

DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s1-25-31

Цитирование: Курмышкина О. В., Ковчур П. И., Волкова Т. О. Транскриптомный RNA-SEQ анализ опухолевого микроокружения: на пути к разработке молекулярной классификации вирус-ассоциированного плоскоклеточного рака шейки матки. Материалы конгресса. Злокачественные опухоли, 2023 (том 13), #3s1, стр. 25–31.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ RNA-SEQ АНАЛИЗ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: НА ПУТИ К РАЗРАБОТКЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ВИРУС-АССОЦИИРОВАННОГО ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

О.В. Курмышкина¹, П.И. Ковчур^{1,2}, Т.О. Волкова¹

¹ ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет (ПетрГУ)», Петрозаводск, Россия

² ГБУЗ РК «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск, Россия

Для корреспонденции: VolkovaTO@yandex.ru

Резюме: Молекулярно-генетическое и иммунное разнообразие вирус-ассоциированного рака шейки матки представляет сравнительно малоисследованную проблему, в связи с чем, вопрос о существовании разных молекулярных типов и возможности разработки молекулярной классификации пока остается открытым. Вклад иммунного и стромального компонентов опухолевого микроокружения в формирование специфического молекулярного фенотипа также не является в достаточной мере охарактеризованным, в особенности для наиболее ранних стадий прогрессии рака шейки матки. Анализ транскриптома как одной из составляющих молекулярного «портрета» опухоли с помощью технологий секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) предоставляет основу для идентификации различных молекулярных типов с перспективой разработки классификации. Генетическое и фенотипическое, в том числе иммунологическое, разнообразие рака шейки матки позволит понять причины различий в агрессивности опухоли, прогнозе, эффективности терапии, а также расширить возможности применения иммунотерапии и комбинированных методов лечения. В данной статье приводится обзор международных и собственных исследований, проводимых в направлении обозначенных проблем.

Ключевые слова: транскриптом, РНК-секвенирование, рак шейки матки, иммунное микроокружение, иммуносупрессия, интраэпителиальные неоплазии, молекулярный фенотип

ВВЕДЕНИЕ: ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ ПРИЧИНЫ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения рак шейки матки (РШМ) занимает четвертое место по глобальной заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний у женского населения, причем в большинстве стран он входит в тройку онкопатологий, поражающих женщин моложе 45 лет, представляя, таким образом, значимую медико-социальную проблему [1]. Причины сложившейся ситуации связаны не только со спецификой в организации профилактических мероприятий, скрининга или доступности медицинской помощи, но и с недостаточным использованием новых методов диагностики и терапии, которое, в свою очередь, обусловлено неполным пониманием механизмов патогенеза данного типа рака. Тем не менее, вирус-ассоциированная природа и, соответственно, тесная вовлеченность врожденного

и адаптивного иммунитета в патогенез РШМ способствуют значительному росту интереса к нему в последние годы, как с фундаментальной, так и прикладной точки зрения, особенно в свете быстрого развития иммунотерапии.

Среди современных высокопроизводительных методов молекулярно-генетического анализа одним из наиболее информативных является секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) и, в частности, одно из его приложений — РНК-секвенирование (RNA-Seq) для анализа транскриптомных профилей и фенотипирования. Данная технология позволяет сегодня, используя как основу полногеномные иммунные профили или, в более широком смысле, профили опухолевого микроокружения (tumor microenvironment, TME), реконструировать фенотипическое разнообразие опухолей и разрабатывать их молекулярную классификацию, как в масштабе пан-раковых исследований, так и в применении к конкретным типам онкозаболеваний. Например, в работе Thorsson et al.

по результатам полного транскриптомного профилирования 33 типов рака было выявлено существование 6 относительно устойчивых пан-опухолевых иммунофенотипов, в различной степени представленных в каждом конкретном типе патологии, что безусловно показывает дальнейшие пути совершенствования иммунотерапевтических подходов и повышения их эффективности [2]. Однако необходимо отметить, что проблема иммунной неоднородности как составляющей общей фенотипической гетерогенности опухоли и возможность обнаружения различных иммуно-/TME-ассоциированных фенотипов в случае РШМ стали активно обсуждаться лишь с недавнего времени, в то же время для многих других онкологических заболеваний такие молекулярные подтипы уже довольно детально охарактеризованы.

В целом, предложенные исследователями на основе особенностей профиля экспрессии генов иммунной регуляции и/или профиля иммунного инфильтрата варианты классификации укладываются в концепцию «горячих» и «холодных» опухолей, или иммунологически «активных» и иммунологически «молчащих» [3]. В дополнение к ним некоторые авторы выделяют промежуточные варианты «измененного» фенотипа, как, например, «истощенный» или «иммуносупрессорный» [4]. В работах, выполненных с использованием базы данных Ракового Геномного Атласа (The Cancer Genome Atlas, TCGA), рак шейки матки (большинство его клинических случаев) вполне ожидаемо классифицируется именно как «горячий» тип [5–7], развивающийся на фундаменте хронически воспаленного микроокружения и высокой иммуногенности [8, 9]. Однако подобная градация опухолевых иммунофенотипов сегодня уже представляется слишком упрощенной, нуждающейся в более глубоком изучении, так как она не позволяет объяснить все процессы активной иммуносупрессии и фенотипическое разнообразие внутри «горячего» типа [10], что, в частности, может быть одной из причин весьма низкой эффективности иммунотерапии в отношении РШМ, даже при условии положительной экспрессии предикторных маркеров опухолевой реактивности [11, 12]. Также одним из проблемных вопросов является роль процесса воспаления, который, с одной стороны, является общепризнанным драйвером онкогенеза и иммуносупрессии [13, 14], с другой стороны, согласно многочисленным биоинформатическим исследованиям TCGA-данных по РШМ, более высокие показатели выживаемости больных ассоциированы с высокими значениями показателей внутриопухолевой иммунной активности, в том числе повышенной экспрессией воспалительных факторов и ингибиторных «контрольных иммунных точек» [10]. Отмечается, что такая положительная связь характерна именно для РШМ [15].

Наравне с проблемой разработки молекулярной классификации РШМ и уточнения его иммунофенотипов остается много дискуссионных вопросов, касающихся ранних этапов развития РШМ (интраэпителиальные неоплазии, карцинома *in situ* и микроинвазивный рак), а именно того, каким образом происходит формирование многообразия

иммунных профилей РШМ и «молекулярного портрета» в целом и что является движущим фактором. Несмотря на детально изученные механизмы действия онкогенов вируса папилломы человека (ВПЧ) — главного этиологического фактора РШМ, — до сих пор нет четкого ответа, каким образом иммунологически латентная (толерогенная) инфекция и вызванная ею гиперплазия в определенной доле случаев трансформируется в иммунологически «горячую», богато инфильтрированную неоплазию и почему она, в свою очередь, далее приобретает иммуносупрессорный и «истощенный» фенотип [9]. Новые данные указывают на то, что выбор «иммунного портрета» в процессе иммуноредактирования РШМ вероятно происходит на преинвазивной стадии, что имеет потенциальное значение с точки зрения изменения тактики лечения ранних патологий [16]. Важность изучения наиболее ранних стадий прогрессии РШМ при идентификации его молекулярных фенотипов становится еще более очевидной, если обратиться к совсем новым фактам: так, Livesey et al. показали на примере опухолей нескольких локализаций, включая РШМ, что при решении задачи выявления разных молекулярных типов транскриптомные профили, соответствующие более поздним этапам распространенного рака, необходимо сравнивать (или нормализовывать) с таковыми для предшествующих ранних или начальных стадий заболевания, а не здоровой ткани (тем более что в большинстве международных NGS-депозитариев «здоровый контроль» представлен лишь единичными случаями или отсутствует вовсе) [17]. Такой подход многократно повышает точность классификации, поскольку профили генной экспрессии ранних стадий отличаются существенно большим разнообразием, чем более поздних стадий [17]. Резкое увеличение разнообразия мета-программ генной ко-экспрессии [18] и иммунной гетерогенности, сопровождающее переход от предрака к микроинвазивной карциноме и инвазивному РШМ, было также продемонстрировано с помощью транскриптомики одиночных клеток (single-cell RNA-Seq, scRNA-Seq) [19]. Согласно новым scRNA-Seq данным, еще одним источником иммунной гетерогенности, осложняющим изучение фенотипического разнообразия РШМ на протяжении его прогрессии, являются специфические популяции (кластеры) эпителиальных клеток с иммунорегуляторной активностью, которые детектируются на этапе предрака и, вероятно, определяют траекторию дальнейшего развития иммунного микроокружения РШМ [20]. Аналогичные влияния описаны и для ангиогенных факторов, что указывает на необходимость их включения в спектр параметров для идентификации иммунофенотипов и в целом молекулярных типов РШМ совместно с другими регуляторами стромального и иммунного микроокружения [21].

Однако большинство описанных к настоящему времени исследований по молекулярному NGS-профилированию РШМ проведено на материале поздних стадий распространенного, метастатического, рецидивирующего рака (зачастую только с использованием ресурсов TCGA), поэтому полученные в рамках этих исследований сведения

нуждаются в дальнейшем изучении с вовлечением более ранних клинических и доклинических стадий. В данном обзоре представлено обобщение результатов RNA-Seq исследований по ВПЧ-ассоциированному РШМ, опубликованных в мировой литературе за последние несколько лет и проливающих свет на существование разных молекулярных фенотипов (иммунофенотипов или TME-фенотипов), на вклад врожденных противовирусных и воспалительных механизмов. Мы ограничили круг рассмотрения только плоскоклеточной карциномой шейки матки, уделяя особое внимание ранним стадиям заболевания.

ВКЛАД ИММУННОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В РАЗНООБРАЗИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОФИЛЕЙ РШМ

Первая крупная работа по описанию «геномного ландшафта» РШМ с использованием полногеномного, полноэкзомного и транскриптомного секвенирования была выполнена Ojesina et al., по результатам которой был охарактеризован профиль и частотность рекуррентных соматических мутаций плоскоклеточного РШМ: среди наиболее часто встречаемых — PIK3CA (14%), EP300 (16%), FBXW7 (15%), HLA-B (9%), TP53 (9%), MAPK1 (8%), PTEN (6%), ERBB2 (5%) [22]. Несмотря на то, что некоторые из обнаруженных замен (например, в гене ERBB2) действительно были ранее известны как драйверные онкогенные мутации при других типах рака, общая низкая частота встречаемости не позволяет рассматривать профиль генетических aberrаций как классификационный признак для РШМ. Тем не менее, интересным выводом данной работы явилось то, что наиболее часто мутируемые гены функционально объединены участием в регуляции иммунного ответа, и в первую очередь, в интерферон-гамма (IFN γ) сигнальном пути. Некоторое время спустя в журнале Nature TCGA-консорциумом были опубликованы результаты широкомасштабного исследования интегрированного молекулярного профиля РШМ, на основании которых были установлены два фенотипических подтипа ("iClusters") плоскоклеточного РШМ — "Keratin-low" и "Keratin-high", а также впервые описаны амплификации генов CD274/PD-L1 и PDCD1LG2/PD-L2 и мутации APOBEC, ERBB3, CASP8, HLA-A и TGFB2 [23]. Год назад упомянутые TCGA-iClusters были вновь проанализированы с помощью интегрированного подхода, включающего полнотранскриптомное секвенирование, на расширенной выборке больных с плоскоклеточным ВПЧ (+) РШМ [24]. Полученные результаты в целом перекрывались с разделением на описанные ранее "Keratin-low" и "Keratin-high" кластеры, но выявили также новые закономерности, побудившие авторов отказаться от использования кератин-ассоциированной номенклатуры. Несмотря на принадлежность к плоскоклеточному гистологическому варианту, один из обнаруженных кластеров на уровне генной экспрессии имел свойства, указывающие на его возможное происхождение из цилиндрического эпителия, что более характерно для желези-

стой карциномы. Кроме того, данный кластер отличался активацией специфичного набора ингибиторных иммунных «чекпойнтов» (B7-H3, NT5E и PD-L2), особым фенотипом стромальных фибробластов, поляризацией инфильтрирующих нейтрофилов и макрофагов [24].

Следующая основополагающая работа, проведенная Thorsson et al. с использованием TCGA-хранилища, была посвящена пан-раковому анализу разнообразия иммунных фенотипов; в совокупности авторы идентифицировали 6 пан-опухолевых иммунных фенотипов, два из которых — C1 ("wound-healing") и C2 ("IFN γ -dominant") — оказались свойственны подавляющему большинству случаев РШМ [2]. Поскольку оба фенотипа имели признаки высокой иммунологической активности, это обнаружение явно указывает на фенотипическую гетерогенность внутри иммуноактивного «портрета» РШМ как такового.

Ключевыми признаками «горячего» фенотипа, присущего большей доле РШМ, являются высокое содержание иммунного инфильтрата (с преобладанием цитотоксических Т-клеток и M1-поляризованных макрофагов), провоспалительный и Th1-цитокиновый профиль (в том числе, активный интерфероновый статус), а также широкий репертуар Т-клеточных рецепторов, что в случае РШМ рассматривается как следствие вирус-индуцированной геномной нестабильности, приводящей к высокой неопластической нагрузке и, соответственно, иммуногенности [25]. Высокая иммунная активность в опухолевом очаге естественным образом сопровождается запуском ингибиторных «чекпойнт»-механизмов, используемых опухолевыми клетками для ускользания от иммунного надзора, вследствие чего при РШМ может наблюдаться ко-обогащение популяциями активированных и «истощенных» Т-эффекторов [20]. В подтверждение этого для иммунологически «горячего» РШМ Lu et al. на основе TCGA-датасетов были описаны два подкласса — иммуноактивный и истощенный, оба характеризовались высоким содержанием CD8 (+) Т-лимфоцитов и макрофагов, IFN-тип-I профилем, повышенной цитолитической активностью и высоким уровнем PD1, однако различались экспрессией генов, ассоциированных с заживлением ран ("wound healing signature"), в том числе TGF β -зависимых механизмов, указывая на тесную взаимосвязь между иммунным и стромальным компонентами [26]. В другом исследовании, применив WGCNA-метод анализа взвешенных сетей коэкспрессии к TCGA-профилям, He et al. идентифицировали генный модуль, наиболее сильно связанный с регуляцией иммунного ответа; на основе данного модуля были выделены 3 подтипа РШМ с «низким», «средним» и «высоким» уровнем активации иммуноассоциированных сигнальных путей [27].

Следующий ряд работ убедительно демонстрирует то, что хотя иммунная компонента микроокружения РШМ, вероятно, является доминирующей, другие компоненты TME также должны учитываться при поиске молекулярных фенотипов. Так, Li et al. использовали для этой цели двухэтапный подход: на первом этапе с помощью scRNA-Seq ими были получены транскриптомные профили, специфич-

ные для отдельных типов клеток и клеточных популяций, составляющих опухолевый очаг; далее, на втором этапе, проанализировав представленность данных профилей в датасетах РШМ, депонированных в TCGA, авторы выделили 4 фенотипа РШМ — "hypoxia" (S-H тип), "proliferation" (S-P тип), "differentiation" (S-D тип) и "immunoactive" (S-I) [28]. В исследовании Lu et al. для ВПЧ16 (+) РШМ было идентифицировано два подтипа, обозначенные как HPV16-IMM и HPV16-KRT, причем если HPV16-IMM характеризовался высокой экспрессией генов иммунного ответа, мезенхимальными свойствами и имел выраженные признаки эпигенетического сайленсинга, то HPV16-KRT отличался высокой активностью процессов биологического окисления, кератинизации и WNT-зависимых путей [29]. В работе Li et al. наравне с иммунологически активным sub1-подтипом РШМ, профиль которого обогащен процессами врожденного иммунного ответа, процессинга и презентации антигенов, Т-клеточной цитотоксичности, был описан sub2-подтип, рассматриваемый как иммунологическая «пустыня» и обогащенный механизмами трансмембранной передачи сигнала, в первую очередь, по GPCR-зависимому пути, который, как известно, тесно ассоциирован с ангиогенезом, инвазией, миграцией клеток и метастазированием [30]. Недавно Lai et al. сообщили об обнаружении трех иммунометаболических подгрупп РШМ: C1-тип с иммуносупрессорным статусом и активацией цитохром P450-зависимых механизмов, C2-тип с низким содержанием иммунного инфильтрата и tPDK-анаболическим профилем и воспалительный C3-тип, демонстрирующий активацию биосинтеза ароматических аминокислот [31].

RNA-SEQ ПРОФИЛИРОВАНИЕ РАННИХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ РШМ

Выше было отмечено, что в настоящее время в международных базах содержится сравнительно малое число работ, посвященных ранним стадиям РШМ, вопросам их геномной и фенотипической гетерогенности, механизмам перехода от внутриэпителиального развития к инвазивной экспансии и роли воспалительных и противовирусных механизмов в этом переходе. Основное внимание исследователей сосредоточено на возможности прогнозирования течения ВПЧ-инфекции и перерастания ее в злокачественную форму рака. Например, Øvestad et al. представили анализ, в котором использовалось таргетное RNA-Seq около 400 иммуноассоциированных генов в образцах нормального цервикального эпителия (в том числе, ВПЧ-положительного) и цервикальных интраэпителиальных неоплазий тяжелой степени (ЦИН3) с целью идентификации маркеров, связанных с риском прогрессии ВПЧ-инфекции в ЦИН3 и далее РШМ [32]. Авторы сообщают о выраженной аттенуации маркеров эффективного иммунного ответа (в частности, продукции IFN γ и Т-клеточной активации) и, наоборот, усилении пролиферативных маркеров по мере прогрессии к преинвазивной карциноме, что можно рассматривать как предпосылку

к активации инвазии. В работе Halle et al., выполненной также на основе таргетного RNA-Seq и L1000-алгоритма машинного обучения, позволяющего реконструировать транскриптом-подобные профили из экспрессии 978 «ориентирных» генов, было проведено сравнение профиля экспрессии набора иммуноассоциированных генов для двух вариантов течения ЦИН3 — регрессирующей и персистирующей, с целью выявить вероятные драйверы прогрессии ЦИН3 в инвазивный рак и определить предикторную сигнатуру [33, 34]. Авторы пришли к выводу, что регрессия ЦИН3 определяется теми иммунными механизмами, которые формируют «горячий» воспалительный фенотип, а персистенция ЦИН3, увеличивающая риск прогрессии в инвазивный РШМ, поддерживается пролиферативными сигнальными путями.

Вместе с тем, имеется ряд публикаций, указывающих на еще более сложные закономерности. Например, в одной из них также была поставлена задача охарактеризовать эволюцию транскриптомного профиля в ряду неоплазии легкой степени (LSIL) — неоплазии тяжелой степени (HSIL) — РШМ и показать нелинейность изменений экспрессии генов иммунного ответа по мере прогрессии [35]. Используя данные из базы Gene Expression Omnibus (GEO), авторы обнаружили иммунологически «горячий» и «теплый» фенотипы как в группе HSIL, так и РШМ, причем оба этих фенотипа характеризовались повышением показателей иммуносупрессии и воспаления, а степень корреляции между данными показателями усиливалась, начиная с HSIL. В другом исследовании был проведен scRNA-Seq анализ клеток, выделенных из нескольких образцов здорового эпителия шейки матки, ЦИН тяжелой степени и РШМ, и на основании описанных клеточных кластеров авторы предположили, что основное различие между преинвазивными неоплазиями и РШМ состоит в следующем: если при ЦИН3 иммунное микроокружение демонстрирует относительно низкий уровень произошедшей недавно активации, то при РШМ оно имеет все признаки иммуносупрессии [36]. Наиболее интересным выводом данной работы представляется то, что если при ЦИН повышение экспрессии иммуноассоциированных генов оказывает протективный эффект, то при РШМ это же повышение связано с менее благоприятным прогнозом. Нами также было проведено RNA-Seq исследование образцов ЦИН и РШМ ранних стадий, с особым вниманием к поиску различий между предраком и микроинвазивным РШМ и анализу гетерогенности молекулярных профилей раннего инвазивного рака относительно предшествующей стадии развития, чьи фенотипы в целом «демаркированы» активацией инвазии [37]. Мы выявили несколько паттернов генов с согласованной изменяющейся экспрессией и имеющих различную функциональную нагрузку («дифференцировочный», «иммунный/контроль структуры ДНК», «ангиогенный/морфогенетический/клеточная подвижность», «молекулярный транспорт/системная регуляция») и в различной степени представленных в проанализированной панели образцов. Внутри непо-

средственно группы раннего инвазивного РШМ на основе кластерного анализа генов, дифференциально экспрессированных относительно ЦИН2/3, было выделено два кластера образцов, которые можно рассматривать как разные молекулярные фенотипы с потенциально разными траекториями развития. Один из них был ассоциирован с иммунной активацией/регуляцией, организацией хроматина и клеточным циклом/дифференцировкой, другой демонстрировал активацию процессов морфогенеза (в том числе, ангиогенеза) и различных форм клеточной подвижности. В целом ранний инвазивный РШМ отличался от преинвазивных форм (ЦИН2/3, карцинома *in situ*) выраженной активацией врожденных иммунных механизмов, в том числе противовирусных, провоспалительных, опосредованных сенсорами цитоплазматической ДНК или другими паттерн-распознающими рецепторами (PRR) с участием интерферон-стимулируемых генов, а также связанных с ответом на повреждения ДНК (DNA-damage response, DDR) [37]. Данная закономерность указывает на то, что сверхстимуляция защитных механизмов на ранних этапах развития неоплазии может быть одним из триггеров инвазии; в то же время, в отношении последующих стадий, это может реализовываться в форме иммуноактивного, но хронически воспаленного и истощенного иммунотипа. Ассоциированность процессов DDR и «разогрева» иммунного микроокружения опухоли на ранней инвазивной стадии, наиболее вероятно, обусловлена высоким уровнем геномной нестабильности, характерной для ВПЧ-индуцированном РШМ [26, 38, 39].

Как можно видеть, транскриптомный анализ позволяет проследить непрерывные изменения профиля генной экспрессии при многостадийном процессе канцерогенеза РШМ, когда каждая последующая стадия может развиваться по нескольким траекториям и приводить к многообразию молекулярных типов [17]. Это было наглядно показано в недавно опубликованной работе Liu et al., цель которой состояла в анализе транскриптомной эволюции разных популяций клеток (в первую очередь, эпителиальных), выделенных из образцов нормального эктоцервикса, ЦИН, РШМ ранней IB2 стадии и поздних IIB-III стадий, с использованием scRNA-Seq [40]. Для 8 обнаруженных кластеров эпителиальных клеток были выделены две разных траектории развития; а применение метода псевдовременного упорядочивания полученных scRNA-Seq позволило выделить 5 паттернов изменений профиля экспрессии по ходу прогрессии ЦМН/РШМ. Два из 8 эпителиальных кластеров преобладали в образцах раннего и позднего РШМ и отличались активацией механизмов репарации ДНК, инвазии, иммуносупрессии, воспаления и способностью к прямому рецептор-опосредованному взаимодействию с Т-клетками. Интересно также описание двух кластеров эндотелиальных клеток с противоположными активностями и различной количественной динамикой по ходу прогрессии от ЦИН к РШМ: один из кластеров был функционально связан с регуляцией пролиферации эпителиальных клеток, в то время как второй кластер

оказался вовлечен в презентацию и процессинг антигенов [40]. Одна из возможных причин существования разных траекторий развития инвазивного РШМ может заключаться в наличии нескольких паттернов интеграционных событий, обнаруженных недавно для ВПЧ16 и рака I–II стадий с помощью технологии Нанопорового секвенирования длинных фрагментов ДНК [41].

В целом, описанные выше наблюдения показывают неоднозначную роль процессов иммунной активации и воспаления по ходу развития вирус-зависимого РШМ, что вносит существенный вклад в его фенотипическую гетерогенность. Как подчеркивает Nola et al., иммунная система играет ключевую роль в переходе от исходной иммунной толерантности при ранних ЦИН к состоянию хронического воспаления и позже, при прогрессирующем раке, к «сценарию» иммунного истощения [42]. К схожему заключению пришли в статье Litwin et al.: несмотря на то, что механизмы «ускользания» от иммунного надзора и его подавления важны для вирус-зависимого канцерогенеза, с момента начала инвазии РШМ характеризуется в целом высокой иммуногенностью [25]. С клинической точки зрения, значимость всех этих обнаружений может быть связана с пересмотром отношения к противовоспалительной (в противовес иммуностимулирующей) терапии предрака и собственно РШМ. Идентификация разных (иммуно-) фенотипов с помощью транскриптомного анализа позволяет реконструировать фенотип-специфичные сети белок-белковых взаимодействий, выделить «хабовые» гены/белки и предложить на их основе кандидатов для молекулярного докинга потенциальных препаратов и, более того, спрогнозировать *in silico* их терапевтический эффект, как это было продемонстрировано в работе Kori et al. на примере линейки противовоспалительных препаратов в применении к двум основным гистотипам РШМ [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из накопленных в литературе данных следует, что опухолевая экспансия и уход от иммунного надзора могут достигаться разными механизмами и путями в зависимости от молекулярного подтипа, многообразие которых, по-видимому, формируется на самых ранних стадиях прогрессии РШМ. Различными исследовательскими группами была продемонстрирована принципиальная возможность выделить относительно устойчивые и функционально различные транскриптомные профили, проявляющиеся на разных уровнях анализа (спектра дифференциально экспрессированных генов, обогащения сигнальными путями и процессами, глобальных модулей коэкспрессии или мета-программ, деконволюции клеточного состава, позиционирования в геноме и т. д.), не только для поздних, но и для наиболее ранних стадий, что дает основания говорить о фенотипической гетерогенности инвазивного РШМ на всем протяжении его прогрессии. Более того, становится очевидным, что, начиная с ранних этапов, иммунная составляющая может играть ведущую

роль в определении его характеристик (например, способности стимулировать инвазию и ангиогенез), но в то же время не может ограничиваться простым делением на иммунологически «горячие» и «холодные» подтипы и не должна рассматриваться в отрыве от других фенотипических свойств в перспективе разработки молекулярной классификации плоскоклеточного РШМ и поиске способов повышения эффективности иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-15-00208.

ЛИТЕРАТУРА

- Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018 : a worldwide analysis. *Lancet Glob Health* (2020) 8 (2) : e191–203. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30482-6.
- Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. ; Cancer Genome Atlas Research Network ; et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* (2018) 48 (4) : 812–830. e14. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.023.
- Bedognetti D, Cesano A, Marincola FM, Wang E. The Biology of Immune-Active Cancers and Their Regulatory Mechanisms. *Cancer Treat Res* (2020) 180 : 149–172. doi: 10.1007/978-3-030-38862-1_5.
- Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* (2019) 18 (3) : 197–218. doi: 10.1038/s41573-018-0007-y.
- Zhao Z, Li J, Li H, Yuan Wu NY, Ou-Yang P, Liu S, et al. Integrative Bioinformatics Approaches to Screen Potential Prognostic Immune-Related Genes and Drugs in the Cervical Cancer Microenvironment. *Front Genet* (2020) 11 : 727. doi: 10.3389/fgene.2020.00727.
- Xu F, Shen J, Xu S. Multi-Omics Data Analyses Construct a Six Immune-Related Genes Prognostic Model for Cervical Cancer in Tumor Microenvironment. *Front Genet* (2021) 12 : 663617. doi: 10.3389/fgene.2021.663617.
- Jou J, Kato S, Miyashita H, Thangathurai K, Pabla S, DePietro P, et al. Cancer immunity marker RNA expression levels across gynecologic cancers : Implications for immunotherapy. *Mol Cancer Ther* (2023) Aug 25 : MCT-23–0270. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-23-0270.
- Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol* (2019) 9 : 682. doi: 10.3389/fonc.2019.00682.
- Jayshree RS. The Immune Microenvironment in Human Papilloma Virus-Induced Cervical Lesions-Evidence for Estrogen as an Immunomodulator. *Front Cell Infect Microbiol* (2021) 11 : 649815. doi: 10.3389/fcimb.2021.649815.
- Budhwani M, Turrell G, Yu M, Frazer IH, Mehdi AM, Chandra J. Immune-Inhibitory Gene Expression is Positively Correlated with Overall Immune Activity and Predicts Increased Survival Probability of Cervical and Head and Neck Cancer Patients. *Front Mol Biosci* (2021) 8 : 622643. doi: 10.3389/fmolb.2021.622643.
- Frenel JS, Le Tourneau C, O'Neil B, Ott PA, Piha-Paul SA, Gomez-Roca C, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab in Advanced, Programmed Death Ligand 1-Positive Cervical Cancer : Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Trial. *J Clin Oncol* (2017) 35 (36) : 4035–4041. doi: 10.1200/JCO.2017.74.5471.
- Chung HC, Ros W, Delord JP, Perets R, Italiano A, Shapira-Frommer R, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer : Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* (2019) 37 (17) : 1470–1478. doi: 10.1200/JCO.18.01265.
- Hou J, Karin M, Sun B. Targeting cancer-promoting inflammation - have anti-inflammatory therapies come of age? *Nat Rev Clin Oncol* (2021) 18 (5) : 261–279. doi: 10.1038/s41571-020-00459-9.
- Fang L, Liu K, Liu C, Wang X, Ma W, Xu W, et al. Tumor accomplice : T cell exhaustion induced by chronic inflammation. *Front Immunol* (2022) 13 : 979116. doi: 10.3389/fimmu.2022.979116.
- Bacolod MD, Barany F, Pilonis K, Fisher PB, de Castro RJ. Pathways- and epigenetic-based assessment of relative immune infiltration in various types of solid tumors. *Adv Cancer Re* (2019) 142 : 107–143. doi: 10.1016/bs.acr.2019.01.003.
- Rafael TS, Rotman J, Brouwer OR, van der Poel HG, Mom CH, Kenter GG, et al. Immunotherapeutic Approaches for the Treatment of HPV-Associated (Pre-) Cancer of the Cervix, Vulva and Penis. *J Clin Med* (2022) 11 (4) : 1101. doi: 10.3390/jcm11041101.
- Livesey M, Rossouw SC, Blignaut R, Christoffels A, Bendou H. Transforming RNA-Seq gene expression to track cancer progression in the multi-stage early to advanced-stage cancer development. *PLoS One* (2023) 18 (4) : e0284458. doi: 10.1371/journal.pone.0284458.
- Gavish A, Tyler M, Greenwald AC, Hoefflin R, Simkin D, Tschernichovsky R, et al. Hallmarks of transcriptional intratumour heterogeneity across a thousand tumours. *Nature* (2023) 618 (7965) : 598–606. doi: 10.1038/s41586-023-06130-4.
- Zhang T, Zhuang L, Muaibati M, Wang D, Abasi A, Tong Q, et al. Identification of cervical cancer stem cells using single-cell transcriptomes of normal cervix, cervical premalignant lesions, and cervical cancer. *EBioMedicine* (2023) 92 : 104612. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104612.
- Li C, Hua K. Single-cell transcriptomics provides insights into the origin and immune microenvironment of cervical precancerous lesions. *Cancer Commun (Lond)* (2023) 43 (9) : 1055–1058. doi: 10.1002/cac2.12451.
- Kang J, Xiang X, Chen X, Jiang J, Zhang Y, Li L, Tang J. Angiogenesis-related gene signatures reveal the prognosis of cervical cancer based on single cell sequencing and co-expression network analysis. *Front Cell Dev Biol* (2023) 10 : 1086835. doi: 10.3389/fcell.2022.1086835.
- Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature* (2014) 506 (7488) : 371–5. doi: 10.1038/nature12881.
- Cancer Genome Atlas Research Network ; Albert Einstein College of Medicine ; Analytical Biological Services ; Barretos Cancer Hospital ; Baylor College of Medicine ; Beckman Research

- Institute of City of Hope ; et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* (2017) 543 (7645) : 378–384. doi: 10.1038/nature21386.
24. Chakravarthy A, Reddin I, Henderson S, Dong C, Kirkwood N, Jeyakumar M, et al. Integrated analysis of cervical squamous cell carcinoma cohorts from three continents reveals conserved subtypes of prognostic significance. *Nat Commun* (2022) 13 (1) : 5818. doi: 10.1038/s41467-022-33544-x.
 25. Litwin TR, Irvin SR, Chornock RL, Sahasrabudhe VV, Stanley M, Wentzensen N. Infiltrating T-cell markers in cervical carcinogenesis : a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* (2021) 124 (4) : 831–841. doi: 10.1038/s41416-020-01184-x.
 26. Lyu X, Li G, Qiao Q. Identification of an immune classification for cervical cancer and integrative analysis of multiomics data. *J Transl Med* (2021) 19 (1) : 200. doi: 10.1186/s12967-021-02845-y.
 27. He C, Ren L, Yuan M, Liu M, Liu K, Qian X, Lu J. Identification of cervical squamous cell carcinoma feature genes and construction of a prognostic model based on immune-related features. *BMC Women's Health* (2022) 22 (1) : 365. doi: 10.1186/s12905-022-01942-4.
 28. Li C, Wu H, Guo L, Liu D, Yang S, Li S, Hua K. Single-cell transcriptomics reveals cellular heterogeneity and molecular stratification of cervical cancer. *Commun Biol* (2022) 5 (1) : 1208. doi: 10.1038/s42003-022-04142-w.
 29. Lu X, Jiang L, Zhang L, Zhu Y, Hu W, Wang J, et al. Immune Signature-Based Subtypes of Cervical Squamous Cell Carcinoma Tightly Associated with Human Papillomavirus Type 16 Expression, Molecular Features, and Clinical Outcome. *Neoplasia* (2019) 21 (6) : 591–601. doi: 10.1016/j.neo.2019.04.003.
 30. Li Y, Lu S, Wang S, Peng X, Lang J. Identification of immune subtypes of cervical squamous cell carcinoma predicting prognosis and immunotherapy responses. *J Transl Med* (2021) 19 (1) : 222. doi: 10.1186/s12967-021-02894-3.
 31. Lai W, Liao J, Li X, Liang P, He L, Huang K, Liang X, Wang Y. Characterization of the microenvironment in different immune-metabolism subtypes of cervical cancer with prognostic significance. *Front Genet* (2023) 14 : 1067666. doi: 10.3389/fgene.2023.1067666.
 32. Øvestad IT, Engesæter B, Halle MK, Akbari S, Bicskei B, Lapin M, et al. High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Associates with Increased Proliferation and Attenuated Immune Signaling. *Int J Mol Sci* (2021) 23 (1) : 373. doi: 10.3390/ijms23010373.
 33. Halle MK, Munk AC, Engesæter B, Akbari S, Frafjord A, Hoivik EA, et al. A Gene Signature Identifying CIN3 Regression and Cervical Cancer Survival. *Cancers (Basel)* (2021) 13 (22) : 5737. doi: 10.3390/cancers13225737.
 34. Jeon M, Xie Z, Evangelista JE, Wojciechowski ML, Clarke DJB, Ma'ayan A. Transforming L1000 profiles to RNA-seq-like profiles with deep learning. *BMC Bioinformatics* (2022) 23 (1) : 374. doi: 10.1186/s12859-022-04895-5.
 35. Wang Y, He M, Zhang G, Cao K, Yang M, Zhang H, Liu H. The immune landscape during the tumorigenesis of cervical cancer. *Cancer Med* (2021) 10 (7) : 2380–2395. doi: 10.1002/cam4.3833.
 36. Li C, Hua K. Dissecting the Single-Cell Transcriptome Network of Immune Environment Underlying Cervical Premalignant Lesion, Cervical Cancer and Metastatic Lymph Nodes. *Front Immunol* (2022) 13 : 897366. doi: 10.3389/fimmu.2022.897366.
 37. Kurmyshkina OV, Dobrynin PV, Kovchur PI, Volkova TO. Sequencing-based transcriptome analysis reveals diversification of immune response- and angiogenesis-related expression patterns of early-stage cervical carcinoma as compared with high-grade CIN. *Front Immunol* (2023) 14 : 1215607. doi: 10.3389/fimmu.2023.1215607.
 38. Wang X, Xu C, Sun H. DNA Damage Repair-Related Genes Signature for Immune Infiltration and Outcome in Cervical Cancer. *Front Genet* (2022) 13 : 733164. doi: 10.3389/fgene.2022.733164.
 39. Wen H, Guo QH, Zhou XL, Wu XH, Li J. Genomic Profiling of Chinese Cervical Cancer Patients Reveals Prevalence of DNA Damage Repair Gene Alterations and Related Hypoxia Feature. *Front Oncol* (2022) 11 : 792003. doi: 10.3389/fonc.2021.792003.
 40. Liu C, Zhang M, Yan X, Ni Y, Gong Y, Wang C, et al. Single-cell dissection of cellular and molecular features underlying human cervical squamous cell carcinoma initiation and progression. *Sci Adv* (2023) 9 (4) : eadd8977. doi: 10.1126/sciadv.add8977.
 41. Zhou L, Qiu Q, Zhou Q, Li J, Yu M, Li K, et al. Long-read sequencing unveils high-resolution HPV integration and its oncogenic progression in cervical cancer. *Nat Commun* (2022) 13 (1) : 2563. doi: 10.1038/s41467-022-30190-1.
 42. De Nola R, Loizzi V, Cicinelli E, Cormio G. Dynamic crosstalk within the tumor microenvironment of uterine cervical carcinoma : baseline network, iatrogenic alterations, and translational implications. *Crit Rev Oncol Hematol* (2021) 162 : 103343. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103343.
 43. Kori M, Arga KY, Mardinoglu A, Turanli B. Repositioning of Anti-Inflammatory Drugs for the Treatment of Cervical Cancer Sub-Types. *Front Pharmacol* (2022) 13 : 884548. doi: 10.3389/fphar.2022.884548.