

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2023
УДК 616-006.6
DOI 10.37469/0507-3758-2023-69-1-74-81

Вопросы онкологии, 2023. Том 69, № 1

А.П. Соколенко^{1,2}, А.О. Иванцов¹, Т.В. Городнова¹, Х.Б. Котив¹, И.В. Бизин¹,
Е.Н. Имянитов^{1,2,3}

Иммунное микроокружение в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности: ассоциация с молекулярными характеристиками и ответ на стандартную неоадьювантную терапию

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург,

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, Санкт-Петербург,

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Введение. Эффект химиотерапии на опухоль не ограничивается механистическим взаимодействием между противоопухолевым препаратом и трансформированной клеткой. Воздействие цитостатических препаратов провоцирует целый спектр изменений в иммунном микроокружении.

Цель исследования. Проанализировать профиль экспрессии иммунных и воспалительных молекул, а также выраженность воспалительной инфильтрации в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности, которые подвергались стандартной платиносодержащей неоадьювантной химиотерапии, и сопоставить результаты молекулярного и морфологического анализа с клиническим ответом на лечение.

Материалы и методы. В исследование включено 36 пациенток, которые получали стандартную комбинацию паклитаксела и карбоплатина в качестве предоперационной терапии. Образцы РНК из первичных хемонаивных опухолей (n=25) и постоперационных остаточных тканей (n=28) были проанализированы методом таргетного РНК-секвенирования с использованием панели Human Inflammation and Immunity Transcriptome QIAseq Targeted RNA Panel (Qiagen, USA). Оценка иммуновоспалительной инфильтрации выполнена с использованием балльной системы от 0 до 3 (0 — нет инфильтрации, 1 — минимальная инфильтрация, 2 — фокальная инфильтрация, 3 — распространенная инфильтрация). 107 первичных и резидуальных карцином были доступны для сопоставления типа мутации *TP53* и выраженности инфильтрации. Анализ мутаций *TP53* выполнялся методом высокопроизводительного секвенирования. Еще

38 первичных карцином яичника были подвергнуты таргетному секвенированию с использованием панели SeqCap EZ CNV/LOH Backbone Design для анализа нарушений копийности хромосом и построения профилей хромосомной нестабильности.

Результаты. Выраженность лимфоцитарной инфильтрации в опухолях до и после неоадьювантной терапии не коррелировала с клиническим ответом на комбинацию паклитаксела и карбоплатина. В хемонаивных карциномах с высоким содержанием лимфоцитов наблюдалась гиперэкспрессия мРНК *CD3E*, *CXCL13*, *LYZ*, *CCL5*, *CD27*, *CD3D*, *IL2RG*, *CD2* и *SELL*. В остаточных послеоперационных тканях с высокой лимфоцитарной инфильтрацией были повышены уровни мРНК *CCL18*, *CXCL13*, *CD27*, *LYZ*, *RUNX3* и *SELL*. В хемонаивных опухолях с миссенс-мутациями *TP53*, по сравнению с другими мутациями, достоверно чаще наблюдалась высокая лимфоцитарная инфильтрация. Эффект типа мутации *TP53* на выраженность инфильтрации усиливался в контексте хромосомной нестабильности: во всех карциномах, характеризовавшихся хромосомной нестабильностью non-BRCAness типа и с не-миссенс-мутациями, инфильтрация отсутствовала или была очень слабой (p=0.03).

Заключение. Профиль мРНК иммунных и воспалительных молекул позволяет дифференцировать опухоли с высокой и низкой лимфоцитарной инфильтрацией; результаты исследования свидетельствуют о возможной роли p53 в иммунном микроокружении.

Ключевые слова: иммунное микроокружение, лимфоцитарная инфильтрация, мутация *TP53*, неоадьювантная терапия, рак яичника, транскрипционный профиль

Для цитирования: Соколенко А.П., Иванцов А.О., Городнова Т.В., Котив Х.Б., Бизин И.В., Имянитов Е.Н. Иммунное микроокружение в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности: ассоциация с молекулярными характеристиками и ответ на стандартную неоадьювантную терапию. *Вопросы онкологии.* 2023;69(1):74-81. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-1-74-81

Введение

Иммунное микроокружение — это важный компонент опухолевого роста. Иммунный контекст — состав и выраженность иммунного и воспалительного инфильтрата, а также спектр секретируемых иммунокомпетентными клетками молекул, оказывают непосредственное влияние на формирование первичного опухолевого очага и на его метастатическое распространение [1].

Ответ иммунной системы на присутствие опухолевых клеток имеет множество позитивных и негативных регуляторов. При этом негативные регуляторы не только позволяют опухолевым клеткам избегать иммунной атаки, но и, в определённой степени, могут способствовать прогрессии онкологического заболевания [2].

С точки зрения иммуноморфологии опухоли могут быть классифицированы как «hot» (горячие) — инфильтрированные CD8⁺-лимфоцитами и CD4⁺-клетками и экспрессирующие молекулы иммунных контрольных точек, и «cold» (холодные) — в строме которых практически не обнаруживаются опухоль-инфильтрирующие лимфоциты. Источником неоантигенов в новообразованиях являются соматические мутации. Опухоли с выраженной мутационной нагрузкой, например, MSI-положительные карциномы, традиционно считаются высокоиммуногенными и хорошо отвечающими на ингибиторы контрольных точек [3]. Существенная доля серозных карцином яичника высокой степени злокачественности (high-grade serous ovarian carcinomas, HGSOCs) характеризуется недостаточностью гомологичной рекомбинации. Этот тип нарушений ДНК-репарации сопровождается выраженной хромосомной нестабильностью, а подобные опухоли потенциально высокоиммуногенны. Показано, что содержание CD8⁺-лимфоцитов в HGSOC положительно коррелирует с более благоприятным течением заболевания. До 30% BRCA1-ассоциированных карцином яичника характеризуются выраженной CD8⁺-инфильтрацией [4]. Тем не менее, эффективность собственно иммунотерапии при HGSOCs остается невысокой.

В литературе представлены данные, что системная цитостатическая терапия может моди-

фицировать иммунный профиль опухоли, например, стимулировать экспрессию PD-L1 [5]. Действительно, эффект химиотерапии на опухоль не ограничивается механистическим взаимодействием между противоопухолевым препаратом и трансформированной клеткой. Показано, что воздействие цитостатических препаратов провоцирует целый спектр изменений в иммунном микроокружении [6]. Подобные дополнительные эффекты могут носить как благоприятный (например, увеличение антигенной нагрузки при клеточной гибели), так и нежелательный (например, иммуносупрессия из-за снижения количества активно пролиферирующих иммунокомпетентных клеток) характер. Более того, различные комбинации цитостатиков обладают разным иммуномодулирующим эффектом: в частности, в карциномах яичника наиболее благоприятный иммунологический профиль формировался при лечении стандартной схемой паклитаксел плюс карбоплатин [7].

В данном исследовании мы проанализировали профиль экспрессии иммунных и воспалительных молекул и выраженность воспалительной инфильтрации в карциномах яичника высокой степени злокачественности, которые подвергались стандартной платиносодержащей неоадьювантной химиотерапии (НАХТ), и сопоставили его с ответом на лечение.

Материалы и методы

Таргетный анализ мРНК в первичных и резидуальных серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности. Для анализа иммунного и воспалительного транскрипционного профиля были использованы архивные гистологические образцы опухолевых тканей 36 пациенток с HGSOCs. Таргетному высокопроизводительному РНК-секвенированию было подвергнуто 53 образца. 25 образцов были представлены первичными хемонаивными опухолями, которые были получены при трепан-биопсии или диагностической лапароскопии; еще 28 образцов были представлены постоперационными тканями после завершения неоадьювантного этапа лечения. Все пациентки в качестве первой линии химиотерапии получали стандартную комбинацию паклитаксела и карбоплатина. Для анализа профилей экспрессии мРНК в опухолевом микроокружении была использована панель Human Inflammation and Immunity Transcriptome QIAseq Targeted RNA Panel (Qiagen), которая включает 475 генов, вовлеченных в различные аспекты иммунного ответа и воспаления.

Для экстракции РНК использовали набор PureLink™ FFPE Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, USA). Микродиссекции подвергался весь участок опухоли в пределах инвазивного края. 400 нг РНК, обработанной ДНКазой, использовали для подготовки библиотек кДНК в соответствии с протоколом производителя [https://geneglobe.qiagen.com/product-groups/qiaseq-targeted-rna-panels]. Протокол включал следующие шаги: синтез кДНК, молекулярное баркодирование («мечение» уникальных молекул РНК индивидуальной последовательностью) и амплификацию со специфическими праймерами, индексирование образцов. Наличие молекулярных баркодов позволяет удалить

дубликаты, возникающие в ходе обогащения матрицы методом амплификации. Готовые обогащенные библиотеки кДНК секвенировали на приборе NextSeq 500 в режиме single-read по 150 п.о. со средним количеством прочтений на образец 6,5 млн. Первичная биоинформатическая обработка и вторичный анализ выполнялись в облачном сервисе GeneGlobe Data Analysis Center (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze/>).

Анализ мутаций TP53 в первичных и резидуальных серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности. Для анализа мутаций TP53 было доступно 107 опухолевых образцов. Первичные карциномы яичника, полученные до начала терапии, (n=44) и постоперационные образцы остаточных опухолевых тканей (n=63) были подвергнуты таргетному высокопроизводительному секвенированию кодирующей последовательности гена TP53 как описано в [8].

Анализ профилей соматических нарушений копийности (CNA). Оценка копийности участков хромосом методом ACNV (Allelic Copy Number Variation, Genome Analysis Tool Kit) была выполнена в 38 первичных карциномах. Для этого ДНК-библиотеки обогащали с использованием панели зондов SeqCap EZ CNV/LOH Backbone Design (Roche), которые покрывают частые однонуклеотидные полиморфные локусы через каждые 50 Kb. Подход к идентификации CNA включает следующие шаги: на первом этапе анализа отбирают гетерозиготные локусы с высоким качеством прочтений (GT > 98, QUAL > 300) в образце нормы, далее в образце соответствующей опухоли определяют MAF (minor allele fraction) для каждого из локусов. Разделение генома опухоли на сегменты осуществляется на основании глубины прочтения и величины MAF с использованием команд PerformAlleleFractionSegmentation и AllelicCNV. Это позволяет построить диаграммы (команда PlotACNVResults), отображающие участки с изменением копийности относительно панели норм для каждой из хромосом. Для определения относительной доли генома, демонстрирующей LOH (loss-of-heterozygosity, потерю гетерозиготности), использовался перечень сегментов со значениями MAF_Post_Mode. В частности сегменты делили на два кластера с помощью kmeans и протяженность кластера с наименьшим центром MAF, далее сравнивался с общей протяженностью всех сегментов. Профили хромосомной нестабильности были разделены на два типа — BRCAness и non-BRCAness в соответствии с критериями, изложенными А.Р. Sokolenko и соавт. [8].

Анализ клинико-морфологических характеристик. Данные экспрессионных профилей были дополнены анализом воспалительной инфильтрации: эта характеристика

оценивалась в первичных и резидуальных карциномах в соответствии с рекомендациями [9]. В данной работе предложена балльная система оценки от 0 до 3, где 0 соответствует отсутствию признака, 1 — минимальному проявлению, 2 — фокальным изменениям, а 3 — выраженным изменениям. Баллы 0 и 1 мы рассматривали как низкий уровень инфильтрации, 2 и 3 как высокий. Примеры воспалительной инфильтрации различной степени выраженности приведены на рис. 1. Воспалительный инфильтрат был представлен, главным образом, лимфоцитами. Следует отметить, что этот показатель не является эквивалентом TILs (tumor-infiltrating lymphocytes), так как отражает не только присутствие лимфоцитов в опухолевых фокусах, но и в окружающей строме. Мы сопоставили выраженность воспалительной инфильтрации до и после неоадьювантной терапии и проанализировали следующие аспекты: 1) есть ли дифференциально-экспрессирующиеся молекулы в первичных хемонаивных и резидуальных карциномах с сильной и слабой воспалительной инфильтрацией; 2) есть ли дифференциально-экспрессирующиеся иммунные и воспалительные транскрипты в первичной опухоли у пациенток с более благоприятным клиническим течением (группа хорошего ответа) и пациенток, у которых эффективность неоадьювантной терапии была низкой (группа плохого ответа). Распределение пациенток в группы хорошего и плохого ответа на терапию осуществляли как описано в публикации А.Р. Sokolenko и соавт. (2021) [8].

Все пациентки, включенные в исследование, предоставили информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования. Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (протокол №1 от 23.01.2020).

Статистические сравнения. Для анализа дифференциальной экспрессии и построения диаграмм Volcano были использованы ресурсы сервиса GeneGlobe Data Analysis Center (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze/>). Для нормализации применен алгоритм DESeq2 [10]. Сравнения частот проводились с использованием точного критерия Фишера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

Результаты

Таргетное секвенирование мРНК позволяет дифференцировать опухоли с высокой и низкой лимфоцитарной инфильтрацией. Используя таргетное высокопроизводительное секвенирование РНК, мы проанализировали профиль экспрессии иммунных и воспалительных молекул

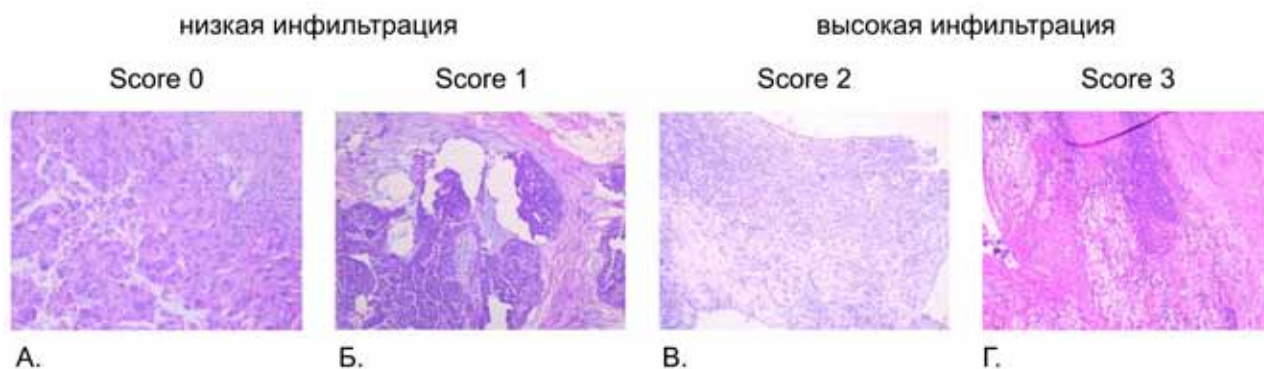


Рис. 1. Высокая и низкая лимфоцитарная инфильтрация в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности. А. Инфильтрация отсутствует (0 баллов в соответствии с [9]). Б. Минимальная инфильтрация (1 балл в соответствии с [9]). В. Фокальная инфильтрация (2 балла в соответствии с [9]). Г. Выраженная диффузная инфильтрация (3 балла в соответствии с [9])

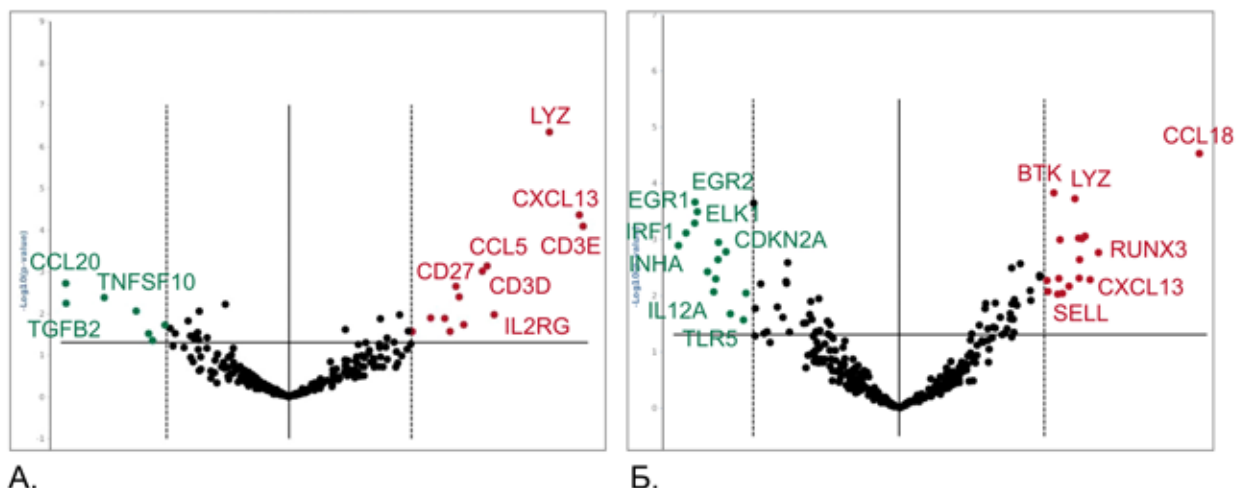


Рис. 2. Диаграммы Volcano дифференциальной экспрессии мРНК иммунных и воспалительных молекул в хемонаивных (А) и резидуальных (Б) карциномах яичника с низкой и высокой лимфоцитарной инфильтрацией (нормализация DESeq2). Красным цветом обозначены гены, экспрессия которых увеличена в инфильтрированных опухолях, зеленым — экспрессия которых снижена

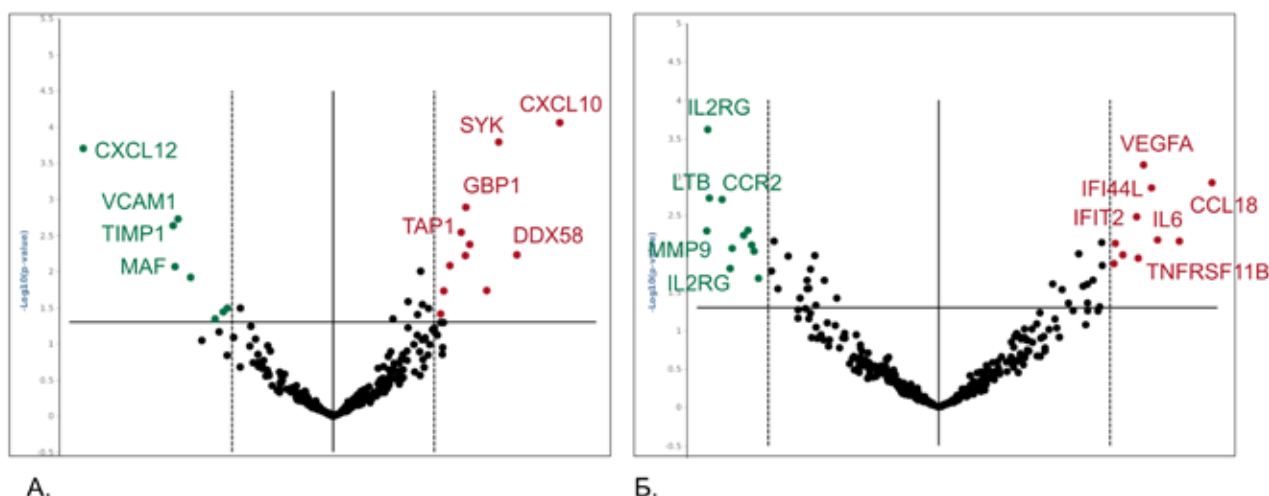


Рис. 3. Диаграммы Volcano дифференциальной экспрессии мРНК иммунных и воспалительных молекул в хемонаивных (А) и резидуальных (Б) карциномах с выраженной инфильтрацией у пациенток с хорошим и плохим ответом на стандартную терапию. Красным цветом обозначены гены, экспрессия которых увеличена в опухолях пациенток с хорошим ответом, зеленым — экспрессия которых снижена. Указаны транскрипты со значением $p < 0.01$

Таблица 1. Частота высокой лимфоцитарной инфильтрации в первичных хемонаивных карциномах в зависимости от статуса BRCAness и типа мутации TP53

	Не-миссенс-мутации TP53	Миссенс-мутации TP53	P (точный критерий Фишера)
BRCAness (n = 23)	3/11 (27%)	7/12 (58%)	0.21
Non-BRCAness (n = 15)	0/6 (0%)	6/9 (66%)	0.03

и выраженность воспалительной инфильтрации в опухоли. Так в хемонаивных опухолях (n=25) с выраженной воспалительной инфильтрацией, по сравнению с опухолями с низкой инфильтрацией, наблюдалась гиперэкспрессия следующих молекул: CD3E, CXCL13, LYZ, CCL5, CD27, CD3D, IL2RG, CD2 и SELL.

Такой же анализ был выполнен и в резидуальных карциномах после НАХТ (n=28). Часть транскриптов, ассоциированных с выраженной инфильтрацией, была представлена идентичными с первичной опухолью молекулами: CXCL13,

CD27, LYZ, SELL. В остаточных тканях было также обнаружено различие в уровне экспрессии CCL18 и RUNX3. Соответствующие диаграммы Volcano представлены на рис. 2.

Профиль экспрессии мРНК иммунных и воспалительных молекул и ответ на стандартную цитотоксическую терапию. Мы сопоставили уровни транскриптов иммунного микроокружения в опухолях с выраженной инфильтрацией от пациенток с хорошим и плохим ответом на НАХТ. При этом в первичных

хемонаивных опухолях наибольшие отличия в экспрессии наблюдались для CXCL10, SYK, DDX58, CXCL12 и TIMP1 (рис. 3А). В остаточных тканях — для CCL18 (гиперэкспрессирован в опухолях с хорошим ответом) и IL2RG (экспрессия подавлена в карциномах с хорошим ответом) (рис. 3Б). При этом достоверная корреляция между выраженностью воспалительной инфильтрации и эффективностью НАХТ, которая оценивалась по совокупности патоморфологического регресса, клинического ответа и продолжительности бесплатинового интервала, отсутствовала.

Мутации TP53, BRCAness и воспалительная инфильтрация. Степень воспалительной инфильтрации была сопоставлена с типом мутаций TP53 (миссенс- vs. не-миссенс). Так в хемонаивных карциномах до лечения с миссенс-мутациями TP53 чаще наблюдалась фокальная или распространенная инфильтрация (2 и 3 балла соответственно), в то время как в опухолях с не-миссенс-мутациями TP53 воспалительная инфильтрация была слабая или отсутствовала [14/25 (56%) vs. 5/19 (26%); $p=0.05$]. При сравнении уровней транскриптов TP53 в опухолях до лечения (хемонаивных), содержание мРНК TP53 было достоверно выше в карциномах с миссенс-мутациями, чем с не-миссенс [$p=0.000043$]. Мы также оценили выраженность инфильтрации в контексте хромосомной нестабильности. Так во всех карциномах яичника, характеризовавшихся хромосомной нестабильностью non-BRCAness типа и с не-миссенс-мутациями, инфильтрация отсутствовала или была очень слабой ($p=0.03$; табл. 1).

Обсуждение

В данной работе представлены результаты транскрипционного анализа иммунных и воспалительных молекул в первичных карциномах яичника, полученных до начала системной цитотоксической терапии и после ее завершения. В хемонаивных карциномах до начала лечения с выраженной лимфоцитарной инфильтрацией наблюдалась экспрессия CD3E, CXCL13, LYZ, CCL5, CD27, CD3D, IL2RG, CD2 и SELL. Подобный профиль дифференциально-экспрессирующихся молекул отражает присутствие в опухоли преимущественно Т-лимфоцитов. Так CD3E и CD3D — это маркеры Т-лимфоцитов, CD2 — маркер Т-клеток и натуральных киллеров (NK), CD27 — ко-стимулирующий иммунный чекпойнт, экспрессирующийся на эффекторных Т-клетках и NK-клетках. CXCL13 также экспрессируется на Т-клетках и является хемоаттрактантом для В-клеток. Высокий уровень мРНК CXCL13 в

карциномах яичника ассоциирован с присутствием CXCR5+CD8+ Т-лимфоцитов [11]. CCL5 (RANTES) экспрессируется различными иммунными и неиммунными клетками; в некоторых исследованиях обнаружены высокая корреляция экспрессии этой молекулы с присутствием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, в том числе CD8+ Т-клеток, активированных CD4 Т-клеток и NK-клеток [12]. LYZ (лизозим) — гликозил-гидролаза, продуцируемая макрофагами и нейтрофилами. SELL (CD62L) — это селектин, обеспечивающий маргинацию лейкоцитов. При анализе остаточных тканей с высокой и низкой инфильтрацией было также обнаружено различие в уровне экспрессии CCL18 и RUNX3. CCL18 — это хемокин, продуцируемый макрофагами M2 типа и, по мнению ряда авторов, обладающий толерогенным эффектом и способностью стимулировать опухолевую прогрессию [13]. RUNX3 — опухолевый супрессор, транскрипционный фактор, сверхэкспрессия которого ассоциирована с присутствием лимфоцитарной инфильтрации [14].

При сравнении первичных хемонаивных карцином пациенток с хорошим и плохим ответом на терапию было обнаружено, что в карциномах из группы хорошего ответа увеличена экспрессия CXCL10, SYK и DDX58 и снижена экспрессия TIMP1 и CXCL12. CXCL10 — это один из ключевых хемокинов, который привлекает в опухоль CXCR3+ CD8+ Т-лимфоциты и тем самым опосредует противоопухолевый эффект [15]. В отношении тирозинкиназы SYK в литературе представлены различные данные о роли этой молекулы в патогенезе злокачественного роста и влияния на микроокружение [16]. Ее про-онкогенные или опухоль-супрессорные функции носят, по-видимому, тканеспецифический характер [17]. Гиперэкспрессия еще одного фактора DDX58/RIG1 ассоциирована с выраженным противоопухолевым ответом за счет активации эффекторов врожденного иммунитета (например, натуральных киллеров) и привлечения и прайминге клеток адаптивного иммунитета [18]. CXCL12 относится к числу хемокинов, которые могут стимулировать опухолевый рост и метастазирование [19]. Выраженность воспалительной инфильтрации *per se* не коррелировала с эффективностью НАХТ, которая оценивалась по совокупности патоморфологического регресса, клинического ответа и продолжительности бесплатинового интервала; это соответствует данным, представленным в пионерской работе [9]. Тем не менее этот аспект заслуживает дальнейшего исследования с уточнением, какие компоненты иммунного инфильтрата, иммуностимулирующие или иммуносупрессорные, преобладают в том или ином случае.

Мы не обнаружили статистически значимых различий в уровнях мРНК PD-L1 (*CD274*) в хемонаивных и остаточных опухолях пациенток с хорошим и плохим ответом на НАХТ. Это противоречит результатам, представленным в исследовании [20]; в данной работе наблюдалось достоверное, хотя и слабое отличие (менее чем в два раза) в представленности транскриптов PD-L1 в группах с хорошими и плохими отдаленными результатами терапии. Примечательно, что уровни мРНК также коррелировали со статусом мутаций *BRCA2*. Однако стоит отметить, что в нашем исследовании при определении дифференциально-экспрессирующихся генов мы использовали cut-off >2.

Мутации *TP53* — это патогномичное молекулярное событие в карциномах яичника и практически единственное значимое в этом типе новообразований в контексте анализа микромутаций (точковых мутаций и небольших делеций/инсерций). Принципиально мутации *TP53* можно разделить на две структурно-функциональные группы: loss-of-function (инсерционно-делеционные сиквенсные вариации, нонсенс-мутации и сплайсинговые) и gain-of-function (миссенс-мутации). Карциномы, в которых обнаруживаются мутации этих типов, отличаются по уровню иммуногистохимической экспрессии p53. Миссенс-мутанты, как правило, характеризуются большей стабильностью и проявляются выраженной ИГХ экспрессией. Loss-of-function мутанты во многих случаях демонстрируют негативное ИГХ-окрашивание [21]. Таким образом, можно предположить, что миссенс-мутанты p53 могут стимулировать иммунное микроокружение и формирование воспалительной инфильтрации как неоантигены либо за счет нарушения иммунной регуляции вследствие новых gain-of-function эффектов. Еще более выраженным эффект типа мутаций *TP53* на степень воспалительной инфильтрации становился в контексте профиля хромосомной нестабильности. Так в опухолях с немиссенс-мутациями и фенотипом non-BRCAness инфильтрация отсутствовала или была слабой.

Заключение

Таким образом, мы показали, что профиль мРНК иммунных и воспалительных молекул позволяет отличить опухоли с высокой и низкой лимфоцитарной инфильтрацией. Необходимо отметить, что сама по себе выраженность лимфоцитарной инфильтрации без уточнения клеточных субпопуляций, по-видимому, не является предиктивным фактором в отношении эффективности стандартной терапии. Напротив, анализ представленности отдельных транскриптов может оказаться пригодным для прогнози-

рования непосредственных исходов системной терапии.

Кроме того, результаты этой работы могут стать поводом для дальнейших исследований роли p53 в иммунном микроокружении и его предиктивного значения для иммунотерапии в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности.

Вклад авторов

Соколенко А.П. — разработка концепции научной работы, получение и анализ данных, составление черновика рукописи;

Иванцов А.О. — разработка концепции научной работы, получение и анализ данных;

Городнова Т.В. — разработка концепции научной работы, получение и анализ данных;

Котив Х.Б. — получение данных;

Бизин И.В. — анализ данных;

Имянитов Е.Н. — критический пересмотр рукописи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа поддержана грантом РФФИ [19-75-10062].

This work was supported by the Russian Science Foundation [grant no. 19-75-10062].

ЛИТЕРАТУРА

1. Binnewies M, Roberts EW, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541-550. doi:10.1038/s41591-018-0014-x.
2. Man Y, Stojadinovic A, Mason J, et al. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *J Cancer.* 2013;4:84-95. doi:10.7150/jca.5482.
3. Xiao Y, Freeman GJ. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov.* 2015;5:16-8. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1397.
4. Goode EL, Block MS, Kalli KR, et al. Dose-response association of CD8+ Tumor-infiltrating lymphocytes and survival time in high-grade serous ovarian cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3:e173290. doi:10.1001/jamaoncol.2017.3290.
5. Mesnage SJL, Auguste A, Genestie C, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). *Ann Oncol.* 2017;28:651-657. doi:10.1093/annonc/mdw625.
6. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell.* 2015;28(6):690-714. doi:10.1016/j.ccell.2015.10.012.
7. Vankerckhoven A, Baert T, Riva M, et al. Type of chemotherapy has substantial effects on the immune sys-

- tem in ovarian cancer. *Transl Oncol.* 2021;14(6):101076. doi:10.1016/j.tranon.2021.101076.
8. Sokolenko AP, Gorodnova TV, Bizin IV, et al. Molecular predictors of the outcome of paclitaxel plus carboplatin neoadjuvant therapy in high-grade serous ovarian cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;88(3):439-450. doi:10.1007/s00280-021-04301-6.
 9. Sassen S, Schmalfeldt B, Avril N, et al. Histopathologic assessment of tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in advanced-stage ovarian cancer. *Hum Pathol.* 2007;38(6):926-34. doi:10.1016/j.humpath.2006.12.008.
 10. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
 11. Yang M, Lu J, Zhang G, et al. CXCL13 shapes immunosuppressive tumor microenvironment and enhances the efficacy of PD-1 checkpoint blockade in high-grade serous ovarian cancer. *J Immunother Cancer.* 2021;9(1):e001136. doi:10.1136/jitc-2020-001136.
 12. Araujo JM, Gomez AC, Aguilar A, et al. Effect of CCL5 expression in the recruitment of immune cells in triple negative breast cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):4899. doi:10.1038/s41598-018-23099-7.
 13. Cardoso AP, Pinto ML, Castro F, et al. The immunosuppressive and pro-tumor functions of CCL18 at the tumor microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021;60:107-119. doi:10.1016/j.cytogfr.2021.03.005.
 14. Milner JJ, Toma C, Yu B, et al. Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature.* 2017;552(7684):253-7. doi:10.1038/nature24993.
 15. Zumwalt TJ, Arnold M, Goel A, et al. Active secretion of CXCL10 and CCL5 from colorectal cancer microenvironments associates with GranzymeB+ CD8+ T-cell infiltration. *Oncotarget.* 2015;6(5):2981-91. doi:10.18632/oncotarget.3205.
 16. Krisenko MO, Geahlen RL. Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(1):254-63. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.10.022.
 17. Fueyo J, Alonso MM, Parker Kerrigan BC, et al. Linking inflammation and cancer: the unexpected SYK world. *Neuro Oncol.* 2018;20(5):582-583. doi:10.1093/neuonc/nyo036.
 18. Elion DL, Cook RS. Harnessing RIG-I and intrinsic immunity in the tumor microenvironment for therapeutic cancer treatment. *Oncotarget.* 2018;9(48):29007-29017. doi:10.18632/oncotarget.25626.
 19. Shi Y, Riese DJ, Shen J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in cancer. *Front Pharmacol.* 2020;11:574667. doi:10.3389/fphar.2020.574667.
 20. Weberpals JI, Pugh TJ, Marco-Casanova P, et al. Tumor genomic, transcriptomic, and immune profiling characterizes differential response to first-line platinum chemotherapy in high grade serous ovarian cancer. *Cancer Med.* 2021;10(9):3045-3058. doi:10.1002/cam4.3831.
 21. Hwang HJ, Nam SK, Park H, et al. Prediction of TP53 mutations by p53 immunohistochemistry and their prognostic significance in gastric cancer. *J Pathol Transl Med.* 2020;54(5):378-386. doi:10.4132/jptm.2020.06.01.

Поступила в редакцию 24.08.2022
 Прошла рецензирование 04.11.2022
 Принята в печать 22.12.2022

A.P. Sokolenko^{1,2}, A.O. Ivantsov¹, T.V. Gorodnova¹,
 Kh.B. Kotiv¹, I.V. Bizin¹, E.N. Imyanitov^{1,2,3}

Immune microenvironment in high-grade serous ovarian carcinomas: association with molecular profiles and neoadjuvant therapy outcome

¹N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation,
²Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, the Russian Federation,
³I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, the Russian Federation

Introduction. The effect of chemotherapy is not limited to direct interaction between a given drug and tumor cells. In fact, cytostatic drugs induce a wide range of changes in the tumor immune microenvironment.

Aim. The research aims to analyze the expression profile of genes involved in immune regulation and inflammatory response; to evaluate the extent of inflammatory infiltration in high-grade serous ovarian carcinomas after the standard platinum-containing neoadjuvant chemotherapy; and to compare the results of molecular and morphological analysis with the clinical response to the treatment.

Materials and methods. The study involved 36 female patients who received a standard combination of paclitaxel and carboplatin as preoperative therapy. RNA from 25 primary tumor samples collected before the chemotherapy and from 28 postoperative residual tissues taken after the completion of neoadjuvant treatment were analyzed. The analysis was performed using the Human Inflammation and Immunity Transcriptome QIAseq Targeted RNA Panel (Qiagen, USA). In addition, lymphocytic infiltration was evaluated using the four-tier system (0 — no infiltration, 1 — minimal infiltration, 2 — focal occurrence, 3 — wide-spread occurrence). TP53 mutation types and levels of immune infiltration were compared in 107 primary and residual carcinomas. TP53 mutations were analyzed by the next-generation sequencing. 38 primary ovarian carcinomas were subjected to targeted DNA sequencing using the SeqCap EZ CNV/LOH Backbone Design panel. It allowed to analyze copy number alterations and build up chromosome instability profiles.

Results. The extent of lymphocytic infiltration observed before or after chemotherapy did not correlate with clinical response to paclitaxel and carboplatin therapy. CD3E, CXCL13, LYZ, CCL5, CD27, CD3D, IL2RG, CD2 and SELL genes were upregulated in chemo-naïve tumors with high content of lymphocytes. Increased expression of CCL18, CXCL13, CD27, LYZ, RUNX3 and SELL genes was observed in postsurgical tumor tissues with high lymphocyte infiltration. The frequency of increased lymphocyte infiltration was higher in chemo-naïve tumors with TP53 missense mutations compared to lesions with non-missense alterations. TP53 mutations had a stronger impact on the extent of infiltration in the context of chromosomal instability. All carcinomas with non-BRCAness profile and non-missense mutations had no or low infiltration ($p = 0.03$).

Conclusion. Targeted mRNA profiling of immune/inflammation-related genes allows to identify carcinomas with high and low lymphocytic infiltration. The results of the study indicate a possible role of p53 in the tumor immune microenvironment.

Keywords: immune microenvironment, lymphocytic infiltration, TP53 mutation, neoadjuvant therapy, ovarian cancer, transcriptional profile

For citation: Sokolenko AP, Ivantsov AO, Gorodnova TV, Kotiv KhB, Bizin IV, Imyanitov EN. Immune microenvironment in high-grade serous ovarian carcinomas: association with molecular profiles and neoadjuvant therapy outcome. *Voprosy Onkologii.* 2023;69(1):74-81. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-1-74-81

Сведения об авторах

Соколенко Анна Петровна, канд. мед. наук, науч. сотр. научной лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, доцент кафедры общей и молекулярной медицинской генетики, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 68; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6304-1609>, annasokolenko@mail.ru.

Иванцов Александр Олегович, д-р. мед. наук, науч. сотр. научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 68; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6279-2312>, ivantsovalalexandr81@gmail.com.

Городнова Татьяна Васильевна, канд. мед. наук, науч. сотр. отделения онкогинекологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 68; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1719-7498>, t.gorodnova@mail.ru.

Котив Христина Богдановна, канд. мед. наук, науч. сотр. отделения онкогинекологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 68; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0486-2404>, kotiv.onc@gmail.com.

Бизин Илья Валерьевич, канд. тех. наук, науч. сотр. научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 68; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6279-2312>, bizin@yandex.ru.

Имянитов Евгений Наумович, д-р. мед. наук, проф., чл.-кор. РАН, зав. научным отделом биологии опухолевого роста ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, зав. кафедрой общей и молекулярной медицинской генетики, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, проф. кафедры онкологии ФГБОУ «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава РФ, 174644, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 68; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4529-7891>, evgeny@imyanyitov.spb.ru.

Sokolenko Anna Petrovna, MD, PhD (Med.), Research Fellow, Laboratory of Molecular Oncology, Department of Tumor Biology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology; Docent, Department of Clinical Genetics, Saint Petersburg Pediatric Medical University; 68 Leningradskaya str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758, annasokolenko@mail.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6304-1609>.

Ivantsov Aleksandr Olegovich, MD, PhD (Med.), Research Fellow, Department of Pathomorphology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758, ivantsovalalexandr81@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6279-2312>.

Gorodnova Tatyana Vasilyevna, MD, PhD (Med.), Research Fellow, Department of Oncogynecology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758, t.gorodnova@mail.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1719-7498>.

Kotiv Khristina Bogdanovna, MD, PhD (Med.), Research Fellow, Department of Oncogynecology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758, kotiv.onc@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0486-2404>.

Bizin Ilya Valeryevich, MD, PhD (Tech.), Research Fellow, Laboratory of Molecular Oncology, Department of Tumor Biology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758, bizin@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6279-2312>.

Imyanitov Yevgeny Naumovich, MD, DSc (Med.), Prof., Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Tumor Biology, N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, Head of the Department of Medical Genetics, Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Prof. of the Department of Oncology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University; 68 Leningradskaya str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758, evgeny@imyanyitov.spb.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4529-7891>.