ve 200 µl'lik kısım alınarak nükleik asit izolasyonuna tabi tutuldu. Doku örneklerinden 20 mg (yaklaşık mercimek kadar) alınarak bistüri yardımı ile parçalandıktan

sonra 20 ug/ml proteinaz K içeren doku lizis bufferda 56 °C’de 1 saat inkübasyon ile homojenize edilerek nükleik asit izolasyonuna tabi tutuldu. Nükleik asit izolasyonu otomatize sistem ile üretici talimatları doğrultusunda SeeGene StarMag kiti ile (SeeGene, Kore) gerçekleştirildi.

3.3. 16S rRNA V3-V4 Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

16S rRNA V3-V4 bölgesi 16S_F; CCTACGGGNGGCWGCAG ve 16S_R ACTACHVGGGTATCTAATCC primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı. PCR işlemleri [181] için Tablo 1’de gösterilen miktarlarda, son hacmi 20 µl olan PCR karışımı hazırlandı ve Tablo 2’de verilen PCR protokolüne göre Veriti PCR cihazı (ThermoFischer, ABD) ile çoğaltıldı.

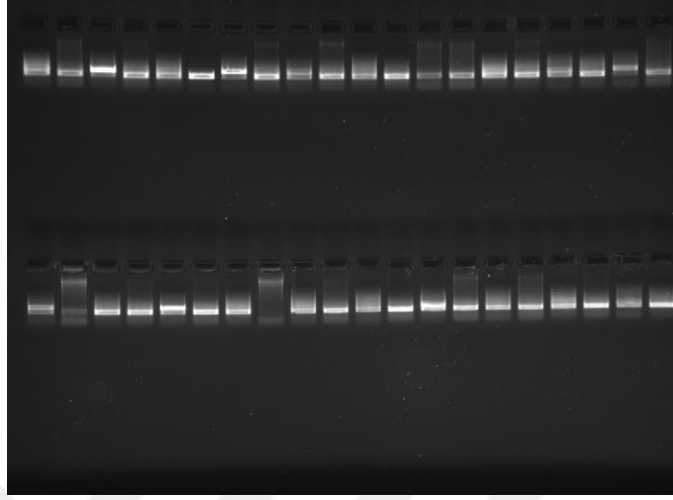
Tablo 1. PCR Karışımı

Bileşenler	Miktar
Distile Su	4.2 µl
Master Mix (DreamTaq, ThermoFischer ABD)	10 µl
F Primer (25 pMol)	0.4 µl
R Primer (25 pMol)	0.4 µl
Hedef	5 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 2 PCR Protokolü

Döngü	Aşama	Sıcaklık	Süre
	Taq Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	3 dk
40 Döngü	Denatürasyon	95 °C	30 sn
	Bağlanma	50 °C	45 sn
	Uzama	72 °C	1 dk
	Final Uzama	72 °C	7 dk

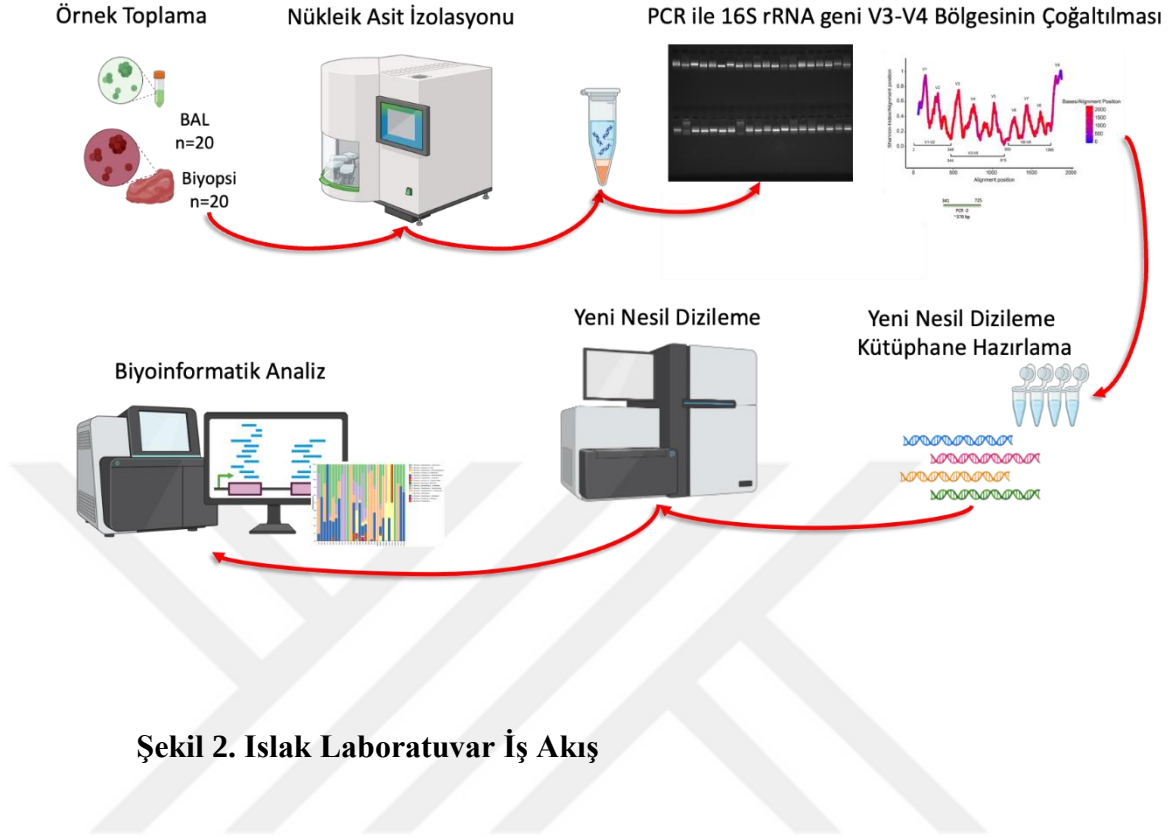
PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. (Şekil 1)



Şekil 1. Agaroz jel elektroforezinde PCR ürünleri

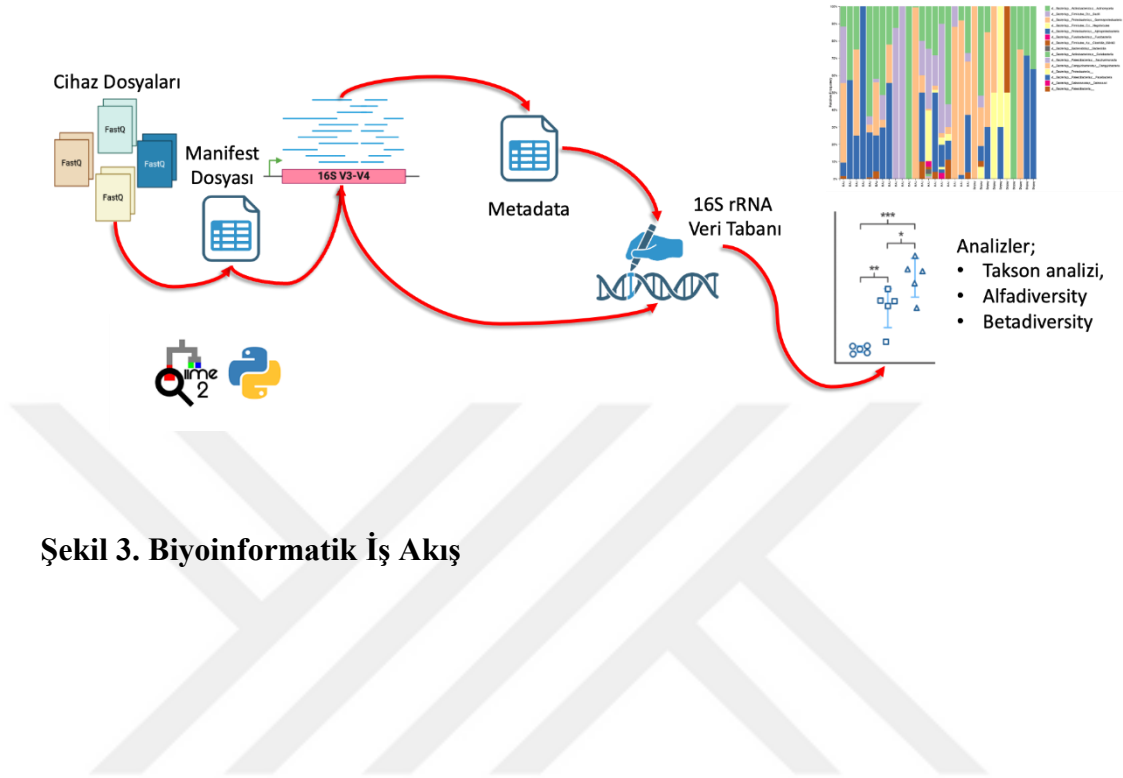
3.4. Yeni Nesil Dizileme Kütüphanesi Hazırlama:

Elde edilen PCR ürünleri manyetik boncuklar kullanılarak (AmpPure Beads, BecmanCoulter, ABD) kullanılarak saflaştırıldıktan sonra Illumina DNA Prep (Illumina, ABD) kullanılarak Tagmente edildikten sonra aynı kit ile barkodlama işlemi üretici talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Hazırlanan bütün örnekler bir tüp içerisinde havuz oluşturacak şekilde eşit miktarlarda (4 μ l) alınarak birleştirildi, normalizasyon işleminden sonra havuz 1.2pM konsantrasyonda Illumina MySeq cihazına yüklenerek okumalar yapıldı. Cihaz çıktıları fastQ formatında depolandı [182].



Şekil 2. Islak Laboratuvar İş Akış

Cihazdan elde edilen ham okuma verilerinin analizi için (*.fastq dosyalarının) Machintosh ortamında Qiime2 paketi kullanılarak analiz edildi. Cihazdan alınan ham veriler oluşturulan manifest dosyası ile Phred33 algoritması ile kalitekontrol işlemine tabi tutulduktan sonra analiz işlemlerine geçildi. Uç kırpma işleminden sonra eşleştirilen düz ver ters okumalar DaDa2 paketi ile birleştirildi. Örnekler ait temsiliyet sekanları ve istatistik tabloları oluşturulduktan sonra temsiliyet sekanslarının isimlendirilmesi GreenGene 2022.10.backbone.v4.nb.sklearn-1.4.2.qza veri tabanı ile yapılarak taksonomik sınıflama ve isimlendirme gerçekleştirildi. Taksonomik sınıflama sonrası olası mitekondriyal, kloroplast, archaea bakteriler ve olası ökaryot DNA verileri veri setinden temizlendi. Temizlenmiş veri seti ve örnekler ait metadata dosyası kullanılarak taksonomik görüntüleme dosyaları filogenetik analiz dosyaları oluşturuldu, örnekler arası alfa ve beta diversity değerleri hesaplanarak örnekler arası farklar Kruskal-Wallis test ile karşılaştırıldı, $p=0.05$ anlamlı olarak kabul edildi [183].



Şekil 3. Biyoinformatik İş Akış

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri toplamda 20 hasta ile detaylı bir biçimde incelendi (tablo 3) Cinsiyet dağılımına bakıldığında, erkek hastaların oranı %70 (14 hasta) ile belirgin bir üstünlük gösterdi, kadınların oranı ise %30 (6 hasta) olarak tespit edildi. Bu durum, akciğer kanserinin cinsiyetler arasındaki dağılımını ve erkeklerde daha yaygın olduğunu yansıtan önemli bir bulgu oldu. Özellikle erkeklerdeki yüksek oran, toplumsal cinsiyet rollerinin ve sigara içme alışkanlıklarının etkisini gözler önüne serdi. Yaş gruplarına göre gerçekleştirilen değerlendirme, katılımcıların %60'ının (12 hasta) 60 yaş ve altında, %40'ının ise 60 yaş ve üzerinde olduğunu ortaya koydu. Sigara içme durumu açısından yapılan analizler neticesinde, hastaların %80'inin (16 hasta) sigara içtiği gözlemlendi; sadece %20'si (4 hasta) sigara içmedi. Sigara içmenin akciğer kanserinde kritik bir risk faktörü olarak ele alındığı göz önünde bulundurulduğunda, bu yüksek oran, hastalığın etiyojisi üzerine önemle vurgu yaptı. KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı) varlığı, hastalar arasında %20 oranında gözlemlenirken (4 hasta), %80'inde (16 hasta) KOAH bulunmadı. TNM evrelemesi sonuçları incelendiğinde, hastaların %75'inin (15 hasta) I-II evre akciğer kanseri tanısı aldığı, %25'inin (5 hasta) ise III-IV evresinde olduğu dikkati çekti. Bu veriler, erken evre akciğer kanserinin daha yaygın olduğunu ve tanı aşamasında müdahale şansının arttığını gösterdi. Ayrıca, erken evre akciğer kanseri olan hastaların genellikle daha iyi bir prognoza sahip olduğu bilindiğinden, erken tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin önemi bir kez daha ortaya çıkmıştır. Histopatolojik incelemelerde, adenokarsinom tanısı alanların oranı %60 (12 hasta), skuamöz hücreli karsinom tanısı alanların oranı %35 (7 hasta) ve adenoskuamöz karsinom tanısı alan bir hastanın oranı ise %5 (1 hasta) olarak belirlendi. Adenokarsinom, özellikle genç ve sigara içmeyen bireylerde daha sık görülmekteyken, skuamöz hücreli karsinom genellikle sigara içen hastalarda daha yaygın olarak izlenmektedir. Ayrıca, STAS (Spread Through Air Spaces) varlığı açısından yapılan değerlendirmelerde, hastaların %60'ında (12 hasta) STAS varlığı tespit edildi, %40'ında (8 hasta) ise STAS yokluğu gözlemlendi. STAS varlığının, hastalığın prognozu üzerinde etkili olabileceği düşünülmekte; bu durum akciğer kanseri tanısında dikkat edilmesi gereken bir faktör olarak öne çıktı. Böylece, hastaların genel sağlık durumu, hastalık evreleri, histopatolojik bulgular ve yaşam tarzı faktörlerinin akciğer kanseri üzerindeki

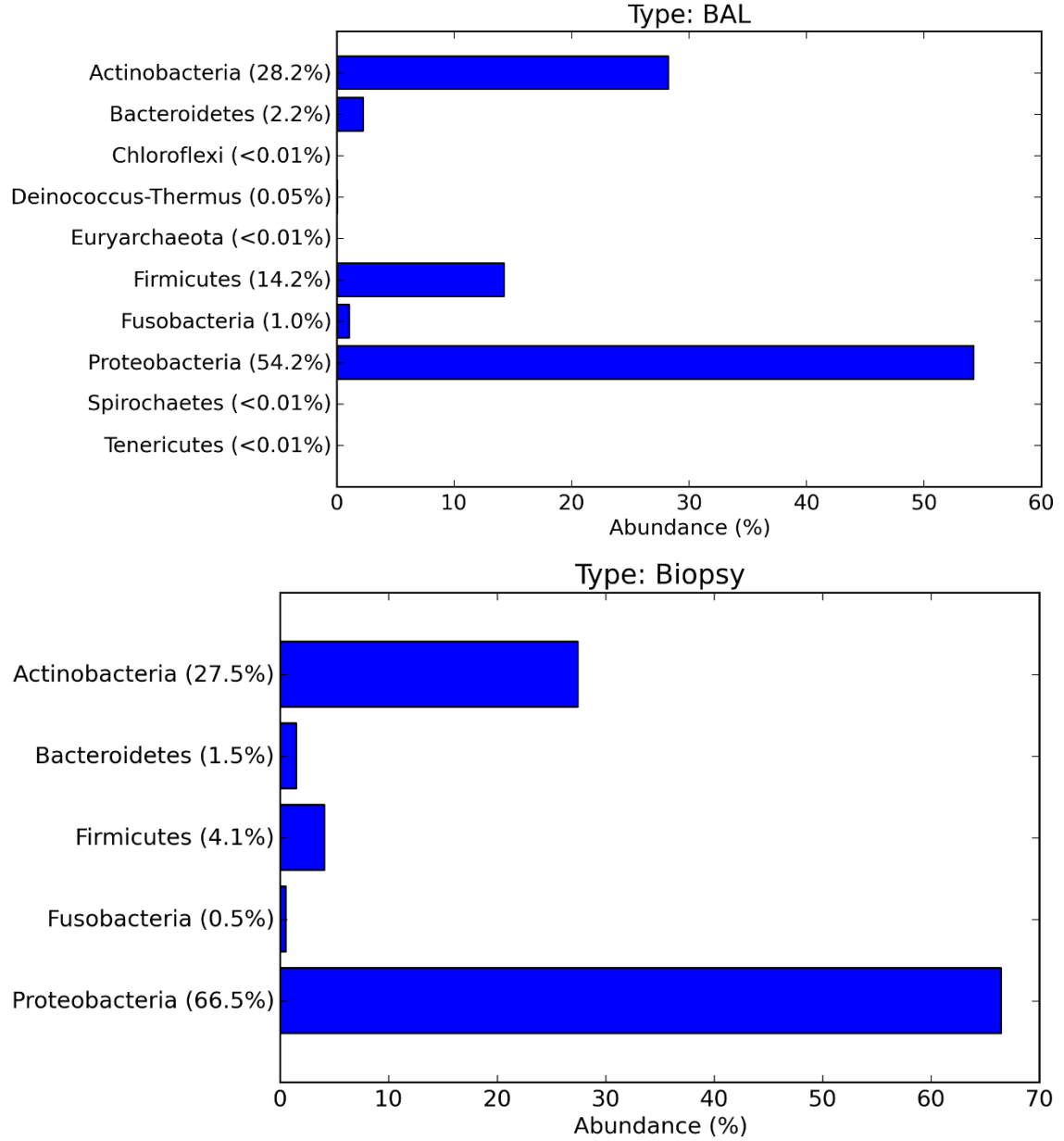
birleşik etkileri, tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve hastalığın seyrinin takibi açısından büyük önem taşıdı.

Tablo 3. Hastaların Klinik Özellikleri:

Hasta (n:20)	
Cinsiyet	
Erkek	14 (70%)
Kadın	6 (30%)
Yaş	
≤ 60	12 (60 %)
> 60	8 (40 %)
Sigara içme durumu	
Smoker	16 (80 %)
Non-smoker	4 (20 %)
KOAH varlığı	
Var	4 (20 %)
Yok	16 (80 %)
TNM evre	
I-II	15 (75 %)
III-IV	5 (25 %)
Histopatoloji	
Adenokarsinom	12 (60 %)
Skuamöz hücreli karsinom	7 (35 %)
Adenoskuamöz karsinom	1 (5 %)
STAS varlığı	
Var	12 (60 %)
Yok	8 (40 %)

16S rRNA V3-V4 bölgesinin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen İlk örnek olan BAL (Bronchoalveolar Lavage) işlemiyle elde edilen örnekte, bakteriyel bileşimin önemli bir kısmını *Proteobacteria* phylum'u oluşturur ve bu grup %54.2 oranıyla en baskın fraksiyonu temsil eder (Şekil 3). *Actinobacteria* ise %28.2 ile ikinci sırada yer alırken, bu iki grubun varlığı, hastanın bağışıklık durumuna ve enfeksiyona karşı yanıtına yönelik değerli bilgiler sunabilir. Diğer Phylum'lar arasında *Firmicutes* %14.2, *Fusobacteria* %1.0 ve *Bacteroidetes* %2.2 gibi daha düşük oranlarda görülmektedir. Öte yandan, *Chloroflexi* (<0.01%), *Deinococcus-Thermus* (0.05%), *Euryarchaeota* (<0.01%), *Spirochaetes* (<0.01%) ve *Tenericutes* (<0.01%) gibi grupların oldukça düşük oranlarda temsil edildiği anlaşılmaktadır. Bu durum, akciğer mikrobiomunun çoğunlukla belirli sınırlı bir bakteri grubu tarafından şekillendiğini ve bu grupların sağlık durumu üzerindeki potansiyel etkilerini vurgulamaktadır.

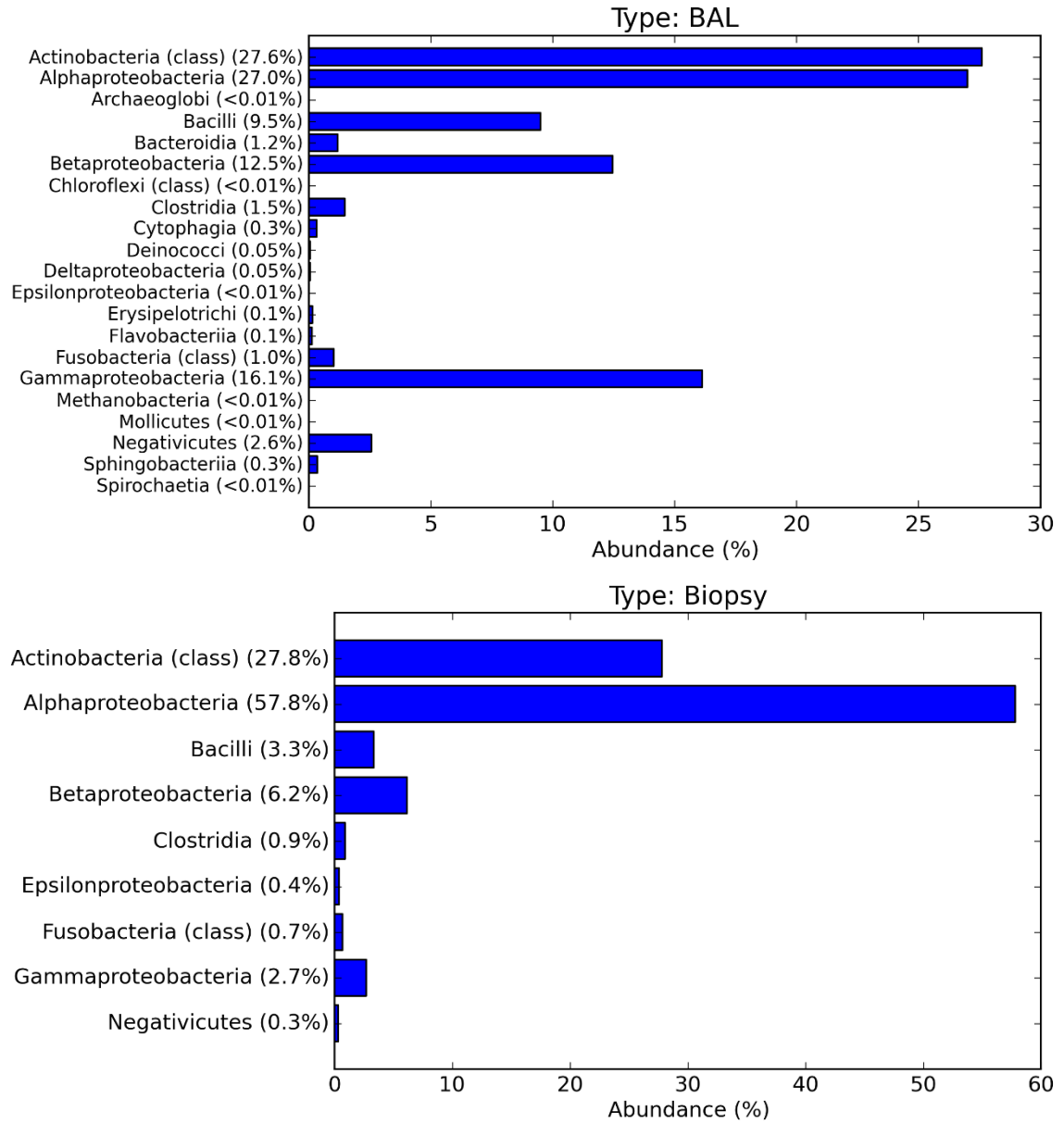
İkinci örnek olan biyopsi örneğinde ise, yine *Proteobacteria* phylum'u %66,5 ile en yüksek abundansa sahiptir, bu da bu örnekte bakteriyel bileşimin benzer bir profil sergilediğini göstermektedir. *Actinobacteria* %27,5 ile dikkat çekici bir ikinci sıradadır. Diğer Phylum'lar, %4,1 oranla *Firmicutes*, %1,5 oranla *Bacteroidetes* ve %0.5 oranla *Fusobacteria* şeklinde sıralanırken, bu grupların abundansları önceki örneğe göre düşmüştür. Genel olarak, her iki örnekte de *Proteobacteria* ve *Actinobacteria*'nın baskın pozisyonda olduğu görülmekte; bu, akciğer sağlığı ve patojen varlığı açısından önemli bilgiler taşımaktadır.



Şekil 3. BAL ve biyopsi bölüm (phylum) düzeyi

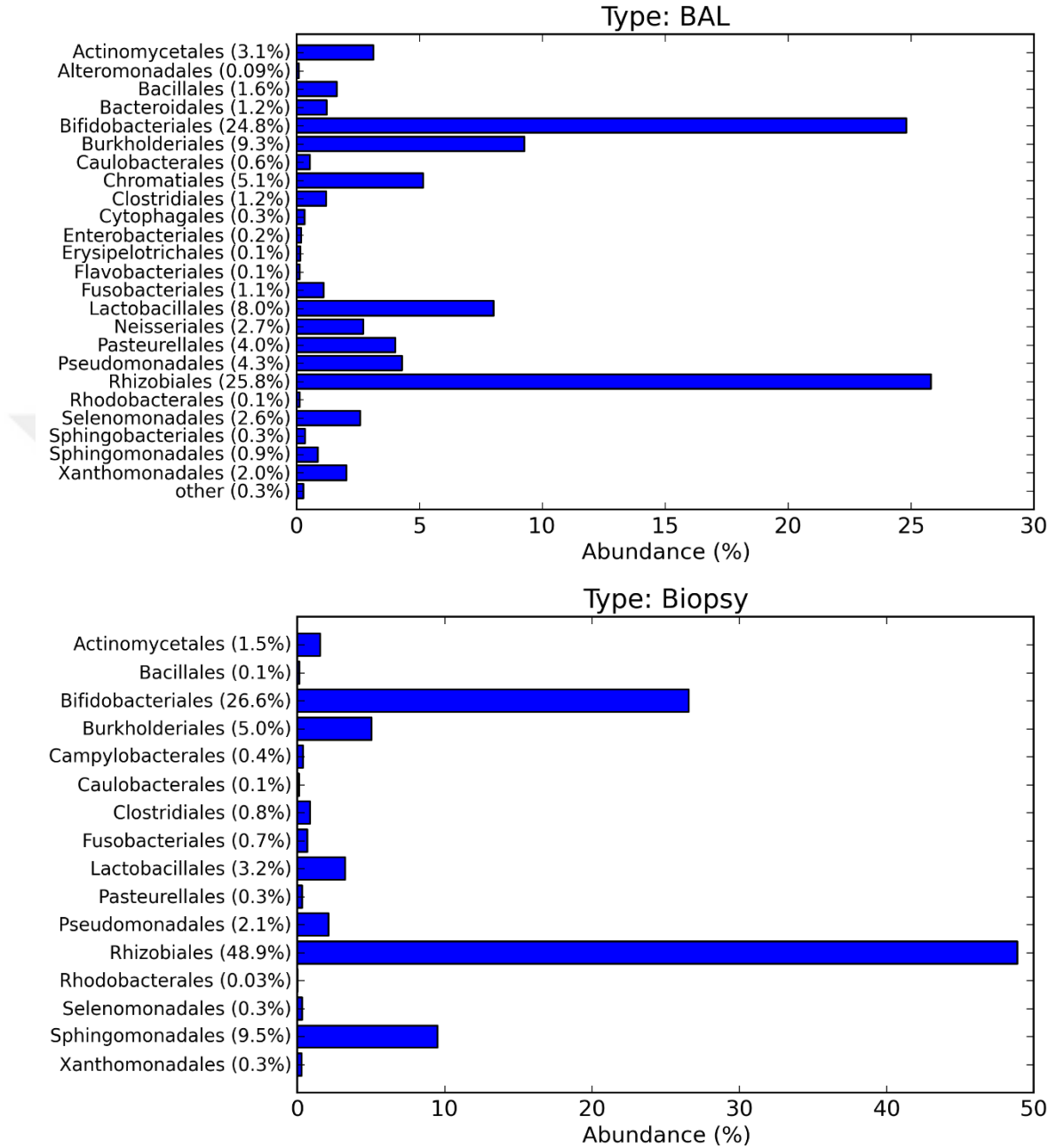
Sınıf (class) düzeyinde ilk örnek olan BAL (Bronchoalveolar Lavage) işlemi ile elde edilen veriler, bakteriyel çeşitliliğin belirgin bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. (Şekil 4). Bu örnekte en yüksek abundansa sahip olan *Actinobacteria* sınıfı %27,6 ile dikkat çekmekte, hemen arkasından *Alphaproteobacteria* %27.0 oranıyla gelmektedir; bu durum akciğer sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri vurgulamaktadır. Diğer önemli gruplar

arasında *Bacilli* %9.5, *Betaproteobacteria* %12.5 ve *Clostridia* %0.9 gibi oranlarla temsil edilmektedir. Aynı zamanda, daha düşük oranlarda (%0.4) *Epsilonproteobacteria* ve nadir bakteriyel gruplar da gözlemlenmektedir. Diğer yandan, biyopsi örneğinde ise *Actinobacteria* yine %27.8 ile belirgin bir konumda bulunurken, %57.8 ile en baskın fraksiyon olarak öne çıkan *Alphaproteobacteria* dikkat çekmektedir. Bu örnekteki diğer gruplar, *Bacilli* %3.3, *Betaproteobacteria* %6.2 ve %0.9 oranındaki *Clostridia* gibi çeşitleri içermektedir.



Şekil 4. BAL ve biyopsi mikrobiyom sınıf (Class) düzeyi

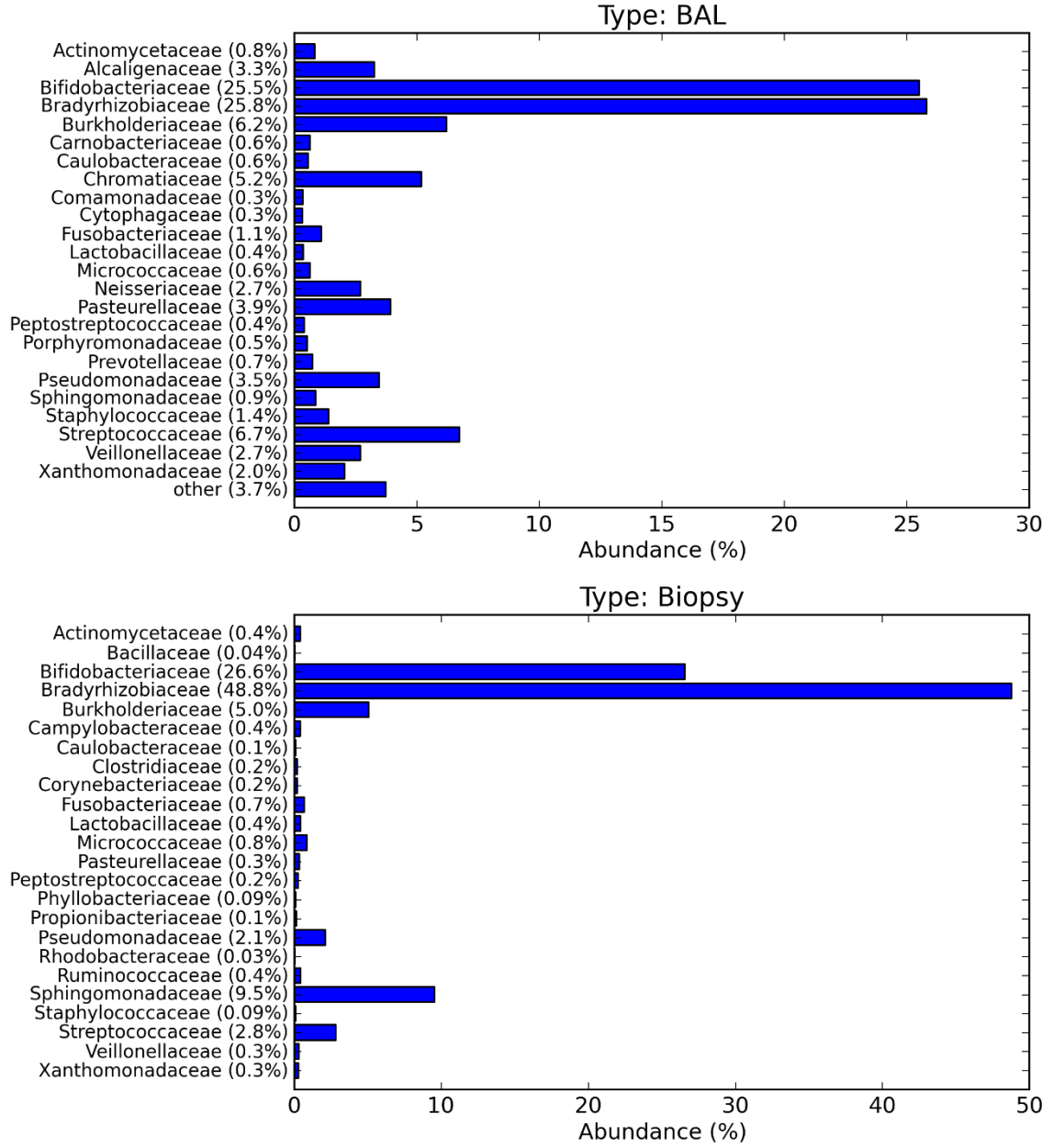
Takım (Order) düzeyinde analiz (Şekil 5): BAL (Bronchoalveolar Lavage) işleminden elde edilen örnekte, bakteriyel bileşimin önemli bir kısmını *Rhizobiales* komutu %25.8 oranıyla en baskın fraksiyon olarak temsil etmektedir. Bu grubu, *Bifidobacteriales* %24.8 ve *Burkholderiales* %9.3 ile takip etmektedir. Diğer önemli gruplar arasında %8.0 oranıyla *Lactobacillales*, %4.0 ile *Pasteurellales* ve %4.3 oranıyla *Pseudomonadales* yer almaktadır. Daha düşük temsil oranlarına sahip diğer komutlar arasında %3.1 ile *Actinobacteriales*, %1.6 ile *Bacillales* ve %1.2 ile *Bacteroidales* bulunurken; bazı gruplar, minimum %0.1 gibi düşük oranlarla örnekte temsil edilmektedir. Bu durum, BAL örneğinin akciğer mikrobiomunun belirli bakteriyel gruplar tarafından şekillendiğini göstermektedir. Biyopsi örneğinde ise, *Rhizobiales* komutu %48.9 ile en yüksek abundansa sahiptir ve bu, akciğer mikrobiomundaki baskın gruplardan biridir. *Bifidobacteriales* %26.6 ile önemli bir ikinci sırayı alırken, %5.0 oranıyla *Burkholderiales* diğer dikkate değer gruplardandır. *Sphingomonadales* %9.5 oranıyla belirgin bir şekilde temsil edilmekte; *Lactobacillales* %3.2 ve *Pseudomonadales* %2.1 ile diğer gruplar arasında yer almaktadır. Daha az temsil edilen gruplar arasında %0.1 oranıyla *Bacillales* ve %0.4 ile *Campylobacteriales* bulundu.



Şekil 5: BAL ve biyopsi takım (order) düzeyi

Aile (Familia) düzeyinde analiz (Şekil 6): BAL örneğinde bakteriyel bileşimin önemli bir kısmını *Bradyrhizobiaceae* (%25.8) ve *Bifidobacteriaceae* (%25.5) aileleri oluşturmakta, bu aileler akciğer mikrobiomunda belirgin bir baskınlık göstermektedir. *Burkholderiaceae* %6.2 oranıyla dikkat çekici bir üçüncü sırayı alırken, *Streptococcaceae* %6.7 ile önemli bir başka aile olarak öne çıkmaktadır. Diğer

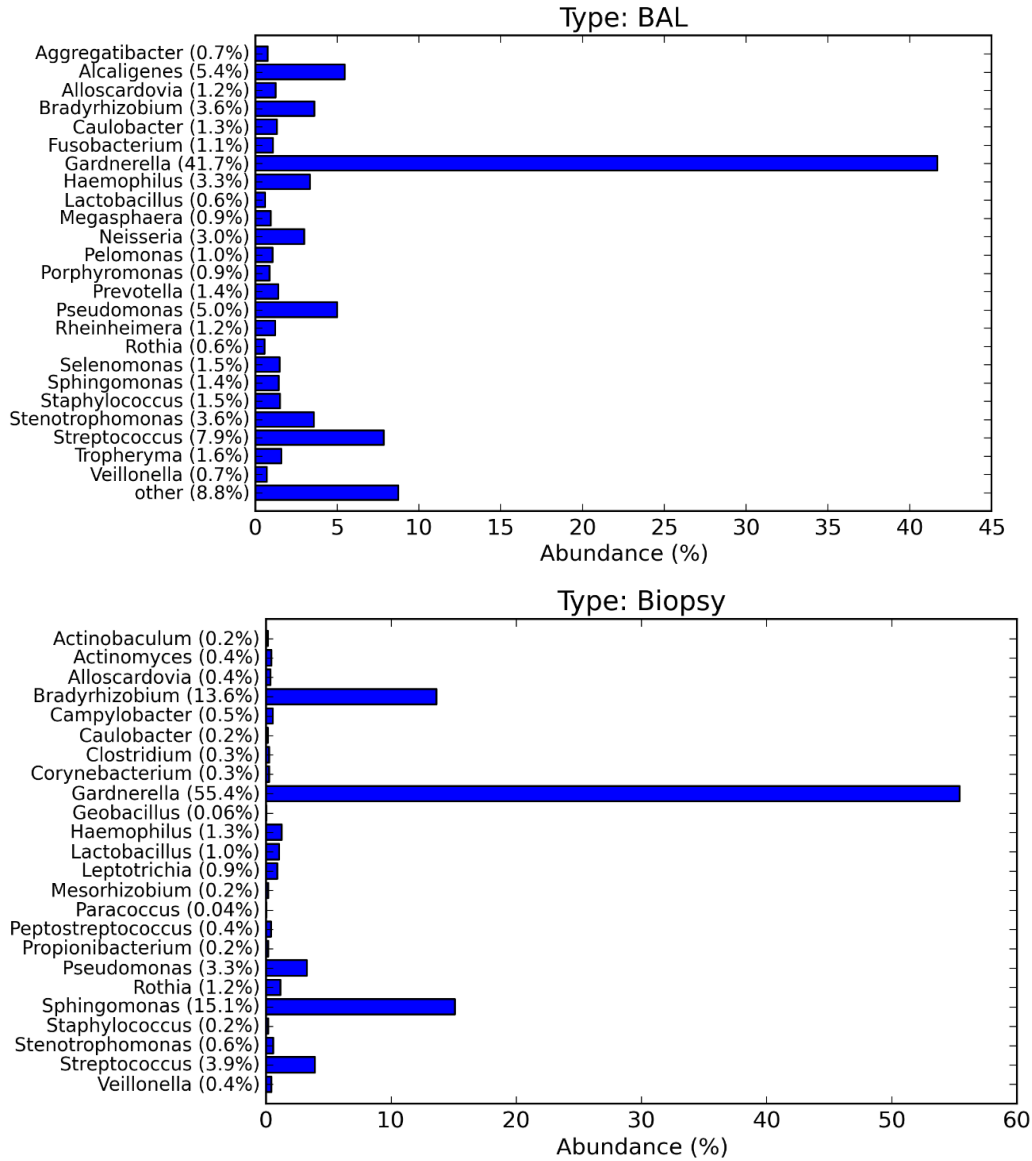
aileler arasında düşük abundansa sahip olan *Neisseriaceae* (%2.7), *Fusobacteriaceae* (%1.1) ve bazı nadir aileler bulunmaktadır. Genel olarak, BAL örneği, akciğerlerde belirli bakteriyel ailelerin varlığını ve bunların çeşitli sağlık durumları üzerindeki potansiyel etkilerini ortaya koymaktadır. Biyopsi örneğinde ise *Bradyrhizobiaceae* %48.8 ile en yüksek abundansa sahip aile olarak belirlenmiştir. *Burkholderiaceae* %5 oranı ile dikkate değer bir konumda bulunurken, diğer aileler arasında *Sphingomonadaceae* %9.5 ve *Streptococcaceae* %2.8 gibi oranlarla temsil edilmektedir. *Bifidobacteriaceae* bu örnekte de %26.6 ile önemli bir yere sahiptir. Daha az yaygın aileler arasında *Actinobacteriaceae* (%0.4) ve *Micrococcaceae* (%0.8) gibi gruplar yer almakta.



Şekil 6. BAL ve biyopsi aile (family) düzeyi

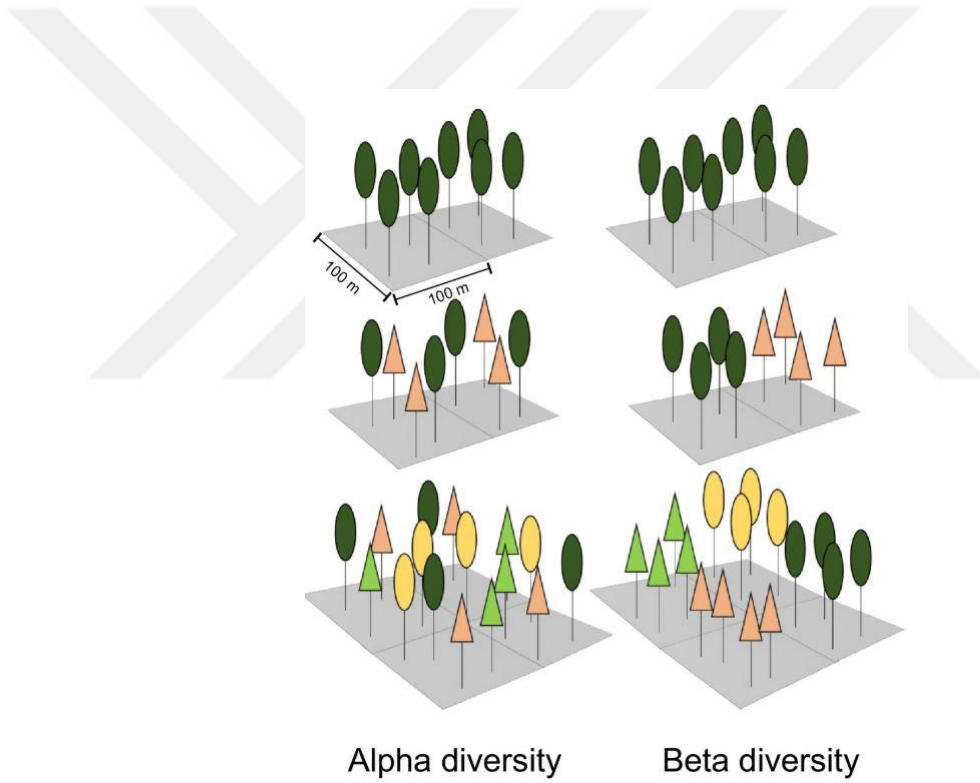
Cins (Genus) düzeyinde analiz (Şekil 7): BAL örneğinde, bakteriyel bileşimin önemli bir kısmını *Gardnerella* cinsi oluşturmakta ve %41.7 oranıyla en baskın cins olarak öne çıkmaktadır. *Pseudomonas* cinsi %5.0, *Haemophilus* %3.3 ve *Sphingomonas* %1.4 gibi diğer önemli gruplar da belirgin bir şekilde temsil edilmektedir. Ek olarak, %7.9 ile *Streptococcus* cinsi ve daha düşük oranlarla *Lactobacillus* (%0.6), *Veillonella* (%0.7) ve *Bradyrhizobium* (%3.6) gibi gruplar

da gözlemlenmektedir. Bunlar, akciğer mikrobiomunun çeşitliliğine katkıda bulunan önemli bileşenlerdir. Biyopsi örneğine gelindiğinde ise, *Gardnerella* cinsi %55.4 oranıyla yine en baskın konumunu korumaktadır. *Bradyrhizobium* %13.6 ile önemli bir ikinci sırada yer alırken, diğer cinsler arasında *Sphingomonas* %15.1 oranıyla dikkat çekmektedir. Ayrıca, %3.3 ile *Pseudomonas* ve %1.1 ile *Fusobacterium* gibi cinsler de bulunmakta, bu grupların varlığı akciğer sağlığı üzerinde farklı etkiler yaratabilir. Her iki örnekte de *Gardnerella* cinsi, baskın bir konumda olduğu için akciğer mikrobiomunun dinamik yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır.



Şekil 7. BAL ve biyopsi cins (genus) düzeyi

Örnekler arası alfa ve beta diversity değerleri hesaplanarak örnekler arası farklar Kruskal-Wallis test ile karşılaştırıldı, $p=0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Mikrobiyom araştırmalarında alfa ve beta çeşitliliği, ekolojik çeşitliliği anlamak için kullanılan iki temel ölçüttür. Alfa çeşitliliği, bir örnek içindeki mikrobiyal topluluğun zenginliğini ve türlerin bolluk dağılımını ifade eder. Bu, bir örnekteki türlerin sayısını (zenginlik) ve bu türlerin birbirine göre bolluk oranlarını (eşitlik) ölçer. Örneğin, Chao1 ve Inverse Simpson indeksleri alfa çeşitliliği ölçümlerinde sıkça kullanılır. Beta çeşitliliği ise, farklı örnekler arasındaki mikrobiyal toplulukların kompozisyon farklılıklarını ölçer (Şekil 8).



Şekil 8. alfa ve beta çeşitliliği

Tabloda (tablo 4), alfa çeşitliliği (diversity) için çeşitli değişkenler için hesaplanan p değerleri verildi. BAL (Bronchoalveolar Lavage): P değeri 0.043, bu da akciğer mikrobiomundaki değişkenler ile BAL örneği arasında anlamlı bir ilişki olduğunu

gösterir. Bu, BAL sonuçlarının dikkate alınması gereken önemli bir bulgu olduğunu ortaya koymaktadır. Sigara İçme Aktifliği: P değeri 0.071, bu değer 0.05'ten büyük olması, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, aktif veya pasif sigara içmenin ilgili değişkenler üzerindeki etkisi belirgin değildir. Kanseri Tipi: P değeri 0.966 son derece yüksek olduğu için, kanser tipi ile diğer değişkenler arasında anlamlı bir ilişki yoktur. Sigara İçme Durumu: P değeri 0.739, sigara içen ve içmeyenler arasında da anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. STAS: P değeri 0.120, bu durum da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadan geçtiğini göstermektedir. Koah (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı): P değeri 0.338, bu durumda da anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Genel olarak, yalnızca BAL örneği ile ilgili değişken arasında ($p < 0.05$) anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir. Diğer değişkenler için p değerleri oldukça yüksek, sağlanmış olan istatistiksel ilişkiler anlamlı değildir. Tablo 5'te yer alan Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre, BAL (Bronkoalveolar lavaj) ve biyopsi örnekleri arasında beta çeşitliliği açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.004$). Bu durum, iki örnek türündeki mikrobiyal bileşimin farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Ancak sigara içme durumu (içen ve içmeyenler, $p = 0.878$), sigara içme aktifliği (aktif ve pasif kullanıcılar, $p = 0.914$), KOAH varlığı (hastalığı olan ve olmayanlar, $p = 0.111$), kanser tipi (adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom, $p = 0.304$) ve STAS varlığı (STAS olan ve olmayanlar, $p = 0.236$) gibi diğer faktörlerde beta çeşitliliği açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, mikrobiyal çeşitlilik açısından örnek türünün (BAL ve biyopsi) diğer klinik ve çevresel faktörlerden daha belirgin bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, diğer değişkenler açısından mikrobiyom bileşiminde ciddi bir değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır.

Tablo 4. alfa çeşitliliği Kruskal-Wallis testi analizi sonuçları

BAL (n: 20) Biyopsi (n:20)	0.043
Sigara içme durumu Smoker (n: 16) Non- smoker (n:4)	0.739
Sigara içme aktifliği: Akif (n: 4) Pasif (n:12)	0.071
Koah: Var (n: 4) Yok (n:16)	0.338
Kanseri tipi: Adeno ca (n: 12) Skuamöz hc ca (n:8)	0.966
STAS: Var (n: 12) Yok (n: 8)	0.120

Tablo 5. beta çeşitliliği Kruskal-Wallis testi analizi sonuçları

BAL (n: 20) Biyopsi (n:20)	0.004
Sigara içme durumu Smoker (n: 16) Non- smoker (n:4)	0.878
Sigara içme aktifliği: Akif (n: 4) Pasif (n:12)	0.914
Koah: Var (n: 4) Yok (n:16)	0.111
Kanseri tipi: Adeno ca (n: 12) Skuamöz hc ca (n:8)	0.304
STAS: Var (n: 12) Yok (n: 8)	0.286

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya genelinde en yaygın malignite ve kanserle ilişkili ölümlerin başlıca nedenidir. 2018 yılında dünya çapında 1,7 milyondan fazla akciğer kanseri nedeniyle ölüm bildirilmiştir. Primer akciğer karsinomu, kadınlarda meme kanseri ve erkeklerde prostat kanserinden sonra en sık görülen malignite olup, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanserinin iki ana histolojik alt tipi bulunmaktadır: Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK). Bu tezde, akciğer kanseri hastalarında akciğer mikrobiyotasının rolü ve potansiyel etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda, akciğer kanseri tanısı almış 20 hasta üzerinde yapılan analizler, BAL (Bronkoalveolar Lavaj) ve biyopsi örnekleri arasındaki mikrobiyal bileşimi karşılaştırmayı amaçladı. Elde edilen bulgular, her iki örnekte de *Proteobacteria* ve *Actinobacteria*'nın baskın olduğunu göstermektedir. BAL örneğinde *Proteobacteria* %54.2, *Actinobacteria* ise %28.2 oranında bulunurken, biyopsi örneğinde *Proteobacteria* %66.5, *Actinobacteria* ise %27.5 oranında tespit edilmiştir. Bu durum, her iki örneğin de benzer bir mikrobiyal profil sergilediğini ortaya koymaktadır. Akciğer mikrobiyotası ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiye dair çeşitli çalışmaların deneysel bulguları yapılmıştır. Bu çalışmalar, farklı örnekleme yöntemleriyle belirli bakteri türlerini ve mikrobiyal grupları analiz ederek bu türlerin akciğer kanseriyle ilişkisini incelemiştir. İlk olarak, Laroumagne et al. [126] bronkoskopik örneklerde gram-negatif bakteriler arasında *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter spp.* ve *Escherichia coli* türlerinin varlığını rapor etmiştir. Bu türler, akciğer mikrobiyotasında belirli değişimlerin oluşabileceğini ve bu durumun hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında, Hosgood ve ark. [27] Çinli kadınlardan alınan ağız swap ve balgam örneklerini inceleyerek mikrobiyal çeşitlilik üzerinde çalışmış ve *Granulicatella*, *Abiotrophia* ve *Streptococcus* cinslerinin varlığını tespit etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, ağız ve balgam mikrobiyotasında yer alan mikroorganizmaların da akciğer kanseriyle bağlantılı olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, Liu ve ark. [184] bronkoskopik örnekler üzerinden yaptığı analizlerde özellikle *Streptococcus* cinsine odaklanmış ve bu cinsten üyelerin akciğer mikrobiyotasında baskın olabileceğini öne sürmüştür. Cameron ve ark.

[185] çalışmasında ise balgam örnekleri metagnomik sekanslama kullanarak değerlendirilmiş ve *Granulicatella adiacens*'in akciğer mikrobiyotasında önemli bir bileşen olabileceği ortaya konmuştur. Buna ek olarak, Lee ve ark. bronkoalveolar lavaj sıvısında (BAL sıvısı) yaptığı çalışmada, iki filum olan *Firmicutes* ve *TM7* ile birlikte *Veillonella* ve *Megasphaera* cinslerinin varlığını rapor etmiştir. Bu bulgular, BAL sıvısındaki mikrobiyal çeşitliliğin hastalık durumlarıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Yan ve ark. [186] ise tükürük örneklerinde *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Veillonella* ve *Neisseria* cinslerini tespit etmiş ve bu mikroorganizmaların hem yassı epitel hücreli karsinom (SCC) hem de adeno karsinom (AC) ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle bu bulgular, oral mikrobiyomun da akciğer kanseri üzerinde etkili olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Greathouse ve ark. [187] tümör dokularını inceleyerek *Acidovorax* temperans türünün yassı epitel hücreli karsinom (SCC) ile daha yüksek bollukta olduğunu bulmuştur. 2018 yılında Apopa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, V1-V3 bölgelerinin 16S rRNA dizileme yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda akciğer dokularında *Cyanobacteria* tespit edilmiştir. Adenokarsinom örneklerinde *Cyanobacteria*'nın, normal doku örneklerine kıyasla daha fazla bulunduğu gözlemlenmiştir. Önceki çalışmalara genel bir bakış yapıldığında, akciğer mikrobiyotasını inceleyen çalışmaların büyük bir çoğunluğunun odak noktasının ya bronkoskopi sırasında alınan bronkoalveoler lavaj (BAL) örnekleri ya da tükürük örnekleri olduğu görülmektedir. Ancak, doğrudan akciğer dokusunun kendisine yönelik analizlerin sınırlı olduğu anlaşılmaktadır. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalardan biri, doku biyopsisi sırasında elde edilen akciğer dokusuna odaklanmış, ancak örnekler doğrudan işlemiden alınmamıştır. Bunun yanı sıra, ameliyat sonrasında akciğer dokusu üzerinde incelemeler yapan bir başka çalışma da bulunmaktadır. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, doğrudan akciğer dokusundan alınan örnekler üzerinde çalışan araştırmaların sayısının oldukça az olduğu açıkça görülmektedir. Dolayısıyla, akciğer mikrobiyotasını daha derinlemesine anlamak için doğrudan akciğer dokusuna yönelik kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, kanserden etkilenmiş akciğerin lob veya segmentinden alınan örnekleri, buna karşılık gelen segment veya lob ile ilişkili bronşiyal bölgeden

bronkoskopik lavaj yoluyla elde edilen örneklerle karşılaştırarak analiz eden ilk araştırmayı gerçekleştirdik. Akciğer dokusundan örneklerin alınmasının temel gerekçesi, akciğer dokusunun teorik olarak solunum sistemindeki en steril ortamı temsil ettiği varsayımına dayanmakta ve bu durum, akciğer mikrobiyom çalışmasının potansiyel olarak en doğru sonuçları sağlayabileceği anlamına gelmektedir. Bunun yanı sıra, hem doku hem de BAL (bronkoalveolar lavaj) örneklerinin toplanmasındaki amaç, her birinin mikrobiyomunu incelemek ve BAL'de herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını ya da yalnızca BAL'ın akciğer dokusunun mikrobiyomunu güvenilir bir şekilde temsil edip edemeyeceğini belirlemektir. Ayrıca, araştırmamızda belirli bir mikroorganizmanın akciğer kanserinin patofizyolojisiyle ilişkili olup olmadığını incelemeyi hedefledik.

Elde ettiğimiz sonuçların diğer çalışmalardan farklı olduğu açıktır, zira hem BAL hem de biyopsi örneklerinde en bol bulunan organizmaların *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* olduğu görüldü. Bu durum, katılımcıların genetik yapısı, sigara içme ve beslenme alışkanlıkları gibi ve mikrobiyotayı etkileyebilecek faktörlerle ilişkili olabilir. Bununla birlikte, ikinci önemli bulgu, BAL ve biyopsi örneklerinde *Proteobacteria* ve *Actinobacteria*'nın baskın varlığı doğrulanmış olsa da, her iki grup arasında hem alfa hem de beta çeşitlilik açısından önemli farklılıkların olduğuudur. Bu farklılıklar, tümör mikro çevresi değişiklikleriyle, örneğin hipoksi veya bağışıklık modülasyonu gibi faktörlerle ilişkili olabilir. Zira zenginlik ve benzerlik farklılıkları her iki örnek üzerinde değişim göstermektedir. Bu pilot çalışma, akciğer kanseri hastalarında mikrobiyomun incelenmesini amaçlayarak tümör mikro çevresinin anlaşılmasını ve bunun küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin (NSCLC) patofizyolojisiyle ilişkisinin daha derinlemesine değerlendirilmesini hedeflemektedir. Mikrobiyom farklılıklarının biyo belirteç olarak potansiyel rolünün araştırılması, bu çalışmanın önemli odak noktalarından birini oluşturmaktadır. Ayrıca bu proje, genetik içgörüler sunarak immün modülasyon tedavilerinde yenilikçi yaklaşımlara katkı sağlama potansiyeline de sahiptir. Mikrobiyotanın tümör mikro çevresi üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi, hem hastalığın biyolojik dinamiklerini daha iyi anlamak hem de mevcut tedavi stratejilerini mikro çevresel faktörler doğrultusunda optimize etmek adına kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, elde edilecek bulgular, yalnızca akciğer kanseri biyolojisine yönelik bilgi

havuzunu genişletmekle kalmayıp, aynı zamanda kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına ve immünoterapi alanındaki ilerlemelere destek sağlayabilir. Dolayısıyla bu çalışma, mikrobiyom araştırmalarının kanser biyolojisi ve tedavi süreçlerindeki yeri ile ilgili önemli bir adım olmayı hedeflemektedir.

5.1. Kısıtlılıklar

Bu pilot çalışmanın çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Küçük örneklem büyüklüğü ve tek merkezli tasarım, bulguların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. Ayrıca, bir kontrol grubunun olmaması, kesin sonuçlar çıkarma yeteneğini zorlaştırmaktadır; ancak, kontrol grubunun dahil edilmesi, kanser dışı bireylerden akciğer dokusu ve BAL örnekleri elde etme konusundaki etik kaygıları gündeme getirmektedir. "Sağlıklı" katılımcılardan örnekler alınsa bile, genetik varyasyonlar, sigara içme ve diyet gibi yaşam tarzı faktörlerinin yanı sıra bunların akciğer mikrobiyomu üzerindeki etkisi, önyargı oluşturabilir. Son olarak, cerrahi sırasında antibiyotik kullanımı, çalışma sonuçlarını etkileyebilecek potansiyel bir karıştırıcı faktör olarak öne çıkmaktadır.

6. SONUÇ

Bu çalışma, akciğer kanseri hastalarında akciğer mikrobiyotasının kompozisyonunu ve potansiyel etkilerini inceleyerek, mikrobiyom araştırmalarının kanser biyolojisi ve tedavi süreçlerindeki önemine ışık tutmayı amaçlandı. Çalışma kapsamında, akciğer kanseri tanısı almış 20 hastadan elde edilen BAL (Bronkoalveolar Lavaj) ve biyopsi örnekleri analiz edildi. Bulgular, her iki örnekte de Proteobacteria ve Actinobacteria'nın baskın olduğunu göstermiş ve bu durum, akciğer mikrobiyotasının benzer bir profil sergilediğini ortaya koydu.

Elde edilen sonuçlar, akciğer mikrobiyotasının kanser biyolojisi üzerindeki etkilerini anlamak için önemli bir temel oluşturmakta ve bu alandaki daha ileri çalışmaların gerekliliğini vurgulamaktadır. Mikrobiyomun, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına ve immünoterapi alanındaki ilerlemelere katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmanın sınırlamaları arasında küçük örneklem büyüklüğü, tek merkezli tasarım ve kontrol grubunun eksikliği yer almaktadır. Bu sınırlamalar, bulguların genellenebilirliğini kısıtlamakla birlikte, gelecekte daha geniş kapsamlı ve çok merkezli çalışmaların yapılması gerektiğini işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, akciğer kanseri ve mikrobiyota arasındaki potansiyel ilişkiyi anlamaya yönelik önemli bir adım olarak değerlendirilebilir. Mikrobiyom araştırmalarının, kanser biyolojisi ve tedavi süreçlerinde daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, elde edilen bulguların, akciğer kanseri tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68: 394–424. doi:10.3322/caac.21492
2. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024;74: 12–49. doi:10.3322/caac.21820
3. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017;7: 193. doi:10.3389/fonc.2017.00193
4. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11: 39–51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009
5. Planchard D, Boyer MJ, Lee J-S, Dechaphunkul A, Cheema PK, Takahashi T, et al. Postprogression Outcomes for Osimertinib versus Standard-of-Care EGFR-TKI in Patients with Previously Untreated EGFR-mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25: 2058–2063. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3325
6. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3: 991–998. doi:10.1038/ni1102-991
7. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83: 584–594. doi:10.4065/83.5.584
8. Lederberg J, McCray A. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *Scientist.* Apr 2001.
9. Marsland BJ, Trompette A, Gollwitzer ES. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12 Suppl 2: S150-156. doi:10.1513/AnnalsATS.201503-133AW
10. Serino M. Molecular Paths Linking Metabolic Diseases, Gut Microbiota Dysbiosis and Enterobacteria Infections. *J Mol Biol.* 2018;430: 581–590. doi:10.1016/j.jmb.2018.01.010
11. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9: 577–589. doi:10.1038/nrgastro.2012.156
12. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003;361: 1869–1871. doi:10.1016/S0140-6736(03)13490-3
13. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13: 800–812. doi:10.1038/nrc3610
14. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res.* 2012;160: 258–266. doi:10.1016/j.trsl.2012.02.005
15. Liu N-N, Ma Q, Ge Y, Yi C-X, Wei L-Q, Tan J-C, et al. Microbiome dysbiosis in lung cancer: from composition to therapy. *NPJ Precis Oncol.* 2020;4: 33. doi:10.1038/s41698-020-00138-z
16. Proctor E, Silmere H, Raghavan R, Hovmand P, Aarons G, Bunger A, et al. Outcomes for implementation research: conceptual distinctions, measurement

- challenges, and research agenda. *Adm Policy Ment Health*. 2011;38: 65–76. doi:10.1007/s10488-010-0319-7
17. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio*. 2015;6: e00037. doi:10.1128/mBio.00037-15
 18. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184: 957–963. doi:10.1164/rccm.201104-0655OC
 19. Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J*. 2004;23: 685–691. doi:10.1183/09031936.04.00056804
 20. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One*. 2011;6: e16384. doi:10.1371/journal.pone.0016384
 21. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192: 438–445. doi:10.1164/rccm.201502-0223OC
 22. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host–microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014;14: 827–835. doi:10.1038/nri3769
 23. Fodor AA, DeSantis TZ, Wylie KM, Badger JH, Ye Y, Hepburn T, et al. The “Most Wanted” Taxa from the Human Microbiome for Whole Genome Sequencing. Horn M, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e41294. doi:10.1371/journal.pone.0041294
 24. Yu K-H, Zhang C, Berry GJ, Altman RB, Ré C, Rubin DL, et al. Predicting non-small cell lung cancer prognosis by fully automated microscopic pathology image features. *Nat Commun*. 2016;7: 12474. doi:10.1038/ncomms12474
 25. Segal LN, Clemente JC, Tsay J-CJ, Koralov SB, Keller BC, Wu BG, et al. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol*. 2016;1: 16031. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.31
 26. Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJTH, de Boer JD, et al. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*. 2016;65: 575–583. doi:10.1136/gutjnl-2015-309728
 27. Hosgood HD, Sapkota AR, Rothman N, Rohan T, Hu W, Xu J, et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ Mol Mutagen*. 2014;55: 643–651. doi:10.1002/em.21878
 28. Tsay J-CJ, Wu BG, Sulaiman I, Gershner K, Schluger R, Li Y, et al. Lower Airway Dysbiosis Affects Lung Cancer Progression. *Cancer Discov*. 2021;11: 293–307. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0263
 29. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015;385: 977–1010. doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9
 30. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011;32: 605–644. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001
 31. Debaek M. Carcinoma of the lung and tobacco smoking: a historical perspective. *Ochsner J*. 1999;1: 106–108.

32. Wynder EL. TOBACCO SMOKING AS A POSSIBLE ETIOLOGIC FACTOR IN BRONCHIOGENIC CARCINOMA: A Study of Six Hundred and Eighty-Four Proved Cases. *JAMA*. 1950;143: 329. doi:10.1001/jama.1950.02910390001001
33. Cassidy A, Myles JP, van Tongeren M, Page RD, Liloglou T, Duffy SW, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer*. 2008;98: 270–276. doi:10.1038/sj.bjc.6604158
34. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28: 507–518. doi:10.1093/carcin/bgl253
35. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005;93: 825–833. doi:10.1038/sj.bjc.6602769
36. Wu AH, Fontham ET, Reynolds P, Greenberg RS, Buffler P, Liff J, et al. Previous lung disease and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am J Epidemiol*. 1995;141: 1023–1032. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a117366
37. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6: e17479. doi:10.1371/journal.pone.0017479
38. Abu-Shakra M, Guillemin F, Lee P. Cancer in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1993;36: 460–464. doi:10.1002/art.1780360405
39. Yu Y, Liu H, Zheng S, Ding Z, Chen Z, Jin W, et al. Gender susceptibility for cigarette smoking-attributable lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer*. 2014;85: 351–360. doi:10.1016/j.lungcan.2014.07.004
40. Zang EA, Wynder EL. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88: 183–192. doi:10.1093/jnci/88.3-4.183
41. Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res*. 1994;54: 5801–5803.
42. Taioli E, Wynder EL. Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86: 869–870. doi:10.1093/jnci/86.11.869
43. Wu C-T, Chang Y-L, Shih J-Y, Lee Y-C. The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130: 979–986. doi:10.1016/j.jtcvs.2005.06.012
44. Lee PN. Systematic review of the epidemiological evidence comparing lung cancer risk in smokers of mentholated and unmentholated cigarettes. *BMC Pulm Med*. 2011;11: 18. doi:10.1186/1471-2466-11-18
45. Blot WJ, Cohen SS, Aldrich M, McLaughlin JK, Hargreaves MK, Signorello LB. Lung cancer risk among smokers of menthol cigarettes. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103: 810–816. doi:10.1093/jnci/djr102
46. Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol*. 2010;28: 4616–4620. doi:10.1200/JCO.2010.29.6038
47. Li C, Fang R, Sun Y, Han X, Li F, Gao B, et al. Spectrum of oncogenic driver mutations in lung adenocarcinomas from East Asian never smokers. *PLoS One*. 2011;6: e28204. doi:10.1371/journal.pone.0028204

48. Hemminki K, Pershagen G. Cancer risk of air pollution: epidemiological evidence. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 4: 187–192. doi:10.1289/ehp.94102s4187
49. Lipsett M, Campleman S. Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a meta-analysis. *Am J Public Health.* 1999;89: 1009–1017. doi:10.2105/ajph.89.7.1009
50. Bhatia R, Lopipero P, Smith AH. Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology.* 1998;9: 84–91.
51. Erratum to “Cancer statistics, 2024.” *CA A Cancer J Clinicians.* 2024;74: 203–203. doi:10.3322/caac.21830
52. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5: 288–300. doi:10.21037/tlcr.2016.06.07
53. Pallis AG, Syrigos KN. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of NSCLC. *Lung Cancer.* 2013;80: 120–130. doi:10.1016/j.lungcan.2012.12.025
54. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10: 1243–1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630
55. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35: 75–91. doi:10.1007/s10555-016-9618-0
56. Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2013;24: vi99–vi105. doi:10.1093/annonc/mdt178
57. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer*. *Chest.* 2003;123: 97S–104S. doi:10.1378/chest.123.1_suppl.97S
58. Lardinois D, Weder W, Hany TF, Kamel EM, Korom S, Seifert B, et al. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. *N Engl J Med.* 2003;348: 2500–2507. doi:10.1056/NEJMoa022136
59. Riely GJ, Wood DE, Ettinger DS, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2024;22: 249–274. doi:10.6004/jnccn.2204.0023
60. Rami-Porta R, Nishimura KK, Giroux DJ, Detterbeck F, Cardillo G, Edwards JG, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groups in the Forthcoming (Ninth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2024;19: 1007–1027. doi:10.1016/j.jtho.2024.02.011
61. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27: v1–v27. doi:10.1093/annonc/mdw326
62. Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, et al. A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3: 46–52. doi:10.1097/JTO.0b013e31815e8577
63. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144: 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

64. Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinform Biol Insights*. 2016;10: BBI.S34610. doi:10.4137/BBI.S34610
65. Ju S, Qiu H, Zhou X, Zhu B, Lv X, Huang X, et al. CD13⁺ CD4⁺ CD25^{hi} regulatory T cells exhibit higher suppressive function and increase with tumor stage in non-small cell lung cancer patients. *Cell Cycle*. 2009;8: 2578–2585. doi:10.4161/cc.8.16.9302
66. Yannelli. Characteristics of PBMC obtained from leukapheresis products and tumor biopsies of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2009;22. doi:10.3892/or_00000588
67. Dumitriu IE, Dunbar DR, Howie SE, Sethi T, Gregory CD. Human Dendritic Cells Produce TGF- β 1 under the Influence of Lung Carcinoma Cells and Prime the Differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2009;182: 2795–2807. doi:10.4049/jimmunol.0712671
68. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993;150: 5445–5456.
69. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res*. 1999;59: 3698–3704.
70. Numasaki M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003;101: 2620–2627. doi:10.1182/blood-2002-05-1461
71. Nam J-S, Terabe M, Mamura M, Kang M-J, Chae H, Stuelten C, et al. An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res*. 2008;68: 3835–3843. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0215
72. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 2009;114: 1141–1149. doi:10.1182/blood-2009-03-208249
73. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009;31: 787–798. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014
74. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008;112: 362–373. doi:10.1182/blood-2007-11-120998
75. Ito N, Suzuki Y, Taniguchi Y, Ishiguro K, Nakamura H, Ohgi S. Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2005;25: 2027–2031.
76. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009;159: 109–119. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x
77. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology*. 2010;129: 147–153. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03189.x
78. Duan F, Duitama J, Al Seesi S, Ayres CM, Corcelli SA, Pawashe AP, et al. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to

- predict anticancer immunogenicity. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211: 2231–2248. doi:10.1084/jem.20141308
79. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 8621–8623. doi:10.1073/pnas.1633291100
 80. Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe*. 2011;10: 324–335. doi:10.1016/j.chom.2011.10.003
 81. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*. 2012;148: 1258–1270. doi:10.1016/j.cell.2012.01.035
 82. Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol*. 2014;20: 16452–16463. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16452
 83. Dietert RR, Dietert JM. The Microbiome and Sustainable Healthcare. *Healthcare (Basel)*. 2015;3: 100–129. doi:10.3390/healthcare3010100
 84. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13: 800–812. doi:10.1038/nrc3610
 85. Kronenberger MB, Meyers AD. Dysphagia following head and neck cancer surgery. *Dysphagia*. 1994;9: 236–244. doi:10.1007/BF00301917
 86. Radicioni G, Cao R, Carpenter J, Ford AA, Wang TT, Li Y, et al. The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome. *Mucosal Immunology*. 2016;9: 1442–1454. doi:10.1038/mi.2016.27
 87. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2017;17: 7–20. doi:10.1038/nri.2016.117
 88. Lloyd CM, Marsland BJ. Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity*. 2017;46: 549–561. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.005
 89. Proctor LM. The Human Microbiome Project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe*. 2011;10: 287–291. doi:10.1016/j.chom.2011.10.001
 90. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192: 438–445. doi:10.1164/rccm.201502-0223OC
 91. Huang YJ, Nariya S, Harris JM, Lynch SV, Choy DF, Arron JR, et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136: 874–884. doi:10.1016/j.jaci.2015.05.044
 92. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184: 957–963. doi:10.1164/rccm.201104-0655OC
 93. Bernasconi E, Pattaroni C, Koutsokera A, Pison C, Kessler R, Benden C, et al. Airway Microbiota Determines Innate Cell Inflammatory or Tissue Remodeling Profiles in Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194: 1252–1263. doi:10.1164/rccm.201512-2424OC
 94. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*. 2014;384: 691–702. doi:10.1016/S0140-6736(14)61136-3

95. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol.* 2016;78: 481–504. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105238
96. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010;5: e8578. doi:10.1371/journal.pone.0008578
97. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 1994;176: 2137–2142. doi:10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994
98. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 1999;284: 1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
99. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002;295: 1487. doi:10.1126/science.295.5559.1487
100. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016;352: aaf1098. doi:10.1126/science.aaf1098
101. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebién M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med.* 2008;205: 323–329. doi:10.1084/jem.20070891
102. Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GAW. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2005;192: 1201–1209. doi:10.1086/444545
103. Pallis AG, Syrigos KN. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;88: 494–503. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.06.011
104. Cukic V. The Association Between Lung Carcinoma and Tuberculosis. *Med Arch.* 2017;71: 212–214. doi:10.5455/medarh.2017.71.212-214
105. Lloyd CM, Marsland BJ. Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity.* 2017;46: 549–561. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.005
106. Rello J, Lisboa T, Lujan M, Gallego M, Kee C, Kay I, et al. Severity of Pneumococcal Pneumonia Associated With Genomic Bacterial Load. *Chest.* 2009;136: 832–840. doi:10.1378/chest.09-0258
107. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol.* 2014;14: 827–835. doi:10.1038/nri3769
108. Vogtman E, Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer.* 2016;114: 237–242. doi:10.1038/bjc.2015.465
109. Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H, Sinha R, et al. Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One.* 2010;5: e15216. doi:10.1371/journal.pone.0015216
110. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000;60: 3155–3159.

111. Cvejic L, Harding R, Churchward T, Turton A, Finlay P, Massey D, et al. Laryngeal penetration and aspiration in individuals with stable COPD. *Respirology*. 2011;16: 269–275. doi:10.1111/j.1440-1843.2010.01875.x
112. Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013;1: 19. doi:10.1186/2049-2618-1-19
113. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One*. 2011;6: e16384. doi:10.1371/journal.pone.0016384
114. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016;164: 1233–1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049
115. Blumberg R, Powrie F. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Sci Transl Med*. 2012;4: 137rv7. doi:10.1126/scitranslmed.3004184
116. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Microbiome, Inflammation, and Cancer. *The Cancer Journal*. 2014;20: 181–189. doi:10.1097/PPO.0000000000000048
117. Chanudet E, Adam P, Nicholson AG, Wotherspoon AC, Ranaldi R, Goteri G, et al. Chlamydiae and Mycoplasma infections in pulmonary MALT lymphoma. *Br J Cancer*. 2007;97: 949–951. doi:10.1038/sj.bjc.6603981
118. Bashiardes S, Tuganbaev T, Federici S, Elinav E. The microbiome in anti-cancer therapy. *Semin Immunol*. 2017;32: 74–81. doi:10.1016/j.smim.2017.04.001
119. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor Hypoxia and Malignant Progression. *Methods in Enzymology*. Elsevier; 2004. pp. 335–354. doi:10.1016/S0076-6879(04)81023-1
120. Baban CK, Cronin M, O’Hanlon D, O’Sullivan GC, Tangney M. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioengineered Bugs*. 2010;1: 385–394. doi:10.4161/bbug.1.6.13146
121. García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *Journal of Medical Microbiology*. 2016;65: 1347–1362. doi:10.1099/jmm.0.000371
122. Khan AA, Shrivastava A, Khurshid M. Normal to cancer microbiome transformation and its implication in cancer diagnosis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826: 331–337. doi:10.1016/j.bbcan.2012.05.005
123. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23: 713–739. doi:10.1128/CMR.00011-10
124. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*. 2015;42: 344–355. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.010
125. Van Dessel N, Swofford CA, Forbes NS. Potent and tumor specific: arming bacteria with therapeutic proteins. *Ther Deliv*. 2015;6: 385–399. doi:10.4155/tde.14.113
126. Laroumagne S, Lepage B, Hermant C, Plat G, Phelippeau M, Bigay-Game L, et al. Bronchial colonisation in patients with lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J*. 2013;42: 220–229. doi:10.1183/09031936.00062212
127. 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: 163. doi:10.1186/s13059-016-1021-1

128. Peters BA, Hayes RB, Goparaju C, Reid C, Pass HI, Ahn J. The Microbiome in Lung Cancer Tissue and Recurrence-Free Survival. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2019;28: 731–740. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0966
129. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Falkowski NR, Huffnagle GB, et al. Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. Clemente JC, editor. *mBio*. 2017;8: e02287-16. doi:10.1128/mBio.02287-16
130. Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013;1: 19. doi:10.1186/2049-2618-1-19
131. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12: 821–830. doi:10.1513/AnnalsATS.201501-029OC
132. Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, et al. Analysis of culture-dependent versus culture-independent techniques for identification of bacteria in clinically obtained bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2014;52: 3605–3613. doi:10.1128/JCM.01028-14
133. Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, et al. Cell-associated bacteria in the human lung microbiome. *Microbiome*. 2014;2: 28. doi:10.1186/2049-2618-2-28
134. Durack J, Huang YJ, Nariya S, Christian LS, Ansel KM, Beigelman A, et al. Bacterial biogeography of adult airways in atopic asthma. *Microbiome*. 2018;6: 104. doi:10.1186/s40168-018-0487-3
135. Denner DR, Sangwan N, Becker JB, Hogarth DK, Oldham J, Castillo J, et al. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137: 1398-1405.e3. doi:10.1016/j.jaci.2015.10.017
136. Grønseth R, Drengenes C, Wiker HG, Tangedal S, Xue Y, Husebø GR, et al. Protected sampling is preferable in bronchoscopic studies of the airway microbiome. *ERJ Open Res*. 2017;3: 00019–02017. doi:10.1183/23120541.00019-2017
137. Meduri GU, Beals DH, Maijub AG, Baselski V. Protected bronchoalveolar lavage. A new bronchoscopic technique to retrieve uncontaminated distal airway secretions. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143: 855–864. doi:10.1164/ajrccm/143.4_Pt_1.855
138. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest*. 2009;135: 505–512. doi:10.1378/chest.08-0412
139. Radhakrishnan DK, Corey M, Dell SD. Realities of expectorated sputum collection in the pediatric cystic fibrosis clinic. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161: 603–606. doi:10.1001/archpedi.161.6.603
140. Cox MJ, Turek EM, Hennessy C, Mirza GK, James PL, Coleman M, et al. Longitudinal assessment of sputum microbiome by sequencing of the 16S rRNA gene in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *PLoS One*. 2017;12: e0170622. doi:10.1371/journal.pone.0170622
141. Tangedal S, Aanerud M, Grønseth R, Drengenes C, Wiker HG, Bakke PS, et al. Comparing microbiota profiles in induced and spontaneous sputum samples in COPD patients. *Respir Res*. 2017;18: 164. doi:10.1186/s12931-017-0645-3

142. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, Stevens MJ, Szeffler SJ, Accurso FJ, et al. Assessment of airway microbiota and inflammation in cystic fibrosis using multiple sampling methods. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12: 221–229. doi:10.1513/AnnalsATS.201407-310OC
143. An S-Q, Warris A, Turner S. Microbiome characteristics of induced sputum compared to bronchial fluid and upper airway samples. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53: 921–928. doi:10.1002/ppul.24037
144. Chang SH, Krupnick AS. Perioperative antibiotics in thoracic surgery. *Thorac Surg Clin*. 2012;22: 35–45, vi. doi:10.1016/j.thorsurg.2011.08.012
145. D’Andrilli A, Rendina EA. Enhanced recovery after surgery (ERAS) and fast-track in video-assisted thoracic surgery (VATS) lobectomy: preoperative optimisation and care-plans. *J Vis Surg*. 2018;4: 4. doi:10.21037/jovs.2017.12.17
146. Kitsios GD, Rojas M, Kass DJ, Fitch A, Sembrat JC, Qin S, et al. Microbiome in lung explants of idiopathic pulmonary fibrosis: a case-control study in patients with end-stage fibrosis. *Thorax*. 2018;73: 481–484. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210537
147. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002;161: 1961–1971. doi:10.1016/S0002-9440(10)64472-0
148. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185: 1073–1080. doi:10.1164/rccm.201111-2075OC
149. Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P, Frey PM, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *J Infect Dis*. 2012;205: 1048–1055. doi:10.1093/infdis/jis024
150. Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald P-J. Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. *PLoS One*. 2015;10: e0123216. doi:10.1371/journal.pone.0123216
151. Biesbroek G, Sanders EAM, Roeselers G, Wang X, Caspers MPM, Trzciński K, et al. Deep sequencing analyses of low density microbial communities: working at the boundary of accurate microbiota detection. *PLoS One*. 2012;7: e32942. doi:10.1371/journal.pone.0032942
152. Zakharkina T, Martin-Loeches I, Matamoros S, Poveda P, Torres A, Kastelijns JB, et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. *Thorax*. 2017;72: 803–810. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209158
153. Panzer AR, Lynch SV, Langelier C, Christie JD, McCauley K, Nelson M, et al. Lung Microbiota Is Related to Smoking Status and to Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Trauma Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197: 621–631. doi:10.1164/rccm.201702-0441OC
154. Kelly BJ, Imai I, Bittinger K, Laughlin A, Fuchs BD, Bushman FD, et al. Composition and dynamics of the respiratory tract microbiome in intubated patients. *Microbiome*. 2016;4: 7. doi:10.1186/s40168-016-0151-8
155. Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28: 208–236. doi:10.1128/CMR.00110-14
156. Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol*. 2002;18: 337–342.

157. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30: 1292–1305. doi:10.1093/nar/30.6.1292
158. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19: 165–256. doi:10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
159. Card RM, Warburton PJ, MacLaren N, Mullany P, Allan E, Anjum MF. Application of microarray and functional-based screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes in the microbiomes of healthy humans. *PLoS One.* 2014;9: e86428. doi:10.1371/journal.pone.0086428
160. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 2008;26: 317–325. doi:10.1038/nbt1385
161. Barczak AK, Gomez JE, Kaufmann BB, Hinson ER, Cosimi L, Borowsky ML, et al. RNA signatures allow rapid identification of pathogens and antibiotic susceptibilities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109: 6217–6222. doi:10.1073/pnas.1119540109
162. Grahl N, Dolben EL, Filkins LM, Crocker AW, Willger SD, Morrison HG, et al. Profiling of Bacterial and Fungal Microbial Communities in Cystic Fibrosis Sputum Using RNA. *mSphere.* 2018;3: e00292-18. doi:10.1128/mSphere.00292-18
163. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol.* 1998;180: 4765–4774. doi:10.1128/JB.180.18.4765-4774.1998
164. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63: 4516–4522. doi:10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997
165. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73: 127–141. doi:10.1023/a:1000669317571
166. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449: 804–810. doi:10.1038/nature06244
167. D’Amore R, Ijaz UZ, Schirmer M, Kenny JG, Gregory R, Darby AC, et al. A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics.* 2016;17: 55. doi:10.1186/s12864-015-2194-9
168. Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M. The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84: e02627-17. doi:10.1128/AEM.02627-17
169. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113: 1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
170. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z, Forney LJ. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One.* 2012;7: e33865. doi:10.1371/journal.pone.0033865
171. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12: 87. doi:10.1186/s12915-014-0087-z

172. Velásquez-Mejía EP, de la Cuesta-Zuluaga J, Escobar JS. Impact of DNA extraction, sample dilution, and reagent contamination on 16S rRNA gene sequencing of human feces. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102: 403–411. doi:10.1007/s00253-017-8583-z
173. Sinha R, Abnet CC, White O, Knight R, Huttenhower C. The microbiome quality control project: baseline study design and future directions. *Genome Biol*. 2015;16: 276. doi:10.1186/s13059-015-0841-8
174. Bokulich NA, Rideout JR, Mercurio WG, Shiffer A, Wolfe B, Maurice CF, et al. mockrobiota: a Public Resource for Microbiome Bioinformatics Benchmarking. *mSystems*. 2016;1: e00062-16. doi:10.1128/mSystems.00062-16
175. Kircher M, Sawyer S, Meyer M. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res*. 2012;40: e3. doi:10.1093/nar/gkr771
176. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*. 2014;2: 6. doi:10.1186/2049-2618-2-6
177. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75: 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
178. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7: 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
179. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13: 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869
180. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007;45: 2761–2764. doi:10.1128/JCM.01228-07
181. Fadeev E, Cardozo-Mino MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, et al. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Front Microbiol*. 2021;12: 637526. doi:10.3389/fmicb.2021.637526
182. Fadeev E, Cardozo-Mino MG, Rapp JZ, Bienhold C, Salter I, Salman-Carvalho V, et al. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Front Microbiol*. 2021;12: 637526. doi:10.3389/fmicb.2021.637526
183. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37: 852–857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9
184. Liu H-X, Tao L-L, Zhang J, Zhu Y-G, Zheng Y, Liu D, et al. 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: 769–778. doi:10.1002/ijc.31098
185. 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: e0177062.
doi:10.1371/journal.pone.0177062
186. Yan X, Yang M, Liu J, Gao R, Hu J, Li J, et al. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. Am J Cancer Res. 2015;5: 3111–3122.
187. Greathouse KL, White JR, Vargas AJ, Bliskovsky VV, Beck JA, von Muhlinen N, et al. Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. Genome Biol. 2018;19: 123. doi:10.1186/s13059-018-1501-6

