

РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ И КЛЕТочНЫЕ МОДЕЛИ ВИРУС-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2022.14.1.07

УДК 616–006.52+616–07:004.891.3

Поступила 10.07.2021 г.



О.В. Курмышкина, к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных, патофизиологии, гистологии Медицинского института¹;

А.А. Богданова, аспирант лаборатории экологической биохимии Института биологии²;

П.И. Ковчур, д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии, ЛОР-болезней, офтальмологии, стоматологии, онкологии, урологии Медицинского института¹;

А.И. Фетюков, д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной хирургии, ЛОР-болезней, офтальмологии, стоматологии, онкологии, урологии Медицинского института¹;

Т.О. Волкова, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института¹

¹Петрозаводский государственный университет, пр. Ленина, 33, Петрозаводск, 185910;

²Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910

Обобщены результаты исследований, опирающихся на применение технологий транскриптомного анализа к современным клеточным модельным системам рака, ассоциированного с вирусом папилломы человека — ВПЧ (рака шейки матки, опухолей головы и шеи). Рассматривается многообразие трехмерных моделей рака, таких как сфероиды, органоиды (органотипические культуры), экспланты, мышинные ксенографты. Особое внимание уделено использованию биоматериала пациентов для получения временных культур первичных опухолевых клеток, а также созданию многокомпонентных (гетероклеточных) систем, включающих наравне с опухолевым компонентом элементы его микроокружения. Обсуждается ряд уникальных биологических свойств ВПЧ-индуцированных опухолей, которые делают получение клеточных моделей весьма незаурядной задачей.

Для каждого варианта модельных систем приведены новейшие обнаружения в области молекулярных механизмов возникновения и прогрессии ВПЧ-зависимого рака, сделанные с помощью РНК-секвенирования. Эти обнаружения рассматриваются в прикладном аспекте — с точки зрения открывающихся возможностей для доклинического тестирования новых препаратов, персонализированной диагностики и подбора индивидуальных, наиболее эффективных схем лечения. Рассмотрены вопросы формирования лекарственной устойчивости, молекулярно-клеточной гетерогенности, эпигенетического перепрограммирования, роли стромального микроокружения. Акцентируются проблемы, связанные с ограничениями применимости той или иной модельной системы. Отмечаются направления, по которым наблюдается существенное отставание омиксных исследований по вирус-ассоциированному раку в сравнении с другими типами онкопатологий, и возможные причины этого отставания. Обозначены также перспективы будущего развития модельных систем ВПЧ-ассоциированных опухолей в области высокотехнологичной тканевой инженерии, в частности применение биопечати и микрофлюидных биочипов. Сочетание данных технологий с методами полногеномного профилирования позволит существенно увеличить трансляционный потенциал описываемых модельных клеточных систем.

Ключевые слова: вирус-ассоциированный рак; вирус папилломы человека; РНК-секвенирование; транскриптом; клеточные 3D-модели; культура первичных раковых клеток; опухолевое микроокружение.

Как цитировать: Kurmyshkina O.V., Bogdanova A.A., Kovchur P.I., Fetyukov A.I., Volkova T.O. RNA sequencing and cell models of virus-associated cancer (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(1): 64, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.1.07>

Для контактов: Волкова Татьяна Олеговна, e-mail: VolkovaTO@yandex.ru

RNA Sequencing and Cell Models of Virus-Associated Cancer (Review)

O.V. Kurmyshkina, PhD, Associate Professor, Department of Human and Animal Physiology, Pathophysiology, Histology, Medical Institute¹;

A.A. Bogdanova, PhD Student, Laboratory of Ecological Biochemistry, Institute of Biology²;

P.I. Kovchur, MD, DSc, Professor, Department of Hospital Surgery, ENT Diseases, Ophthalmology, Dentistry, Oncology, Urology, Medical Institute¹;

A.I. Fetyukov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Hospital Surgery, ENT Diseases, Ophthalmology, Dentistry, Oncology, Urology, Medical Institute¹;

T.O. Volkova, DSc, Professor, Head of the Department of Biomedical Chemistry, Immunology and Laboratory Diagnostics, Medical Institute¹

¹Petrozavodsk State University, 33 Lenin Avenue, Petrozavodsk, 185910, Russia;

²Federal Research Center "Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences", 1 Pushkinskaya St., Petrozavodsk, 185910, Russia

The review summarizes findings from the studies based on the application of technologies for transcriptome analysis to modern cellular model systems of human papillomavirus-associated cancer (HPV) (cervical cancer, head and neck tumors). A diversity of three-dimensional cancer models, such as spheroids, organoids (organotypic cultures), explants, mouse xenografts, are addressed. Particular attention is paid to the use of patient-derived biomaterial for establishing short-term cultures of primary tumor cells, as well as generating multicomponent (heterocellular) systems that comprise, together with the tumor component, other elements of its microenvironment. A number of unique biological properties of HPV-induced neoplasia are discussed, which make generating cell models a unique task.

The novel findings in the field of molecular mechanisms of the onset and progression of HPV-associated cancer achieved by using RNA sequencing are presented for each variant of the model systems. These findings are considered in regard to applied aspects of their use, in terms of the opportunities for preclinical testing of new drugs, personalized diagnostics and selection of individual, most effective treatment regimens. The issues of drug resistance development, molecular-cellular heterogeneity, epigenetic reprogramming, and the role of the stromal microenvironment are reviewed. The paper accentuates the problems related to the limitations of the applicability of a particular model system. The areas with a significant lagging behind in omics research of virus-associated cancer in comparison with other types of oncological pathology and possible causes of this lag are noted. The future prospects for the development of model systems of HPV-associated tumors in the field of high-tech tissue engineering, in particular, the use of bioprinting and microfluidic biochips, are also outlined. The combination of these techniques with the methods of whole genome profiling will significantly increase the translational potential of the described model cell systems.

Key words: virus-associated cancer; human papillomavirus; RNA sequencing; transcriptome; 3D cell models; primary cancer cell culture; tumor microenvironment.

Введение

Технология РНК-секвенирования (RNA-sequencing, RNA-Seq) внесла большой вклад в развитие транскриптомных и в целом омиксных исследований злокачественных опухолей различного гистологического типа и этиологии, включая группу вирус-ассоциированных заболеваний, из которых существенную долю составляют опухоли, вызванные вирусом папилломы человека (ВПЧ). Предоставляемая RNA-Seq возможность сравнивать транскриптомы операционных образцов дает неосцимемо важную информацию о таких явлениях и процессах, как геномная нестабильность, клеточная и молекулярная гетерогенность, противоопухолевый и противовирусный иммунный ответ, иммунное истощение, фенотипическая пластичность и множественная резистентность. Тем не менее во многих исследованиях *in vitro* и *in vivo* по-прежнему незаменимы клеточные

модели опухолей человека, и тогда цели и дизайн исследования предполагают применение RNA-Seq к модельной системе. В свою очередь широкое внедрение RNA-Seq и других вариантов высокопроизводительного секвенирования способствует развитию и видоизменению самих опухолевых моделей [1].

За последние 5–7 лет технология RNA-Seq стала рутинным методом анализа клеток опухолевых линий, растущих в традиционной двухмерной (2D) культуре, при каком-либо экспериментальном воздействии. В то же время понимание оторванности процессов, протекающих в модельной системе, которая основана на стандартных, генетически гомогенных клеточных линиях, от реальной физиологической ситуации побуждает к разработке более сложных систем. Большинство «классических» опухолевых линий, полученных десятилетиями назад, не имеют полной клинической аннотации, и даже их аутентичность сегодня часто подвергается

сомнению. Учитывая также, что любая клеточная линия представляет собой клон всего лишь одной родоначальной клетки, оказавшейся наиболее адаптированной к росту в искусственной культуре, становится понятным, почему в настоящее время в отношении многих известных опухолевых линий ставится вопрос, отражают ли они в принципе характеристики исходной онкопатологии, способны ли воспроизводить все ее генетическое и/или фенотипическое многообразие и могут ли быть использованы для трансляционных исследований и решения задач персонализированной медицины [1, 2].

Развитие моделирования солидных опухолей человека ведется по следующим основным направлениям (рис. 1):

- 1) уход от монослоя к созданию трехмерных (3D) моделей;
- 2) отказ от генетически однородных клеточных линий в пользу временных культур первичных клеток, полученных от пациентов;
- 3) использование гетероклеточных систем (ко-культур), включающих различные компоненты опухолевого микроокружения.

Наиболее сложные из имеющихся на сегодняшний день моделей созданы как бы на точке пересечения данных направлений и представляют собой трехмерные системы, сконструированные из первичных клеток различного типа.

Интенсивное внедрение технологий тканевой инженерии и появление новых клеточных моделей [3–7] можно наблюдать и в отношении локализаций, наиболее часто ассоциированных с вирусным канцерогенезом: в первую очередь это рак шейки матки (РШМ) и часть опухолей головы и шеи (ОГШ). Вследствие этого мы задались вопросом, используется ли и насколько широко метод RNA-Seq в экспериментах с

усовершенствованными модельными системами ВПЧ-ассоциированного (ВПЧ(+)) рака.

Цель обзора опубликованных по данному вопросу исследований — понять, каков тот уникальный пласт информации о ВПЧ-зависимом канцерогенезе, который получен с помощью RNA-Seq клеточных моделей РШМ и ОГШ, и в каких моментах наблюдается отставание в развитии данного направления относительно других типов опухолей эпителиального происхождения.

Опухоли, вызываемые ВПЧ высокого онкогенного риска, отличаются своей анатомической локализацией, возникая в области миндалин и их крипт, стенки глотки, корня и основания языка, мягкого неба, составляя 20–30% плоскоклеточных карцином головы и шеи, а также в области шейки матки (ее переходной зоны) и ряда других участков аногенитальной области. Гистологически источником развития ВПЧ(+) опухолей являются клетки многослойного плоского эпителия, выстилающего поверхность слизистых оболочек. Необходимо сразу отметить, что сама этиология ВПЧ-зависимого рака, в том числе его связь со строго определенными эпителиальными сайтами, создает существенные трудности в получении тканеподобных клеточных моделей [8]. Исследователи подчеркивают, что для ВПЧ(+) опухолей до сих пор отсутствуют адекватные доклинические модельные системы [9]. Действительно, в ходе анализа литературы мы столкнулись с очевидным недостатком экспериментальных работ по моделям ВПЧ-ассоциированных РШМ/ОГШ по сравнению с другими типами рака, например опухолями женской репродуктивной системы (раком яичников, эндометрия) или ВПЧ-независимыми ОГШ. Еще меньше исследований, в которых модельные системы ВПЧ-ассоциированных РШМ/ОГШ используются для профилирования изменений транскриптома с помощью RNA-Seq.

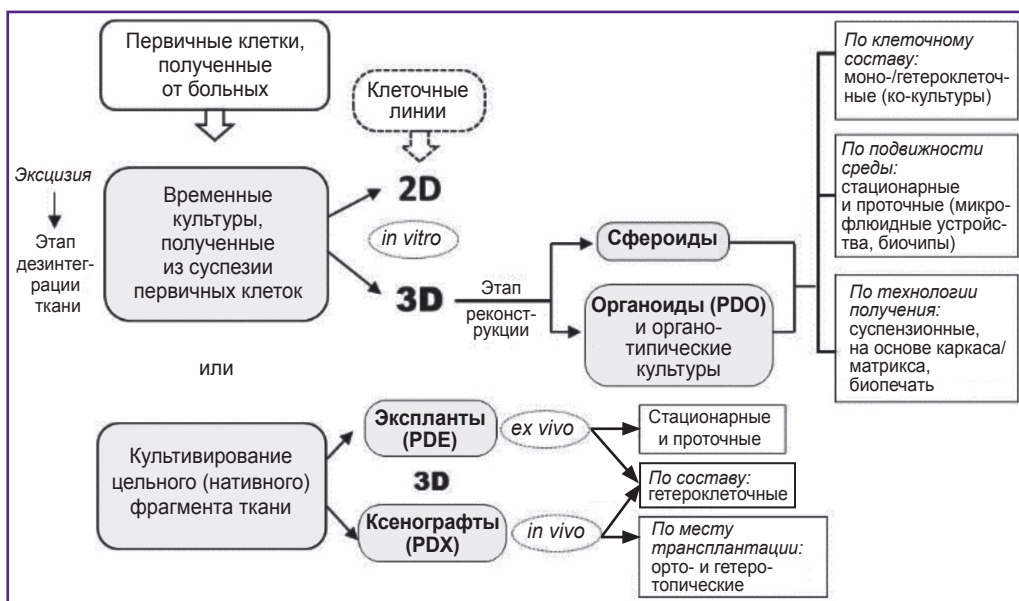
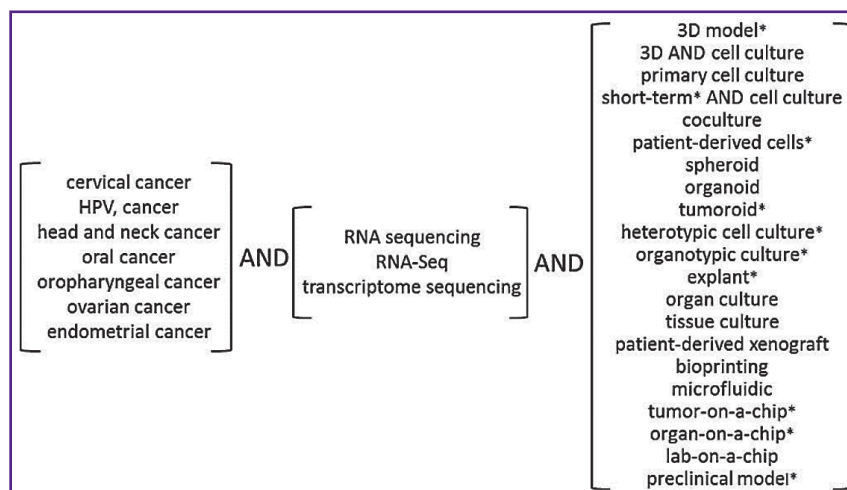


Рис. 1. Разнообразие клеточных моделей солидных опухолей человека

Рис. 2. Схема использованных поисковых фильтров:

каждый поисковый запрос представлял собой сочетание трех терминов, по одному из каждой группы, во всех возможных комбинациях (* — не индексируется в MeSH (www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh))



Представленный обзор не ставил задачи проведения строгого систематического анализа опубликованных данных, тем не менее методология отбора литературы включала некоторые его элементы. Электронный поиск публикаций был осуществлен с помощью базы данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) по трем группам терминов (рис. 2): первая группа определяла тип рака, вторая давала указание на транскриптомный анализ, третья — на вид клеточной модели. В результатах поиска учитывались статьи, представляющие оригинальные исследования с наличием англоязычных полных текстов или аннотаций, в том случае, если в них давалось однозначное указание на метод анализа транскриптома, клеточную популяцию, используемую для моделирования, и источник ее получения.

По итогам анализа был определен ряд критериев исключения публикаций из обзора. Во-первых, мы не рассматривали работы, в которых RNA-Seq и получение клеточной модели представляли независимые этапы. Во-вторых, в круг рассмотрения не вошли работы, в которых проводился анализ изменений транскриптома клеток-мишеней после их обработки кондиционированной средой другой культуры или отдельными ее фракциями; хотя дизайн таких исследований часто определяется как косвенное со-культивирование, однако он исключает прямые межклеточные взаимодействия. По схожей причине в обзоре не представлены исследования, в которых из материала первичной опухоли извлекаются отдельные клеточные популяции и после сортировки сразу направляются на получение транскриптомных библиотек; в данном случае отсутствует этап создания клеточной модели и культивирования. В-третьих, в обзор не были включены работы с использованием сингенных мышинных моделей вирус-ассоциированного канцерогенеза, а также трансгенных по ВПЧ мышинных линий. В-четвертых, не являлись объектом нашего рассмотрения исследования, основанные на различных генно-инженерных манипуляциях с клетками стандартных линий. При выборе источника используемых для разработки мо-

дельной системы клеток особое внимание было обращено на первичные клетки, выделенные из биопсийного (или операционного) материала больных.

Краткосрочные (временные) 2D-культуры первичных клеток

Монокультуры ВПЧ(+) эпителиальных опухолевых клеток. Как отмечено на рис. 1, получение временной культуры первичных клеток включает этап дезинтеграции внеклеточного матрикса в образце опухолевой или здоровой ткани, после чего полученные в виде суспензии клетки можно отсортировать по фенотипу и поместить на специальном образом обработанную поверхность и в культуральную среду для образования монослоя. В исследовании T.F. Hayes и соавт. [10] на примере большой панели образцов плоскоклеточной карциномы ротовой полости с помощью экзомного секвенирования показано, что именно краткосрочные поликлональные культуры первичных клеток на ранних (2–4-м) пассажах наиболее точно воспроизводят мутационный профиль и, самое главное, молекулярную гетерогенность донорской ткани. Однако получение краткосрочных культур первичных клеток, равно как и новых клеточных линий ВПЧ(+), сопряжено с достаточно большими сложностями (низкий выход и быстрое старение культуры — одни из наиболее частых проблем), в связи с чем, например, ВПЧ(+) линий рака ротоглотки значительно меньше, чем ВПЧ(–) линий ОГШ [2, 11]. Очевидно, что причина лежит в жесткой облигатной зависимости ВПЧ(+) опухолевых клеток от специфических факторов микроокружения, которые в значительной степени остаются неизвестными и поэтому не могут быть воспроизведены *in vitro* [2]. Специфичным для РШМ обстоятельством, осложняющим получение клеточных моделей, является источник его развития, в качестве которого могут выступать кератиноциты многослойного плоского эпителия (эктоцервикс), однослойного железистого эпителия (эндоцервикс) и разделяющей их зоны

трансформации (метапластические клетки). Каждая из этих популяций может требовать особых протоколов культивирования [12].

Другим фактором, потенциально влияющим на жизнеспособность ВПЧ(+) клеток *in vitro*, может служить наличие молекулярных подтипов, различающихся частотой и местом интеграции вирусного генома и, соответственно, частотой мутаций, экспрессией генов эпителиальных, мезенхимальных и иммунных сигнатур. Вся эта совокупность причин может служить объяснением факта очень незначительного, по сравнению с другими типами опухолей, количества работ по первичным культурам ВПЧ(+) рака, в особенности РШМ [2]. Принимая данный факт во внимание, нельзя не вспомнить серию исследований, основанных на использовании нормальных первичных эпителиальных клеток (спонтанно или направленно immortalized), выделенных из различных источников, в том числе из экто- или эндоцервикса, разных участков ротовой полости, глотки и гортани, а также эмбриональных или неонатальных тканей. Применение RNA-Seq к культурам таких клеток, трансфицированных ВПЧ-генами, внесло значительный вклад в понимание молекулярных основ биологии ВПЧ при продуктивной инфекции, а также существенно расширило знания о механизмах ВПЧ-зависимого канцерогенеза (табл. 1).

В применении к первичным монокультурам опухолевых клеток РШМ/ОГШ геномное секвенирование ДНК/РНК (в том числе экзомное секвенирование, или WES) сегодня является необходимым видом анализа

при получении новой опухолевой клеточной линии — для ее полной молекулярной аутентификации и подтверждения гистологической принадлежности [22]. RNA-Seq используется для анализа профиля экспрессируемых мутаций и определения на основе транскриптома принадлежности клеток полученной линии к одному из известных для данного типа рака молекулярных подтипов, как это было продемонстрировано в работе M.Z. Fadlullah и соавт. [23] при получении новой панели 16 линий ВПЧ(+) и ВПЧ(-) плоскоклеточного рака из различных участков ротовой полости. Однако если в данном виде работ секвенирование используется преимущественно как вспомогательный метод — для создания «портрета» новой линии, то в ряде других исследований WES и RNA-Seq первичных культур направлено на решение фундаментальных вопросов. К сожалению, в отношении РШМ это направление фактически не разработано: можно привести одно исследование [24], в котором на материале 15 ВПЧ(+) первичных клеточных линий от пациенток с РШМ выполнено геномное профилирование, но только на уровне экзома, для установления мутационного профиля.

В отношении ОГШ обнаруживается немного больше публикаций данной направленности. Например, исследование E.F. Pirrotte и соавт. [11] нацелено на выяснение причин, лежащих в основе различий клинической картины ВПЧ(+) и ВПЧ(-) ОГШ, а именно чувствительности к радиотерапии и ряду таргетных препаратов (как известно, ВПЧ(+) ОГШ в основном более восприимчивы к радиоизлучению и имеют бо-

Т а б л и ц а 1

Результаты RNA-Seq-профилирования нормальных эпителиальных клеток человека при их взаимодействии с вирусом папилломы человека

Источник	Клетки/линии	Основной результат
[13]	Спонтанно immortalized неонатальные эпидермальные кератиноциты (NIKS)	Охарактеризован спектр сигнальных путей, перепрограммируемых в клетке-«хозяине» (кератиноците) под действием ВПЧ-онкогенов E6 и E7 и в зависимости от жизненного цикла ВПЧ (инфекция продуктивная или непродуктивная, трансформирующая)
[14]	Спонтанно immortalized неонатальные эпидермальные кератиноциты (NIKS)	
[15]	Первичные нормальные эпидермальные кератиноциты (NHEKs)	
[16]	SV40 Т-антиген-immortalized эмбриональные клетки почек (HEK293T)	
[17]	hTERT-immortalized кератиноциты ротовой полости (NOKs)	Описана функция неонкогенных ВПЧ-белков в нормальном жизненном цикле
[18]	Первичные неонатальные эпидермальные кератиноциты (HEKa)	Расшифрован ВПЧ-регулируемый профиль длинных некодирующих РНК (lncRNA-транскриптом)
[19]	Выделенная из ЦИН1 спонтанно immortalized линия кератиноцитов CIN612-9E (содержит эписомную форму ВПЧ 31)	Выявлены механизмы взаимодействия ВПЧ с интерфероновой системой клеток-«хозяев»
[20]	Линия ВПЧ-immortalized нормальных экто- (Ect1/E6E7) и эндоцервикальных (End1/E6E7) эпителиоцитов	Охарактеризована роль геномных перестроек (на примере образования химерных генов) в пертурбациях транскриптома, приводящих к трансформации и канцерогенезу
[21]	Первичные клетки нормального плоского эпителия гортани (TVC-культура) и ВПЧ-immortalized линия TVC-HPVE6/E7	Описан вклад физико-химических условий среды в повышение вероятности злокачественной трансформации

Здесь: ЦИН1 — цервикальные интраэпителиальные неоплазии I степени.

Таблица 2

Результаты RNA-Seq-профилирования резистентных фенотипов, полученных путем направленной селекции «родительских» клеток стандартных опухолевых линий

Источник	Клетки/ линии	Действующий агент (их комбинация)	Основной результат
[25]	РШМ (HeLa/DDP)	Цисплатин	Ключевая роль PI3K/AKT-зависимого пути
[26]	ОГШ (CAL27 и SCC9)	Цисплатин + 5-фторурацил	Ведущая роль Hedgehog-пути в активации системы ABC-транспортеров и обеспечении множественной лекарственной устойчивости
[27]	ОГШ (SCC25)	Цетуксимаб	Важность отсроченной во времени эпигенетической стабилизации резистентного в отношении EGFR-ингибиторов фенотипа
[28]	ОГШ (SCC1, SCC6, SCC25)	Цетуксимаб	
[29]	ОГШ (CAL33 и CAL27)	Протонное излучение	Роль VEGF-C-зависимых механизмов в формировании устойчивости
[30]	ОГШ (CAL27)	Аноикис	Ведущая роль VEGF-зависимых механизмов

лее благоприятный прогноз). Авторы предположили, что связанные с ВПЧ-статусом различия в состоянии системы репарации ДНК определяют различия в чувствительности к PARP-ингибиторам. Для проверки предположения использована панель из 8 ВПЧ(+) и ВПЧ(-) линий ОГШ, две из которых были получены посредством культивирования эксплантных образцов и представляли ВПЧ(+) тонзиллярный рак. Результат RNA-Seq анализа оказался весьма неожиданным: между ВПЧ(+) и ВПЧ(-) линиями не было установлено достоверных различий в экспрессии генов, отвечающих за репарацию одно-/двухцепочечных разрывов, азотистых оснований, компонентов АРОВЕС- и р53-зависимого ответа и собственно фактора PARP1. В отношении PARP-ингибитора олапариба клетки разных линий действительно демонстрировали различия в чувствительности, но они не были ассоциированы ни с ВПЧ-статусом, ни с уровнем экспрессии PARP1, что убеждает в необходимости поиска дополнительных маркеров, позволяющих спрогнозировать чувствительность или резистентность ОГШ к PARP-ингибиторам. E.F. Pirotte и соавт. [11] отмечают, что основа различий клинико-патологических проявлений ВПЧ(+) и ВПЧ(-) ОГШ, вероятнее всего, кроется в особенностях иммунного ответа, нежели в системе ДНК-репарации или р53-зависимого апоптоза.

Культуры первичных клеток как модели формирования лекарственной устойчивости. В важнейшем вопросе о формировании опухолевой резистентности исследования с вовлечением культур первичных опухолевых клеток пациентов начинают играть не последнюю роль ввиду открывающейся возможности установить все многообразие естественных механизмов, которые на клиническом уровне приводят к одному результату — лекарственной устойчивости, но требуют разных подходов для ее преодоления. Тем не менее до сих пор изучение причин развития резистентности РШМ/ОГШ проводилось, как правило, на стандартных опухолевых линиях. Нужно сказать, что даже в этом случае получение резистентных клонов включает этап эволюции клеток под давлением повышающихся концентраций химического агента и

поэтому носит вероятностный характер, а клеточные популяции с новым устойчивым фенотипом могут быть генетически гетерогенны. RNA-Seq анализ резистентных сублиний позволяет очертить круг возможных причин, формирующих невосприимчивость к цитотоксической или таргетной терапии на уровне транскриптома, а также выявить фенотипически значимые мутации.

Особый интерес в настоящее время вызывают механизмы адаптации, которые реализуются во времени через поэтапное транскриптомное перепрограммирование и составляют основу эпигенетической пластичности опухолевых клеток. В практическом отношении такие *in vitro* эксперименты позволяют обнаружить новые потенциальные биомаркеры резистентности, которые далее можно ретроспективно проанализировать на большом числе транскриптомных профилей опухолевых образцов, хранящихся в базе TCGA (The Cancer Genome Atlas: <https://portal.gdc.cancer.gov>), и извлечь таким образом некий объем клинически значимой информации (табл. 2 содержит выборку исследований по данному вопросу).

Хотя опухолевые клеточные линии предоставляют фактически неограниченные возможности варьирования экспериментальных условий, в культуре первичных опухолевых клеток тоже можно моделировать развитие устойчивого фенотипа. Например, в исследовании J.L. Low и соавт. [31] проводился сравнительный RNA-Seq-анализ трех клеточных линий, полученных от пациентов с ОГШ и оказавшихся чувствительными к гефитинибу (низкомолекулярному тирозинкиназному ингибитору 1-го поколения), и изогенных резистентных линий. Оказалось, что приобретенная *in vitro* устойчивость вовсе не связана с геномными нарушениями, в частности изменениями в структуре гена *EGFR*, а развивается на фенотипическом уровне через масштабные изменения транскриптомного профиля, в особенности через активацию экспрессии генов эпителиально-мезенхимального превращения (ЭМП) и интерферон-зависимого ответа. Это влечет за собой устойчивость к EGFR-ингибиторам 2-го и 3-го поколения и может являться одной из причин низкой

эффективности данных препаратов против EGFR(+) ОГШ в клинических испытаниях.

В целом проблема развития лекарственной резистентности связана с проблемой внутриопухолевой гетерогенности и клональной эволюции. Залогом выживания опухолевых клеток под давлением селективного фактора является их фенотипическое разнообразие, которое, как предполагается, может достигаться путем реализации двух стратегий [27, 31, 32]. Первая основывается на принципе «дарвиновской эволюции» и подразумевает предсуществование в исходной опухоли генетически разнородных клеточных популяций, из которых выживают (получают пролиферативное преимущество) наиболее приспособленные к данному фактору. В основе второй, альтернативной, стратегии лежит принцип адаптивной эволюции — расширение фенотипического разнообразия в исходно генетически гомогенной популяции, индуцированное селективным давлением среды [32]. В первом случае механизм генерации клонального разнообразия ВПЧ(+) РШМ/ОГШ известен — он является следствием нарушенного функционирования генов-онкосупрессоров (например, ВПЧ-онкогены *E6* и *E7* инактивируют белки p53 и pRb клеток «хозяина», в результате чего эти клетки могут приобретать мутаторный фенотип). Предлагаемый для второй стратегии механизм заключается в глобальном перепрограммировании транскриптома клеток в составе опухоли [32]. Данный способ связан с новыми представлениями об эпигенетической/транскрипционной пластичности, т.е. способности опухолевых клеток, находящихся в метастабильном состоянии, переходить в *de novo* фенотипические состояния и закреплять их без внесения генетических изменений («фенотипическое переключение»). Очевидно, обе эти стратегии реализуются в ходе естественной опухолевой прогрессии, но доказать их совместный вклад в приобретение резистентности на уровне целой опухоли можно только через анализ одиночных клеток в модельной системе.

Проверке данной гипотезы посвящено исследование A. Sharma и соавт. [32], которое было выполнено с помощью технологии секвенирования транскриптома одиночных клеток (single-cell RNA-Seq, scRNA-Seq) на материале первичных культур, полученных из терапевтически «наивных» образцов плоскоклеточного рака ротовой полости. В исходно гетерогенной культуре исследователям удалось обнаружить редкую популяцию клеток с транскриптомным профилем, отражающим предсуществующую резистентность к цисплатину, и далее наблюдать постепенную экспансию этой популяции в присутствии цисплатина. В то же время в исходно фенотипически гомогенной культуре была зафиксирована стресс-индуцированная трансдифференцировка клеток, сопряженная с изменением экспрессии ряда эпителиальных/мезенхимальных маркеров и возникновением нового цисплатин-резистентного фенотипа. Авторы также проследили закрепление сформированной устойчивости на протя-

жении не менее 20 пассажей культивирования после удаления цисплатина, что указывало на вовлечение эпигенетических механизмов регуляции. Переход в новое состояние был вызван «переключением» между дифференцировочными программами, запускаемыми транскрипционными мастер-регуляторами SOX2 и SOX9. Оба этих транскрипционных фактора рассматриваются сегодня как маркеры стволовых клеток, а по результатам проведенного A. Sharma и соавт. [32] исследования SOX2 оказался еще и маркером эпигенетической пластичности опухолевых клеток. Клиническую значимость выявленных в модельной системе закономерностей авторы подтвердили тем, что зарегистрировали аналогичные изменения в очагах вторичного опухолевого роста у тех же самых больных после пройденного ими курса цисплатиновой терапии. Эти результаты побуждают задуматься о том, что разные стратегии выживания опухолевых клеток могут требовать разных подходов к диагностике и лечению.

Культуры первичных опухолевых клеток как тест-системы ответа на терапию. Если рассматривать практический аспект применения культур первичных опухолевых клеток, следует отметить, что модели на их основе помогают в решении нескольких задач. Во-первых, они используются в прикладных фармакогеномных исследованиях: при установлении детерминант чувствительности к лекарственным препаратам; при поиске новых молекулярных мишеней, которые позволяли бы обходить сформировавшуюся лекарственную устойчивость; при апробации новых препаратов или новых их комбинаций. Во-вторых, первичные культуры находят применение как доклинические клеточные модели для оценки индивидуального ответа на препарат и прогнозирования эффективности лечения. Роль RNA-Seq в работах по данным направлениям увеличивается, поскольку ДНК-секвенирование и получение мутанома опухоли не всегда могут указать на вероятный эффект действия какого-либо таргетного препарата. Связь между мутациями и функционированием белковых мишеней таких препаратов часто непрямо и трудно прослеживаемая, особенно в случае ВПЧ(+) рака с его большим разнообразием низкочастотных мутаций. Кроме того, далеко не все функциональные группы генов и их мутаций поддаются таргетированию.

Это обстоятельство иллюстрирует исследование L. Zammataro и соавт. [24], в котором были получены 15 первичных клеточных линий ВПЧ(+) РШМ и на ранних пассажах проведено секвенирование их экзона. Далее на основе профиля геномных нарушений для каждой линии был выбран и протестирован таргетный препарат. Большинство выявленных мутаций затрагивало путь ERBB2/PI3K/AKT/mTOR, однако для образцов с мутантным геном *PI3KCA* селективный PI3K-ингибитор копанлисиб показал низкую активность на культурах первичных клеток. Отсюда следует, что, хотя *PI3KCA* — это наиболее часто мутируемый ген при плоскоклеточном РШМ (27,1% по данным TCGA

[33]), сам по себе он является слабым драйвером онкогенеза, а его блокировка вызывает активацию компенсаторных механизмов [24]. Исследователями [24] подчеркивается важность профилирования последствий генетических aberrаций на транскриптомном и других уровнях регуляции для установления взаимосвязей с терапевтическим эффектом. Это было продемонстрировано также в работе С. Ху и соавт. [34], в которой для WES и RNA-Seq использовалась культура первичных клеток cisплатин-устойчивого плоскоклеточного рака ротовой полости на ранних пассажах. Анализ геномного профиля клеток, несмотря на высокую мутационную нагрузку, не позволял сделать однозначный терапевтический выбор: большинство генетических событий (точечных мутаций, амплификаций/делеций, перестроек) и даже сверхэкспрессированных генов оказались фенотипически нейтральными, и только функциональный скрининг библиотеками малых интерферирующих РНК помог сузить поиск до счетного количества мишеней, потенциально летальных для опухолевых клеток. Схожий дизайн исследования представлен J.K. Sa и соавт. [35], которые получили коллекцию из более 100 краткосрочных культур первичных опухолевых клеток от пациенток с РШМ, раком яичников и эндометрия. Клеточные культуры обрабатывали линейкой 37 таргетных препаратов, затем их ответ сравнивали с результатами секвенирования экзома и транскриптома клеток в исходной опухоли. Таким образом, RNA-Seq модельных клеточных систем становится необходимой составляющей исследований, направленных на развитие целевого подхода к назначению высокоселективных противоопухолевых препаратов.

Культуры первичных клеток опухолевой стромы. Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) являются основным неиммунным компонентом опухолевого микроокружения. Под влиянием опухолевых клеток нормальные фибробласты могут претерпевать фенотипическое перепрограммирование, так что даже говорят об их злокачественной трансформации, подразумевая приобретение стойкого фенотипа ОАФ. В свою очередь ОАФ продолжают преобразование микроокружения опухоли, усиливая ее агрессивные свойства. Сегодня есть понимание, что ОАФ должны стать одной из мишеней комплексной противоопухолевой терапии, но в случае вирус-ассоциированного РШМ/ОГШ данный вопрос разработан недостаточно. Еще в 2016 г. M.M. Kumar и соавт. [36] было проведено описание транскриптома первичных ОАФ, выделенных из образцов РШМ ранних и поздних стадий и переведенных в культуру, однако в качестве метода анализа использовались гибридационные микрочипы. Аналогичным образом в 2018 г. был проанализирован транскриптом первичных ОАФ из рака ротовой полости [37], причем авторам удалось выявить фенотипическую гетерогенность ОАФ, которая может рассматриваться как составляющая внутриопухолевой гетерогенности. Однако, в отличие от ра-

бот по РШМ, стали появляться публикации по ОГШ, представляющие транскриптомные исследования временных культур ОАФ, выполненные с помощью RNA-Seq. Например, H. Takahashi и соавт. [38] получили от больных с ОГШ культуры ОАФ и нормальных фибробластов и на ранних пассажах провели сравнительный транскриптомный анализ. Ими было обнаружено 13 дифференциально-экспрессированных генов, ассоциированных с иммуносупрессией. В работе [39] метод RNA-Seq использовали для сравнения ОАФ и нормальных фибробластов, полученных в краткосрочной культуре от больных с ОГШ, по профилям экспрессии длинных некодирующих РНК (lncRNA) и их мРНК-мишеней с целью выявить сигнатуры, ассоциированные с трансдифференцировкой фибробластов в ОАФ. Среди дифференциально-экспрессированных генов была обнаружена специфичная для ОАФ активация межгенной lncRNA (LOC400221) и установлена ее связь с экспрессией провоспалительного цитокина IL-33 в опухолевой строме, что служит подтверждением концепции об участии (и, возможно, ведущей роли) ОАФ в поддержании воспалительного микроокружения, способствующего прогрессии опухоли.

Другим важным компонентом стромы опухоли являются эндотелиальные клетки сосудов, которые могут активно участвовать в воспалительных реакциях. В недавней работе T. Lopatina и соавт. [40] из ОГШ IV стадии были выделены опухоль-ассоциированные эндотелиальные клетки и переведены во временную культуру, после чего РНК-содержимое их экстраклеточных везикул было проанализировано методом RNA-Seq. Везикулы оказались обогащены транскриптами, отвечающими за регуляцию воспаления, T-/B-клеточную активацию/иммуносупрессию и контролируемыми TGF- β - и интерлейкин-зависимыми сигнальными путями. Более того, инкубация первичных мезенхимальных клеток-предшественников в присутствии эндотелиальных везикул индуцировала в них изменения транскриптома, соответствующие провоспалительному и иммуносупрессорному фенотипу. Следовательно, не только собственно опухолевые, но и эндотелиальные клетки могут участвовать в распространении проонкогенных сигналов через секрецию везикул и стимулировать перепрограммирование иммунного микроокружения.

Гетероклеточные культуры (ко-культуры). Моделировать непосредственное взаимодействие опухолевых клеток со своим микроокружением возможно посредством сокультивирования. Часто при этом используется сочетание первичных клеток и клеточных линий, чтобы стандартизировать источник воздействия, а изменения в клетках, представляющих объект изучения, регистрируются с помощью различных высокопроизводительных методов. Так, в недавнем исследовании [41] был проведен RNA-Seq-анализ изменений транскриптома нейтрофилов периферической крови здоровых доноров после их кратковременного сокультивирования с клетками HeLa-линии.

Часть нейтрофилов была предварительно обработана резолвином D1 (противовоспалительным регулятором локального действия липидной природы). Полученные данные указывали на участие нейтрофилов, «принструментированных» ВПЧ(+) опухолевыми клетками, в патологических воспалительных реакциях, а обработка противовоспалительным агентом, наоборот, способствовала перепрограммированию фенотипа нейтрофилов на противоопухолевый.

Схожий дизайн исследования представлен в работе [42], где с помощью RNA-Seq оценивали изменения в мононуклеарной фракции крови после сокультивирования с клетками ОГШ-линий.

Модель ко-культуры применяется также для реконструкции взаимоотношений опухолевых клеток с упомянутыми выше первичными мезенхимальными стволовыми клетками. Здесь важно отметить, что влияние этих двух типов клеток действительно является взаимным: с одной стороны, опухолевые клетки способны направлять дифференцировку мезенхимальных клеток, а те, в свою очередь, могут усиливать или ослаблять агрессивные свойства опухолевых клеток. Этому вопросу посвящена работа С. Liu и соавт. [43], в которой были проанализированы изменения транскриптома в клетках ОГШ-линии после их сокультивирования с мезенхимальными клетками костномозгового происхождения. RNA-Seq-анализ показал, что такие опухолевые клетки имеют более высокий уровень экспрессии генов ЭМП и лекарственной устойчивости. Аналогичное исследование было проведено для клеток РШМ (HeLa-линии) и первичных мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани; подтверждено усиление сигнальных путей ЭМП, ангиогенеза и воспаления в HeLa-клетках под действием мезенхимальных клеток [44].

3D-сфероиды (онкосферы, туморосферы)

Сфероидные культуры представляют собой трехмерные агрегаты, в которые клетки самопроизвольно собираются при создании необходимых условий. Если сфероиды обогащены свойствами стволовых опухолевых клеток, они могут называться туморосферами; в этом случае сфероид является клоном родоначальной клетки [2]. Считается, что отдельный сфероид примерно соответствует опухолевому микродомену (микроучастку опухолевой ткани, заключенному между ветвями капиллярной сети), поэтому такая модель лучше воспроизводит физико-химические градиенты и различия в скоростях пролиферации/апоптоза/некроза в пределах одного микроучастка. Как отмечают авторы систематизированных обзоров [45–47], использование сфероидных культур и других 3D-моделей в исследованиях ОГШ/РШМ находится на начальном этапе развития (преимущественно на этапе оптимизации экспериментальных протоколов), при этом область применения клеточных сфероидов ограничивается в основном рутинными видами анализа, в которых спо-

собность клеток к сфероидогенезу рассматривается только как показатель степени выраженности признаков соматических стволовых клеток. Если обратиться к работам, использующим сфероидную культуру именно как модель для воссоздания определенного состояния клеток, которое далее анализируется с помощью RNA-Seq, то можно видеть, что для РШМ сфероиды (цervосферы, *англ.* cervospheres) были получены из стандартных опухолевых линий (HeLa, SiHa, CaSki), но не из первичных клеток больных. Аналогичная ситуация складывается в отношении других ВПЧ-зависимых опухолей. Вероятным объяснением этому служат особенности жизненного цикла ВПЧ, высокая зависимость пролиферации/дифференцировки/выживаемости нормальных и трансформированных кератиноцитов от факторов среды и состава межклеточного матрикса, что в совокупности предопределяет серьезные методологические трудности получения жизнеспособных первичных опухолевых сфероидов [45].

В исследовании S. Yang и соавт. [48] RNA-Seq-анализ был применен к сфероидным культурам клеточных линий ВПЧ 16(+) РШМ (SiHa и CaSki) для выяснения роли E7-онкогена в поддержании стволовых свойств клеток и механизма реализации этого влияния. В другом исследовании [49] с помощью miRNA-Seq было показано, что состав транскриптов в экзоцитозных везикулах HeLa-клеток, растущих в виде 3D-сфероидов, ближе к составу микроРНК везикул, выделенных из плазмы больных, по сравнению с HeLa-клетками, растущими в монослое (2D). Немногочисленные работы, в которых cervосферы или оросферы были получены из первичных клеток пациентов, изучают в основном свойства стволовых опухолевых клеток и роль ВПЧ в их поддержании [5, 50–53]. В целом эти работы указывают на более высокую физиологическую и клиническую релевантность сфероидной модели и, соответственно, на большие перспективы ее как инструмента персонализированной медицины, но метод RNA-Seq в них пока не использовался.

3D-органойды (микроткани, миниатюры органов)

Органойды — это самоорганизующиеся и способные к самоподдержанию *in vitro* многоклеточные структуры, воспроизводящие гистологию и микрофизиологию определенного органа или его части. Как правило, они состоят из клеток, принадлежащих различным дифферонам, являясь «мини-репликами» какой-либо ткани. Эпителиальные органойды могут быть получены не только из злокачественно трансформированных клеток, но и из нормальных эпителиоцитов, позволяя воссоздавать наиболее ранние события канцерогенеза. Конструирование органойда здоровой ткани опирается на активацию пролиферации взрослых соматических стволовых/полустволовых клеток, находившихся в донорской ткани и перемещенных в условия, кото-

рые воспроизводят так называемую нишу. При правильном подборе факторов нишевого микроокружения реализуется внутренняя, автономная способность клеток органоидной культуры к пространственной самоорганизации. Согласно общему мнению, органоиды или органотипические культуры, полученные из клеточного материала пациентов (patient-derived organoids, PDO), являются наиболее оптимальным компромиссом между *in vitro* и *in vivo* системами, сочетая в себе экспериментальную гибкость культуры *in vitro* и комплексность модели *in vivo* [1], и поэтому оцениваются как наиболее перспективные доклинические 3D-модельные системы.

Органоидные культуры нормальной и опухолевой ткани слизистой оболочки шейки матки и ротовой полости. Разными авторами отмечается большая сложность получения органоидной культуры вирус-ассоциированных опухолей, особенно ВПЧ(+) РШМ, поэтому в данной области исследования заметно существенное отставание по сравнению с другими типами рака. Очевидно, что не все требуемые факторы «ниши», специфичные для эпителия шейки матки, известны [54]. Задачу разработки экспериментальной платформы для РШМ и нормального экто-/эндоцервикального эпителия на основе органоидной культуры поставили К. Löhmußsaag и соавт. [55]. В рамках этой работы с помощью RNA-Seq были проанализированы транскриптомные профили образцов здорового эпителия, РШМ и выращенных из них органоидов. Полученные результаты позволили удостовериться, что органоидная культура поддерживает молекулярные характеристики исходной ткани в течение достаточно длительного времени; экто- и эндоцервикальные органоиды и тумороиды действительно имеют разные профили геномной экспрессии; тумороиды сохраняют вирусные последовательности различных ВПЧ-подтипов и обеспечивают их экспрессию.

Также совсем недавно было опубликовано исследование С. Chumhuri и соавт. [54], в котором из биоматериала пациентов были получены органоиды нормального эндо- и эктоцервикса с целью расшифровки механизмов поддержания клеточного гомеостаза переходной зоны между многослойным плоским и однослойным железистым эпителием. Кроме того, авторов интересовали причины и механизмы ремоделирования «ниши» переходной зоны в процессе плоскоклеточной метаплазии, которая часто является предпосылкой к развитию РШМ. Эктоцервикальные органоиды имели многослойную архитектуру с типичной для плоскоклеточного эпителия дифференцировкой слоев, в то время как эндоцервикальные клетки давали полые органоиды с однослойной выстилкой из призматических/столбчатых клеток. Транскриптомный анализ органоидов был проведен с использованием кДНК-микрочипов, а не RNA-Seq, но тем не менее созданная модель позволила сделать ряд клинически значимых выводов. Установлено, что эпителии экто- и эндоцервикса происходят из разных линий

стволовых клеток, причем стволовые клетки обеих линий дифференцировки распределены мозаичным образом. Выбор того, какой из линий будет дан старт пролиферации и дифференцировки в данном конкретном участке шейки матки, определяется микроокружением подлежащей стромы, а именно создаваемыми ею градиентами факторов «ниши». Соответственно, первопричиной ремоделирования зоны трансформации и метаплазии является реорганизация стромального микроокружения. Такие нишевые факторы, специфичные для экто- и эндоцервикальных клеток, были обнаружены. В частности, репрессором эндоцервикальной дифференцировки оказался фактор WNT3A. Сравнительный анализ транскриптомов экто- и эндоцервикальных органоидов на разных сроках культивирования выявил различия в регуляции WNT-зависимой программы, в экспрессии участников сигнального пути Notch и в паттерне цитокератинов (KRT). Наложение транскриптомных профилей органоидов на транскриптомные профили образцов РШМ из базы TCGA указало на наиболее вероятный источник возникновения плоскоклеточной карциномы или аденокарциномы шейки матки: в первом случае это KRT5(+) линия стволовых клеток, во втором — KRT7(+)KRT8(+) линия. Авторы отмечают необходимость поиска диагностических маркеров и подходов к лечению РШМ, специфичных в отношении этих клеточных линий.

Органоиды непосредственно из клеточного материала зоны трансформации шейки матки были получены Y. Ma и соавт. [56]. Они имели уникальные морфологическую структуру и форму, но в целом соответствовали гистологической организации исходного участка ткани. Транскриптомный анализ органоидов, выполненный с помощью кДНК-микрочипов, показал сохранность экспрессии маркеров метапластического эпителия, а значит, их можно использовать как релевантную модель для экспериментальной индукции канцерогенеза. Любопытно, что немного ранее была опубликована работа, описывающая получение органоидной культуры от пациентки с исключительно редким видом РШМ — ясноклеточной аденокарциномой [57], но геномное профилирование органоидов проводилось только для установления соответствия их мутационного профиля исходной ткани опухоли.

Для ОГШ органоидное направление тоже активно развивается, но низкая эффективность методик получения PDO пока не позволяет широко использовать RNA-Seq и другие геномные виды анализа [58, 59]. В основном текущие исследования посвящены совершенствованию протоколов их получения из биопсийных образцов здоровой и опухолевой тканей и отработке способов экспериментального воздействия [60–64], при этом отмечается, что для обоснования предикторного потенциала ОГШ-органоеидов остро необходимы полногеномные/транскриптомные исследования [58]. В одном таком исследовании [65] RNA-Seq было применено к PDO, полученным из образцов

нормальной слизистой оболочки рта и опухолей, развивающихся из различных анатомических участков ротовой полости и ее производных (дна рта, языка, десен, глотки, гортани, слюнных желез, а также носовой полости и шеи), но транскриптомный анализ в данном случае решал задачу исключительно охарактеризовать саму органоидную модель, а именно подтвердить различия в профилях генной экспрессии между нормальными и опухолевыми органоидами. Для изучения процессов, предшествующих развитию ВПЧ-ассоциированного РШМ/ОГШ, в качестве органоидов, релевантных стратифицированному эпителию, также используют рафтовые (или плотовые) культуры [66].

Органотипические рафтовые культуры.

Рафтовая культура воспроизводит вертикальную дифференцировку слоев многослойного плоского эпителия, от которой сильно зависит жизненный цикл ВПЧ. Если клетки такой культуры трансфицировать ВПЧ-генами или инфицировать ВПЧ-квазивирioнами, то можно моделировать латентную/продуктивную/трансформирующую инфекцию и связанные с ней изменения в кератиноцитах, морфологически соответствующие дисплазиям (интраэпителиальным неоплазиям) различной степени тяжести. Поскольку стабильных клеточных линий, полученных из предраковых патологий, очень мало (например, для шейки матки — всего две линии клеток цервикальной интраэпителиальной неоплазии), то конструируют органотипические культуры, как правило, из первичных кератиноцитов человека (неонатальных или взрослых, выделенных из различных анатомических участков), помещенных на фидерный слой из фибробластов. Использование RNA-Seq в такой модельной системе позволило оценить влияние ВПЧ и его отдельных белков на транскриптом клеток [67–69], охарактеризовать сигнальные пути, дерегуляция которых ведет к канцерогенезу, и соотносить наблюдаемые изменения с морфологическими отклонениями в рафте [70].

К сожалению, не из всех локализаций выделенные кератиноциты точно воспроизводят дифференцировочные программы эпителия шейки матки или слизистой оболочки ротовой полости [66]. Как показал транскриптомный анализ рафтовых культур, выращенных из кератиноцитов различного происхождения (шейка матки, десны, миндалина и др.), клеточный ответ на ВПЧ-инфекцию в них сильно отличается, в том числе отличаются уровни экспрессии генов иммунного ответа и эпидермальной дифференцировки (что, кстати, может лежать в основе особой восприимчивости кератиноцитов шейки матки к ВПЧ-индуцированному канцерогенезу) [71, 72]. Таким образом, органотипические рафтовые культуры из первичных эпителиальных клеток соответствующей локализации лучше подходят для моделирования вирусной инфекции и ее последствий [58].

Описание процедуры получения органотипических культур из первичных клеток нормального эпителия и неоплазий шейки матки с использованием церви-

кальных стромальных клеток человека представлено в работах [73] и [74], однако примеры использования RNA-Seq пока отсутствуют. Совсем недавно были опубликованы подробные протоколы разных подходов к получению ВПЧ(+) и ВПЧ(–) органотипических 3D-моделей из первичных эпителиальных клеток ротовой полости и шейки матки с примерами их применения, в том числе в омиксных исследованиях [45], что позволяет ожидать более широкого использования технологий секвенирования нового поколения.

Органотипическая рафтовая культура может быть создана не только для многослойного нормального или диспластически измененного эпителия, но и для раннего, интраэпителиального рака; в таком случае она может служить моделью ранней инвазии. Эта возможность была продемонстрирована в двух работах по РШМ [75] и [46], причем в исследовании V. de Gregorio и соавт. [46] особое внимание уделено созданию 3D-модели стромы, состоящей из первичных опухоль-ассоциированных цервикальных фибробластов и продуцируемого ими же межклеточного матрикса. Авторы подчеркивают, что в такой культуре соединительнотканная основа — это не просто подложка, а равноправный участник кросс-тока между опухолевыми и стромальными клетками, и именно аутентичная строма должным образом воспроизводит сигналы микроокружения, необходимые клеткам РШМ для осуществления ЭМП и активации инвазии. В обеих указанных работах в качестве опухолевого компонента рафтовой модели использовались клетки стандартных опухолевых линий РШМ (C33A и SiHa), а их анализ ограничился определением отдельных маркеров без применения RNA-Seq.

Безусловно, органоидная культура как клеточная 3D-модель, несмотря на многие достоинства, все равно не лишена ряда недостатков. Не всегда органоиды позволяют воспроизвести все компоненты морфологической структуры оригинальной ткани [57]. Общим недостатком органоидов является постепенная утрата определенных опухолевых клонов, разрастание фибробластов и отсутствие кровеносных сосудов. К сожалению, реконструкция иммунного микроокружения в органоидной культуре ВПЧ(+) РШМ/ОГШ остается также нерешенной проблемой [1]. Некоторые из этих ограничений призвана устранить эксплантная культура.

Экспланты

Эксплантная культура представляет собой культивируемый *ex vivo* микрофрагмент (1–2 мм³) нативной ткани. Таким образом, она по определению является органотипической 3D-моделью, полученной из клеток пациентов (patient-derived explant, PDE). Ценное преимущество эксплантной модели состоит в том, что она сохраняет опухолевые клетки в их исходном микроокружении, включая сосуды, строму, иммунный инфильтрат, а отсутствие энзиматической обработки сохраняет интактными все межклеточные взаимодей-

ствия [2]. Кроме того, экспланты нормальной и опухолевой тканей позволяют проводить сравнительные транскриптомные исследования, в том числе после их обработки химиотерапевтическими агентами, для предварительной оценки индивидуального ответа на терапию. Благодаря сохранности иммунного микроокружения RNA-Seq в этом случае позволяет фактически *in situ* выявить новые механизмы действия иммунотерапевтических противоопухолевых агентов. Методики получения эксплантов и их культивирования в присутствии химических агентов были ранее описаны в применении к ВПЧ-ассоциированному раку и предшествующим ему интраэпителиальным неоплазиям (например, [76, 77]). Более того, показана способность ВПЧ(+) эксплантной культуры воспроизводить особенности иммунного ответа на обработку препаратами, но как модель она пока не получила распространения в геномных/транскриптомных исследованиях РШМ/ОГШ в отличие от других типов рака.

Несмотря на то, что эксплантная культура рассматривается наравне с органоидами как очень перспективная экспериментальная клеточная система, она имеет ряд ограничений: использование экспланта подразумевает очень краткие сроки культивирования (порядка нескольких дней); отсутствие естественной перфузии ткани и постепенное расширение областей некроза неизбежно вызывают изменения транскриптомного профиля. Частично эта проблема может быть решена с помощью *in vivo* модели.

Ксенографты, полученные от пациентов

Такие ксенографты («аватары», patient-derived xenografts, PDX) представляют собой опухоли, полученные путем трансплантации клеточного материала пациента в организм лабораторного животного (как правило, мышей) с генетическими дефектами иммунной системы, не позволяющими развить реакцию отторжения трансплантата. В исследованиях по РШМ использование PDX в качестве экспериментальной модели очень мало распространено, поскольку пока не удается достичь эффективности их получения, достаточной для проведения геномных видов анализа [78]. Очевидно также, что вирусная природа РШМ диктует необходимость ортотопического микроокружения для опухолевого трансплантата, чтобы избежать существенных искажений профиля экспрессии опухолевых клеток.

Ортотопические PDX-модели РШМ в действительности разрабатывались [50, 79]. Кроме того, был описан метод получения PDX-культур от интраэпителиальных неоплазий шейки матки путем пересадки мышам под почечную капсулу [80]. В указанных исследованиях основной задачей являлось подтверждение сохранности исходной гистологической организации, что не предполагало использования методов геномного профилирования, молекулярного скрининга и т.п. В работе E.K. Rofstad и соавт. [81] на морфологиче-

ском уровне показана возможность воспроизведения в PDX-культуре РШМ даже таких свойств, как индивидуальная плотность внутриопухолевой лимфатической микрососудистой сети пациентов, инвазивность и метастатическая активность. С другой стороны, некоторые авторы выражают сомнения насчет стабильности морфологических и молекулярных свойств РШМ (в том числе ВПЧ-статуса) в форме PDX и говорят о том, что по мере серийной трансплантации PDX в них могут наблюдаться существенные отклонения от свойств опухоли пациента-донора [82]. Сомнения о релевантности PDX-моделей РШМ могли бы разрешить сравнительные геномные/транскриптомные исследования. Однако пока можно говорить об использовании RNA-Seq лишь для опухолевых ксенографтов, выращенных из подсаженных мышам клеток стандартных линий человека, как, например, HeLa. Как правило, дизайн таких исследований строится на экспериментальном воздействии на опухолевые клетки в *in vivo* окружении и анализе их ответа на транскриптомном уровне [83, 84].

Различная природа канцерогенеза ОГШ позволила сравнить эффективность получения PDX для ВПЧ(+) и ВПЧ(-) опухолей. Оказалось, что выход PDX-культур ВПЧ(+) ОГШ значительно ниже, чем ВПЧ(-). Таким образом, можно говорить как об общей закономерности о низкой приживаемости ВПЧ-зависимых опухолей (РШМ, ОГШ) при пересадке в чужеродное окружение, поэтому вопрос об адекватных *in vivo/ex vivo* моделях для них стоит особенно остро [85–88]. Постоянно ведется поиск причин, лежащих в основе различий в свойствах ВПЧ(-) и ВПЧ(+) ОГШ. Например, одну из причин ранее связывали с различиями в фенотипе стволовых опухолевых клеток, но, как показала S.B. Keysar и соавт. [89], с помощью RNA-Seq-анализа PDX-моделей, обогащенных фенотипом ALDH+CD44^{high}, стволовые клетки ВПЧ(-) и ВПЧ(+) ОГШ имеют схожий профиль активации сигнальных путей. Так или иначе, для PDX-моделей ВПЧ(+) ОГШ с помощью экзомного секвенирования были получены доказательства сохранности уникального для каждого пациента паттерна генетических aberrаций, включая потенциально таргетируемые мутации, что свидетельствует в пользу возможности их использования в качестве доклинических моделей [9].

Примером применения транскриптомного RNA-Seq-анализа в гетеротопической PDX-культуре ВПЧ(+) ОГШ является исследование J.K. Lilja-Fischer и соавт. [90]. Любопытно, что, несмотря на воспроизведение морфологических характеристик, ВПЧ-носительства и профиля ключевых мутаций, ксенографты имели ряд отличий от исходных опухолевых образцов по профилю генной экспрессии. Гены, отвечающие за иммунный ответ и ответ на гипоксию, и мезенхимальные гены показали сниженный уровень экспрессии в PDX. Авторы связывают эти различия с неестественным микроокружением PDX: слабоваскуляризованная подкожная область трансплантации изменяет активность генов, контролирующих ответ на гипоксию,

а иммунодефицитный статус мыши-реципиента искажает механизмы противостояния опухоли иммунной системе хозяина.

Тем не менее предпринимаются попытки оптимизировать дизайн исследований таким образом, чтобы PDX ОГШ удовлетворяли требованиям предикторной модели и помогали в изучении механизмов формирования лекарственной устойчивости *in vivo*. В 2017 г. были опубликованы результаты транскриптомного профилирования (на кДНК-микрочипах) 28 PDX плоскоклеточного ОГШ, после чего опытным животным давались цитотоксические или таргетные препараты. Ответ на препараты сопоставлялся с транскриптомным профилем для извлечения предикторной сигнатуры экспрессии [91]. А совсем недавно появилась работа К.М. Yegodayev и соавт. [92], иллюстрирующая потенциал RNA-Seq при анализе *in vivo* действия таргетной терапии в PDX-культуре ОГШ: PDX-мышам был введен цетуксимаб (препарат анти-EGFR моноклональных антител), после чего они были разделены на две группы — отвечающие на терапию уменьшением размеров ксенографта и устойчивые к терапии. После сравнения транскриптомов у этих двух групп с контрольной группой PDX было обнаружено, что ответ на цетуксимаб в чувствительной группе обусловлен изменениями в стромальном (мышинном) компоненте, а прогрессия опухоли на фоне цетуксимаба обусловлена активностью ОАФ. В целом важное достоинство ксенографтных моделей состоит в предоставляемой ими возможности дифференцировать с помощью технологий секвенирования нового поколения вклад собственно опухолевых клеток и стромального компонента (по мышинным ридам/прочтениям) в изучаемое явление [93].

Кроме вовлечения клеток стромы, еще одной причиной резистентности к таргетным препаратам ОГШ *in vivo* может служить активация компенсаторных механизмов. Исследования PDX с помощью RNA-Seq в таком случае оказываются полезными в поиске терапевтических способов «обойти» эту причину. Например, в работе S. Bhatia и соавт. [94] был проанализирован вклад сигнального пути EphB4/ephrin-B2 в снижение эффективности действия EGFR-ингибиторов, цитотоксической и радиотерапии на материале PDX рака ротовой полости. Авторы целенаправленно получили PDX-модели ВПЧ(+) и ВПЧ(–) ОГШ от пациентов с изначально высоким уровнем экспрессии ингибиторов EphB4, ephrin-B2 и EGFR. Затем мышам вводили лекарственные препараты (цетуксимаб, цисплатин) с добавлением ингибитора лиганд-рецепторного взаимодействия EphB4/ephrin-B2 или без него. После получения различий в ответе на разные комбинации препаратов и сравнения транскриптомных профилей PDX-опухолей были обнаружены различия в экспрессии downstream-мишеней пути EphB4/ephrin-B2.

В отношении ОГШ разрабатывается также новый формат клинических испытаний противоопухолевых препаратов, основанный на параллельном наблюдении

ответа пациента и «его» мыши. При этом сочетание геномного и транскриптомного методов профилирования способствует более глубокому пониманию причин большей эффективности тех или иных комбинаций препаратов и механизмов формирования резистентности. Результаты такого формата испытаний для пан-PI3K-ингибитора бупарлисиба и его комбинации с цетуксимабом были недавно представлены H.R. Kim и соавт. [95]. Согласно RNA-Seq-данным, более высокая эффективность комбинации двух препаратов в PDX-модели обусловлена более сильной активацией экспрессии генов апоптоза и негативных регуляторов клеточного цикла. Схожая платформа для сопряженных доклинического и клинического испытаний с верификацией наблюдений методами геномного анализа описана К.М. Campbell и соавт. [96] на примере PDX-модели плоскоклеточного рака ротовой полости и MEK1/2-ингибитора траметиниба.

Безусловным ограничением PDX-модели является отсутствие иммунной системы организма-реципиента. И хотя иногда данное обстоятельство помогает «проявить» специфические механизмы врожденного ответа со стороны опухолевых клеток, обычно маскируемые иммунными клетками, опухолевые PDX не позволяют проводить исследования в области иммуноонкологии и тестировать иммунотерапевтические противоопухолевые агенты. Для реализации такой возможности PDX-модели нуждаются в усовершенствовании — необходим переход от использования иммунодефицитных линий мышей к применению частично или полностью гуманизированных линий, способных формировать иммунный ответ и в том числе развивать воспалительную реакцию. Это особенно важно в отношении ВПЧ-индуцированных опухолей, которые возникают, прогрессируют и отвечают на терапию в постоянном взаимодействии с иммунной системой организма-хозяина [97].

Биопечать и микрофлюидные устройства (tumor-on-a-chip)

Биопечать. Ожидается, что в ближайшем будущем *in vivo* модели лабораторных животных будут заменены многокомпонентными 3D-опухолевыми культурами, напечатанными из клеточного материала пациентов [98]. Особенно многообещающими выглядят возможности построения образцов васкуляризованных опухолей, воспроизводящих пространственно-временные химические градиенты биоактивных факторов и содержащих иммунный инфильтрат и строму, что позволит моделировать диссеминацию опухолевых клеток посредством инвазии/интравазации и стимуляции ангиогенеза, выбирать индивидуальную схему лечения и более точно прогнозировать индивидуальный ответ на терапию в околофизиологических условиях [99, 100].

Исследования, в которых использовались транскриптомный анализ и напечатанные опухолевые 3D-клеточные структуры, появились совсем недавно,

фактически в течение последних двух лет. Технология получения 3D-моделей путем биопечати из первичных эпителиальных опухолевых клеток больных пока находится на начальном этапе развития [101]. Биопринтинг РШМ ограничивается оптимизацией самих методов печати с использованием в качестве «биочернил» стандартной линии HeLa [102, 103]. Печать васкуляризованных ОГШ-моделей также пока находится на стадии изучения и подбора условий [104]. Учитывая, что для многих типов опухолей невирусного и неэпителиального происхождения омиксные исследования с использованием напечатанных 3D-модельных систем бурно развиваются, можно ожидать такого же прогресса в отношении ВПЧ-зависимых неоплазий.

Микрофлюидные устройства (чипы), или микрофизиологические системы, позволяют культивировать любые из описанных выше 2D/3D-модельных систем в контролируемых условиях, имитирующих естественный кровоток. Наравне с биопечатью «опухоли-на-чипе» или «органы-на-чипе» — это самые новые и высокотехнологичные виды клеточных модельных систем. Для эпителиальных опухолей и соответствующих им нормальных тканей пока обнаруживаются лишь единичные исследования, сочетающие данную технологию культивирования и геномные методы анализа. Для плоскоклеточной карциномы ротовой полости есть пример использования микрофлюидного устройства, позволившего смоделировать процесс опухолевой инвазии и затем выделить из клеток инвазивного края фракцию микроРНК. Биоинформатический анализ профиля микроРНК и их мРНК-мишеней, а также задействованных сигнальных путей помог выявить специфические отличия инвазирующих опухолевых клеток от остальной опухолевой массы [105]. 3D-микрофлюидные клеточные модели РШМ пока находятся на этапе разработки, и для этого используются обычные опухолевые линии (например, HeLa [106]).

Заключение

Опубликованные к настоящему времени работы, в которых к клеточным модельным системам применены высокопроизводительные методы геномного анализа, наглядно демонстрируют, что сочетание этих технологий позволяет исследовать невероятно широкий спектр проблем и решать задачи разного уровня сложности. Тем не менее при поиске литературы мы столкнулись с весьма скромным количеством статей по исследованию ВПЧ-ассоциированного рака в сравнении с эпителиальными опухолями другой этиологии и локализации. Первопричина кроется в особенностях биологии самого объекта, обуславливающих трудности реализации на практике методов тканевого/клеточного моделирования, а это, в свою очередь, замедляет разработку и внедрение новых методов терапии [87]. На повестке дня остро стоит вопрос о стандартизации протоколов получения и использования клеточных мо-

делей первичных опухолевых клеток для проведения доклинических испытаний или персонализированной диагностики и терапии, обсуждается необходимость добавления 4-го измерения (времени) в экспериментах с трехмерными клеточными системами. Учитывая огромный трансляционный потенциал описанных выше опухолевых моделей, стремительно приближающихся к полной биомимикрии, и резко возросший в последние годы вклад ВПЧ-ассоциированных неоплазий в структуру общей заболеваемости и смертности от онкопатологий, можно ожидать дальнейшего расширения применения методов полногеномного профилирования и мультиомиксного подхода к анализу клеточных систем ВПЧ-ассоциированного рака.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования РФ «Обеспечение развития материально-технической инфраструктуры уникальных научных установок» (Соглашение №075-15-2021-665, проект ««Многокомпонентный программно-аппаратный комплекс для автоматизированного сбора, хранения, разметки научно-исследовательских и клинических биомедицинских данных, их унификации и анализа на базе ЦОД с использованием технологий искусственного интеллекта»); тема работы соответствует государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ (тема №АААА-А20-120070290151-6, проект №0752-2020-0007).

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов и соблюдении этических принципов журнала.

Литература/References

1. Löhmußaar K., Boretto M., Clevers H. Human-derived model systems in gynecological cancer research. *Trends Cancer* 2020; 6(12): 1031–1043, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.07.007>.
2. Demers I., Donkers J., Kremer B., Speel E.J. Ex vivo culture models to indicate therapy response in head and neck squamous cell carcinoma. *Cells* 2020; 9(11): 2527, <https://doi.org/10.3390/cells9112527>.
3. Méry B., Rancoule C., Guy J.B., Espenel S., Wozny A.S., Battiston-Montagne P., Ardail D., Beuve M., Alphonse G., Rodriguez-Lafrasse C., Magné N. Preclinical models in HNSCC: a comprehensive review. *Oral Oncol* 2017; 65: 51–56, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.12.010>.
4. Shan F., Close D.A., Camarco D.P., Johnston P.A. High-content screening comparison of cancer drug accumulation and distribution in two-dimensional and three-dimensional culture models of head and neck cancer. *Assay Drug Dev Technol* 2018; 16(1): 27–50, <https://doi.org/10.1089/adt.2017.812>.
5. Melissaridou S., Wiechec E., Magan M., Jain M.V., Chung M.K., Farnebo L., Roberg K. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int* 2019; 19: 16, <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0733-1>.
6. Ayuso J.M., Vitek R., Swick A.D., Skala M.C., Wisinski K.B., Kimple R.J., Lambert P.F., Beebe D.J. Effects

- of culture method on response to EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep* 2019; 9(1): 12480, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48764-3>.
7. Semertzidou A., Brosens J.J., McNeish I., Kyrgiou M. Organoid models in gynaecological oncology research. *Cancer Treat Rev* 2020; 90: 102103, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102103>.
8. Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol* 2016; 238(2): 166–179, <https://doi.org/10.1002/path.4656>.
9. Facompre N.D., Rajagopalan P., Sahu V., Pearson A.T., Montone K.T., James C.D., Gleber-Netto F.O., Weinstein G.S., Jalaly J., Lin A., Rustgi A.K., Nakagawa H., Califano J.A., Pickering C.R., White E.A., Windle B.E., Morgan I.M., Cohen R.B., Gimotty P.A., Basu D. Identifying predictors of HPV-related head and neck squamous cell carcinoma progression and survival through patient-derived models. *Int J Cancer* 2020; 147(11): 3236–3249, <https://doi.org/10.1002/ijc.33125>.
10. Hayes T.F., Benaich N., Goldie S.J., Sipilä K., Ames-Draycott A., Cai W., Yin G., Watt F.M. Integrative genomic and functional analysis of human oral squamous cell carcinoma cell lines reveals synergistic effects of FAT1 and CASP8 inactivation. *Cancer Lett* 2016; 383(1): 106–114, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.014>.
11. Pirotte E.F., Holzhauser S., Owens D., Quine S., Al-Hussaini A., Christian A.D., Giles P.J., Man S.T., Evans M., Powell N.G. Sensitivity to inhibition of DNA repair by Olaparib in novel oropharyngeal cancer cell lines infected with human papillomavirus. *PLoS One* 2018; 13(12): e0207934, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207934>.
12. Deng H., Mondal S., Sur S., Woodworth C.D. Establishment and optimization of epithelial cell cultures from human ectocervix, transformation zone, and endocervix optimization of epithelial cell cultures. *J Cell Physiol* 2019; 234(6): 7683–7694, <https://doi.org/10.1002/jcp.28049>.
13. Zhou Y., Zhang Q., Gao G., Zhang X., Liu Y., Yuan S., Wang X., Chen J.J. Role of WDHD1 in human papillomavirus-mediated oncogenesis identified by transcriptional profiling of E7-expressing cells. *J Virol* 2016; 90(13): 6071–6084, <https://doi.org/10.1128/jvi.00513-16>.
14. Klymenko T., Gu Q., Herbert I., Stevenson A., Iliev V., Watkins G., Pollock C., Bhatia R., Cuschieri K., Herzyk P., Gatherer D., Graham S.V. RNA-Seq analysis of differentiated keratinocytes reveals a massive response to late events during human papillomavirus 16 infection, including loss of epithelial barrier function. *J Virol* 2017; 91(24): e01001-17, <https://doi.org/10.1128/jvi.01001-17>.
15. Hua C., Zhu J., Zhang B., Sun S., Song Y., van der Veen S., Cheng H. Digital RNA sequencing of human epidermal keratinocytes carrying human papillomavirus type 16 E7. *Front Genet* 2020; 11: 819, <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00819>.
16. Xu J., Fang Y., Qin J., Chen X., Liang X., Xie X., Lu W. A transcriptomic landscape of human papillomavirus 16 E6-regulated gene expression and splicing events. *FEBS Lett* 2016; 590(24): 4594–4605, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12486>.
17. Evans M.R., James C.D., Bristol M.L., Nulton T.J., Wang X., Kaur N., White E.A., Windle B., Morgan I.M. Human papillomavirus 16 E2 regulates keratinocyte gene expression relevant to cancer and the viral life cycle. *J Virol* 2019; 93(4): e01941-18, <https://doi.org/10.1128/jvi.01941-18>.
18. Barr J.A., Hayes K.E., Brownmiller T., Harold A.D., Jagannathan R., Lockman P.R., Khan S., Martinez I. Long non-coding RNA FAM83H-AS1 is regulated by human papillomavirus 16 E6 independently of p53 in cervical cancer cells. *Sci Rep* 2019; 9(1): 3662, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40094-8>.
19. Habiger C., Jäger G., Walter M., Iftner T., Stubenrauch F. Interferon kappa inhibits human papillomavirus 31 transcription by inducing SP100 proteins. *J Virol* 2015; 90(2): 694–704, <https://doi.org/10.1128/jvi.02137-15>.
20. Tamura R., Yoshihara K., Saito T., Ishimura R., Martínez-Ledesma J.E., Xin H., Ishiguro T., Mori Y., Yamawaki K., Suda K., Sato S., Itamochi H., Motoyama T., Aoki Y., Okuda S., Casingal C.R., Nakaoka H., Inoue I., Verhaak R.G.W., Komatsu M., Enomoto T. Novel therapeutic strategy for cervical cancer harboring FGFR3-TACC3 fusions. *Oncogenesis* 2018; 7(1): 4, <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0018-2>.
21. Samuels T.L., Zimmermann M.T., Zeighami A., Demos W., Southwood J.E., Blumin J.H., Bock J.M., Johnston N. RNA sequencing reveals cancer-associated changes in laryngeal cells exposed to non-acid pepsin. *Laryngoscope* 2021; 131(1): 121–129, <https://doi.org/10.1002/lary.28636>.
22. Rosa M.N., Evangelista A.F., Leal L.F., De Oliveira C.M., Silva V.A.O., Munari C.C., Munari F.F., Matsushita G.M., Dos Reis R., Andrade C.E., Souza C.P., Reis R.M. Establishment, molecular and biological characterization of HCB-514: a novel human cervical cancer cell line. *Sci Rep* 2019; 9(1): 1913, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38315-7>.
23. Fadlullah M.Z., Chiang I.K., Dionne K.R., Yee P.S., Gan C.P., Sam K.K., Tiong K.H., Ng A.K., Martin D., Lim K.P., Kallarakkal T.G., Mustafa W.M., Lau S.H., Abraham M.T., Zain R.B., Rahman Z.A., Molinolo A., Patel V., Gutkind J.S., Tan A.C., Cheong S.C. Genetically-defined novel oral squamous cell carcinoma cell lines for the development of molecular therapies. *Oncotarget* 2016; 7(19): 27802–27818, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8533>.
24. Zammataro L., Lopez S., Bellone S., Pettinella F., Bonazzoli E., Perrone E., Zhao S., Menderes G., Altwerger G., Han C., Zeybek B., Bianchi A., Manzano A., Manara P., Cocco E., Buza N., Hui P., Wong S., Ravaggi A., Bignotti E., Romani C., Todeschini P., Zanotti L., Odicino F., Pecorelli S., Donzelli C., Ardighieri L., Angioli R., Raspagliesi F., Scambia G., Choi J., Dong W., Bilguvar K., Alexandrov L.B., Silasi D.A., Huang G.S., Ratner E., Azodi M., Schwartz P.E., Pirazzoli V., Stiegler A.L., Boggon T.J., Lifton R.P., Schlessinger J., Santin A.D. Whole-exome sequencing of cervical carcinomas identifies activating ERBB2 and PIK3CA mutations as targets for combination therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(45): 22730–22736, <https://doi.org/10.1073/pnas.1911385116>.
25. Wang Y., Liu L., Chen Z. Transcriptome profiling of cervical cancer cells acquired resistance to cisplatin by deep sequencing. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47(1): 2820–2829, <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1637882>.
26. Lu X., Wang Z., Huang H., Wang H. Hedgehog signaling promotes multidrug resistance by regulation of ABC transporters in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2020; 49(9): 897–906, <https://doi.org/10.1111/jop.13050>.
27. Stein-O'Brien G., Kagohara L.T., Li S., Thakar M., Ranaweera R., Ozawa H., Cheng H., Considine M., Schmitz S., Favorov A.V., Danilova L.V., Califano J.A., Izumchenko E., Gaykalova D.A., Chung C.H., Fertig E.J. Integrated time

course omics analysis distinguishes immediate therapeutic response from acquired resistance. *Genome Med* 2018; 10(1): 37, <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0545-2>.

28. Kagohara L.T., Zamuner F., Davis-Marcisak E.F., Sharma G., Considine M., Allen J., Yegnasubramanian S., Gaykalova D.A., Fertig E.J. Integrated single-cell and bulk gene expression and ATAC-seq reveals heterogeneity and early changes in pathways associated with resistance to cetuximab in HNSCC-sensitive cell lines. *Br J Cancer* 2020; 123(1): 101–113, <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0851-5>.

29. Lupu-Plesu M., Claren A., Martial S., N'Diaye P.D., Lebrigand K., Pons N., Ambrosetti D., Peyrottes I., Feuillade J., Héroult J., Dufies M., Doyen J., Pagès G. Effects of proton versus photon irradiation on (lymph)angiogenic, inflammatory, proliferative and anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis* 2017; 6(7): e354, <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.56>.

30. Guo C., Xu L.F., Li H.M., Wang W., Guo J.H., Jia M.Q., Jia R., Jia J. Transcriptomic study of the mechanism of anoikis resistance in head and neck squamous carcinoma. *Peer J* 2019; 7: e6978, <https://doi.org/10.7717/peerj.6978>.

31. Low J.L., Lau D.P., Zhang X., Kwang X.L., Rohatgi N., Chan J.V., Chong F.T., Wong S.Q.R., Leong H.S., Thangavelu M.T., Rikka S., Skanderup A.M.J., Tan D.S.W., Periyasamy G., Koh J.L.Y., Iyer N.G., DasGupta R. A chemical genetic screen identifies Aurora kinases as a therapeutic target in EGFR T790M negative, gefitinib-resistant head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *EBioMedicine* 2021; 64: 103220, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103220>.

32. Sharma A., Cao E.Y., Kumar V., Zhang X., Leong H.S., Wong A.M.L., Ramakrishnan N., Hakimullah M., Teo H.M.V., Chong F.T., Chia S., Thangavelu M.T., Kwang X.L., Gupta R., Clark J.R., Periyasamy G., Iyer N.G., DasGupta R. Longitudinal single-cell RNA sequencing of patient-derived primary cells reveals drug-induced infidelity in stem cell hierarchy. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4931, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07261-3>.

33. Voutsadakis I.A. PI3KCA mutations in uterine cervix carcinoma. *J Clin Med* 2021; 10(2): 220, <https://doi.org/10.3390/jcm10020220>.

34. Xu C., Nikolova O., Basom R.S., Mitchell R.M., Shaw R., Moser R.D., Park H., Gurley K.E., Kao M.C., Green C.L., Schaub F.X., Diaz R.L., Swan H.A., Jang I.S., Guinney J., Gadi V.K., Margolin A.A., Grandori C., Kemp C.J., Méndez E. Functional precision medicine identifies novel druggable targets and therapeutic options in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2018; 24(12): 2828–2843, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1339>.

35. Sa J.K., Hwang J.R., Cho Y.J., Ryu J.Y., Choi J.J., Jeong S.Y., Kim J., Kim M.S., Paik E.S., Lee Y.Y., Choi C.H., Kim T.J., Kim B.G., Bae D.S., Lee Y., Her N.G., Shin Y.J., Cho H.J., Kim J.Y., Seo Y.J., Koo H., Oh J.W., Lee T., Kim H.S., Song S.Y., Bae J.S., Park W.Y., Han H.D., Ahn H.J., Sood A.K., Rabadan R., Lee J.K., Nam D.H., Lee J.W. Pharmacogenomic analysis of patient-derived tumor cells in gynecologic cancers. *Genome Biol* 2019; 20(1): 253, <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1848-3>.

36. Kumar M.M., Davuluri S., Poojar S., Mukherjee G., Bajpai A.K., Bafna U.D., Devi U.K., Kallur P.P., Kshitish A.K., Jayshree R.S. Role of estrogen receptor alpha in human cervical cancer-associated fibroblasts: a transcriptomic study. *Tumour Biol* 2016; 37(4): 4409–4420, <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4257-6>.

37. Patel A.K., Vipparthi K., Thatikonda V., Arun I., Bhattacharjee S., Sharan R., Arun P., Singh S. A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma. *Oncogenesis* 2018; 7(10): 78, <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0087-x>.

38. Takahashi H., Rokudai S., Kawabata-Iwakawa R., Sakakura K., Oyama T., Nishiyama M., Chikamatsu K. AKT3 is a novel regulator of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021; 13(6): 1233, <https://doi.org/10.3390/cancers13061233>.

39. Ding L., Ren J., Zhang D., Li Y., Huang X., Hu Q., Wang H., Song Y., Ni Y., Hou Y. A novel stromal lncRNA signature reprograms fibroblasts to promote the growth of oral squamous cell carcinoma via lncRNA-CAF/interleukin-33. *Carcinogenesis* 2018; 39(3): 397–406, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy006>.

40. Lopatina T., Favaro E., Danilova L., Fertig E.J., Favorov A.V., Kagohara L.T., Martone T., Bussolati B., Romagnoli R., Albera R., Pecorari G., Brizzi M.F., Camussi G., Gaykalova D.A. Extracellular vesicles released by tumor endothelial cells spread immunosuppressive and transforming signals through various recipient cells. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 698, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00698>.

41. Mattoscio D., Isopi E., Lamolinara A., Patruno S., Medda A., De Cecco F., Chiocca S., Iezzi M., Romano M., Recchiuti A. Resolvin D1 reduces cancer growth stimulating a protective neutrophil-dependent recruitment of anti-tumor monocytes. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; 40(1): 129, <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01937-3>.

42. Arayataweegool A., Srisuttee R., Bin-Alee F., Mahattanasakul P., Tangjaturonrasme N., Kerekhanjanarong V., Mutirangura A., Kitkumthorn N. Induction of ZCCHC6 expression in peripheral blood mononuclear cells by HNSCC secretions. *Gene* 2020; 754: 144880, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144880>.

43. Liu C., Billet S., Choudhury D., Cheng R., Haldar S., Fernandez A., Biondi S., Liu Z., Zhou H., Bhowmick N.A. Bone marrow mesenchymal stem cells interact with head and neck squamous cell carcinoma cells to promote cancer progression and drug resistance. *Neoplasia* 2021; 23(1): 118–128, <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.11.012>.

44. Castro-Oropeza R., Vazquez-Santillan K., Díaz-Gastelum C., Melendez-Zajgla J., Zampedri C., Ferat-Osorio E., Rodríguez-González A., Arriaga-Pizano L., Maldonado V. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote the malignant phenotype of cervical cancer. *Sci Rep* 2020; 10(1): 14205, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69907-x>.

45. Jackson R., Maarsingh J.D., Herbst-Kralovetz M.M., Van Doorslaer K. 3D oral and cervical tissue models for studying papillomavirus host-pathogen interactions. *Curr Protoc Microbiol* 2020; 59(1): e129, <https://doi.org/10.1002/cpmc.129>.

46. De Gregorio V., La Rocca A., Urciuolo F., Annunziata C., Tornosello M.L., Buonaguro F.M., Netti P.A., Imperato G. Modeling the epithelial-mesenchymal transition process in a 3D organotypic cervical neoplasia. *Acta Biomater* 2020; 116: 209–222, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.006>.

47. Santi M., Mapanao A.K., Cappello V., Voliani V. Production of 3D tumor models of head and neck squamous cell carcinomas for nanotheranostics assessment. *ACS Biomater Sci Eng* 2020; 6(9): 4862–4869, <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00617>.

48. Yang S., Chen T., Huang L., Xu S., Cao Z., Zhang S., Xu J., Li Y., Yue Y., Lu W., Cheng X., Xie X. High-risk human papillomavirus E7 maintains stemness via APH1B in cervical cancer stem-cell like cells. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 9541–9552, <https://doi.org/10.2147/cmar.s194239>.
49. Thippabhotla S., Zhong C., He M. 3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles. *Sci Rep* 2019; 9(1): 13012, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49671-3>.
50. Tyagi A., Vishnoi K., Mahata S., Verma G., Srivastava Y., Masaldan S., Roy B.G., Bharti A.C., Das B.C. Cervical cancer stem cells selectively overexpress HPV oncoprotein E6 that controls stemness and self-renewal through upregulation of HES1. *Clin Cancer Res* 2016; 22(16): 4170–4184, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-2574>.
51. Kaseb H.O., Fohrer-Ting H., Lewis D.W., Lagasse E., Gollin S.M. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Cell Res* 2016; 348(1): 75–86, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.003>.
52. Azharuddin M., Roberg K., Dhara A.K., Jain M.V., Darcy P., Hinkula J., Slater N.K.H., Patra H.K. Dissecting multi drug resistance in head and neck cancer cells using multicellular tumor spheroids. *Sci Rep* 2019; 9(1): 20066, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56273-6>.
53. Hagemann J., Jacobi C., Gstoettner S., Welz C., Schwenk-Zieger S., Stauber R., Strieth S., Kuenzel J., Baumeister P., Becker S. Therapy testing in a spheroid-based 3D cell culture model for head and neck squamous cell carcinoma. *J Vis Exp* 2018; 134: 57012, <https://doi.org/10.3791/57012>.
54. Chumduri C., Gurumurthy R.K., Berger H., Dietrich O., Kumar N., Koster S., Brinkmann V., Hoffmann K., Drabkina M., Arampatzi P., Son D., Klemm U., Mollenkopf H.J., Herbst H., Mangler M., Vogel J., Saliba A.E., Meyer T.F. Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia. *Nat Cell Biol* 2021; 23(2): 184–197, <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00619-0>.
55. Löhmußaar K., Oka R., Espejo Valle-Inclán J., Smits M.H.H., Wardak H., Korving J., Begthel H., Proost N., van de Ven M., Kranenburg O.W., Jonges T.G.N., Zweemer R.P., Veersema S., van Boxtel R., Clevers H. Patient-derived organoids model cervical tissue dynamics and viral oncogenesis in cervical cancer. *Cell Stem Cell* 2021; 28(8): 1380–1396.e6, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.03.012>.
56. Maru Y., Kawata A., Taguchi A., Ishii Y., Baba S., Mori M., Nagamatsu T., Oda K., Kukimoto I., Osuga Y., Fujii T., Hippo Y. Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junction region of the uterine cervix. *Cancers (Basel)* 2020; 12(3): 694, <https://doi.org/10.3390/cancers12030694>.
57. Maru Y., Tanaka N., Ebisawa K., Odaka A., Sugiyama T., Itami M., Hippo Y. Establishment and characterization of patient-derived organoids from a young patient with cervical clear cell carcinoma. *Cancer Sci* 2019; 110(9): 2992–3005, <https://doi.org/10.1111/cas.14119>.
58. Hill S.J., D'Andrea A.D. Predictive potential of head and neck squamous cell carcinoma organoids. *Cancer Discov* 2019; 9(7): 828–830, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-19-0527>.
59. Chitturi Suryaprakash R.T., Kujan O., Shearston K., Farah C.S. Three-dimensional cell culture models to investigate oral carcinogenesis: a scoping review. *Int J Mol Sci* 2020; 21(24): 9520, <https://doi.org/10.3390/ijms21249520>.
60. Karakasheva T.A., Kijima T., Shimonosono M., Maekawa H., Sahu V., Gabre J.T., Cruz-Acuña R., Giroux V., Sangwan V., Whelan K.A., Natsugoe S., Yoon A.J., Philipone E., Klein-Szanto A.J., Ginsberg G.G., Falk G.W., Abrams J.A., Que J., Basu D., Ferri L., Diehl J.A., Bass A.J., Wang T.C., Rustgi A.K., Nakagawa H. Generation and characterization of patient-derived head and neck, oral, and esophageal cancer organoids. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2020; 53(1): e109, <https://doi.org/10.1002/cpsc.109>.
61. Driehuis E., Spelier S., Beltrán Hernández I., de Bree R., Willems S.M., Clevers H., Oliveira S. Patient-derived head and neck cancer organoids recapitulate EGFR expression levels of respective tissues and are responsive to EGFR-targeted photodynamic therapy. *J Clin Med* 2019; 8(11): 1880, <https://doi.org/10.3390/jcm8111880>.
62. Driehuis E., Kretzschmar K., Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc* 2020; 15(10): 3380–3409, <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0379-4>.
63. Kijima T., Nakagawa H., Shimonosono M., Chandramouleeswaran P.M., Hara T., Sahu V., Kasagi Y., Kikuchi O., Tanaka K., Giroux V., Muir A.B., Whelan K.A., Ohashi S., Naganuma S., Klein-Szanto A.J., Shinden Y., Sasaki K., Omoto I., Kita Y., Muto M., Bass A.J., Diehl J.A., Ginsberg G.G., Doki Y., Mori M., Uchikado Y., Arigami T., Avadhani N.G., Basu D., Rustgi A.K., Natsugoe S. Three-dimensional organoids reveal therapy resistance of esophageal and oropharyngeal squamous cell carcinoma cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018; 7(1): 73–91, <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.09.003>.
64. Tanaka N., Osman A.A., Takahashi Y., Lindemann A., Patel A.A., Zhao M., Takahashi H., Myers J.N. Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity. *Oral Oncol* 2018; 87: 49–57, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.10.018>.
65. Driehuis E., Kolders S., Spelier S., Löhmußaar K., Willems S.M., Devriese L.A., de Bree R., de Ruiter E.J., Korving J., Begthel H., van Es J.H., Geurts V., He G.W., van Jaarsveld R.H., Oka R., Muraro M.J., Vivié J., Zandvliet M.M.J.M., Hendrickx A.P.A., Iakobachvili N., Sridevi P., Kranenburg O., van Boxtel R., Kops G.J.P.L., Tuveson D.A., Peters P.J., van Oudenaarden A., Clevers H. Oral mucosal organoids as a potential platform for personalized cancer therapy. *Cancer Discov* 2019; 9(7): 852–871, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-18-1522>.
66. De Gregorio V., Urciuolo F., Netti P.A., Imparato G. In vitro organotypic systems to model tumor microenvironment in human papillomavirus (HPV)-related cancers. *Cancers (Basel)* 2020; 12(5): 1150, <https://doi.org/10.3390/cancers12051150>.
67. Evans M.R., James C.D., Loughran O., Nulton T.J., Wang X., Bristol M.L., Windle B., Morgan I.M. An oral keratinocyte life cycle model identifies novel host genome regulation by human papillomavirus 16 relevant to HPV positive head and neck cancer. *Oncotarget* 2017; 8(47): 81892–81909, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18328>.
68. Bienkowska-Haba M., Luszczek W., Zwolinska K., Scott R.S., Sapp M. Genome-wide transcriptome analysis of human papillomavirus 16-infected primary keratinocytes reveals subtle perturbations mostly due to E7 protein expression. *J Virol* 2020; 94(3): e01360-19, <https://doi.org/10.1128/jvi.01360-19>.

69. Wang X., Wang H.K., Li Y., Hafner M., Banerjee N.S., Tang S., Briskin D., Meyers C., Chow L.T., Xie X., Tuschl T., Zheng Z.M. MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(11): 4262–4267, <https://doi.org/10.1073/pnas.1401430111>.
70. Jackson R., Rosa B.A., Lameiras S., Cuninghame S., Bernard J., Floriano W.B., Lambert P.F., Nicolas A., Zehbe I. Functional variants of human papillomavirus type 16 demonstrate host genome integration and transcriptional alterations corresponding to their unique cancer epidemiology. *BMC Genomics* 2016; 17(1): 851, <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3203-3>.
71. Israr M., Rosenthal D., Frejo-Navarro L., DeVoti J., Meyers C., Bonagura V.R. Microarray analysis of human keratinocytes from different anatomic sites reveals site-specific immune signaling and responses to human papillomavirus type 16 transfection. *Mol Med* 2018; 24(1): 23, <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0022-9>.
72. Chatterjee S., Do Kang S., Alam S., Salzberg A.C., Milici J., van der Burg S.H., Freeman W., Meyers C. Tissue-specific gene expression during productive human papillomavirus 16 infection of cervical, foreskin, and tonsil epithelium. *J Virol* 2019; 93(17): e00915-19, <https://doi.org/10.1128/jvi.00915-19>.
73. Villa P.L., Jackson R., Eade S., Escott N., Zehbe I. Isolation of biopsy-derived, human cervical keratinocytes propagated as monolayer and organoid cultures. *Sci Rep* 2018; 8(1): 17869, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36150-4>.
74. Deng H., Hillpot E., Mondal S., Khurana K.K., Woodworth C.D. HPV16-immortalized cells from human transformation zone and endocervix are more dysplastic than ectocervical cells in organotypic culture. *Sci Rep* 2018; 8(1): 15402, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33865-2>.
75. Zuk A.K., Wen X., Dilworth S., Li D., Ghali L. Modeling and validating three dimensional human normal cervix and cervical cancer tissues in vitro. *J Biomed Res* 2017; 31(3): 240–247.
76. Hougardy B.M., Reesink-Peters N., van den Heuvel F.A., ten Hoor K.A., Hollema H., de Vries E.G., de Jong S., van der Zee A.G. A robust ex vivo model for evaluation of induction of apoptosis by rhTRAIL in combination with proteasome inhibitor MG132 in human premalignant cervical explants. *Int J Cancer* 2008; 123(6): 1457–1465, <https://doi.org/10.1002/ijc.23684>.
77. Baird J.R., Bell R.B., Troesch V., Friedman D., Bambina S., Kramer G., Blair T.C., Medler T., Wu Y., Sun Z., de Grujil T.D., van de Ven R., Leidner R.S., Crittenden M.R., Gough M.J. Evaluation of explant responses to STING ligands: personalized immunosurgical therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2018; 78(21): 6308–6319, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-1652>.
78. Hiroshima Y., Maawy A., Zhang Y., Zhang N., Murakami T., Chishima T., Tanaka K., Ichikawa Y., Bouvet M., Endo I., Hoffman R.M. Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy. *Oncotarget* 2016; 7(44): 71696–71702, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12322>.
79. Chaudary N., Jaluba K., Pintilie M., Hill R.P. Establishment of orthotopic primary cervix cancer xenografts. *Methods Mol Biol* 2015; 1249: 381–391, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2013-6_28.
80. Larmour L.I., Cousins F.L., Teague J.A., Deane J.A., Jobling T.W., Gargett C.E. A patient derived xenograft model of cervical cancer and cervical dysplasia. *PLoS One* 2018; 13(10): e0206539, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206539>.
81. Rofstad E.K., Simonsen T.G., Huang R., Andersen L.M., Galappathi K., Ellingsen C., Wegner C.S., Hauge A., Gaustad J.V. Patient-derived xenograft models of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Lett* 2016; 373(2): 147–155, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.047>.
82. Wegner C.S., Hauge A., Andersen L.M.K., Huang R., Simonsen T.G., Gaustad J.V., Rofstad E.K. Increasing aggressiveness of patient-derived xenograft models of cervix carcinoma during serial transplantation. *Oncotarget* 2018; 9(30): 21036–21051, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24783>.
83. Zhang X., Yang P., Luo X., Su C., Chen Y., Zhao L., Wei L., Zeng H., Varghese Z., Moorhead J.F., Ruan X.Z., Chen Y. High olive oil diets enhance cervical tumour growth in mice: transcriptome analysis for potential candidate genes and pathways. *Lipids Health Dis* 2019; 18(1): 76, <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1023-6>.
84. Chu J., Gao J., Wang J., Li L., Chen G., Dang J., Wang Z., Jin Z., Liu X. Mechanism of hydrogen on cervical cancer suppression revealed by high-throughput RNA sequencing. *Oncol Rep* 2021; 46(1): 141, <https://doi.org/10.3892/or.2021.8092>.
85. Kang H.N., Kim J.H., Park A.Y., Choi J.W., Lim S.M., Kim J., Shin E.J., Hong M.H., Pyo K.H., Yun M.R., Kim D.H., Lee H., Yoon S.O., Kim D.H., Park Y.M., Byeon H.K., Jung I., Paik S., Koh Y.W., Cho B.C., Kim H.R. Establishment and characterization of patient-derived xenografts as preclinical models for head and neck cancer. *BMC Cancer* 2020; 20(1): 316, <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06786-5>.
86. Tinhofer I., Braunholz D., Klinghammer K. Preclinical models of head and neck squamous cell carcinoma for a basic understanding of cancer biology and its translation into efficient therapies. *Cancers Head Neck* 2020; 5: 9, <https://doi.org/10.1186/s41199-020-00056-4>.
87. Facompre N.D., Sahu V., Montone K.T., Harmeyer K.M., Nakagawa H., Rustgi A.K., Weinstein G.S., Gimotty P.A., Basu D. Barriers to generating PDX models of HPV-related head and neck cancer. *Laryngoscope* 2017; 127(12): 2777–2783, <https://doi.org/10.1002/lary.26679>.
88. Lee T.W., Lai A., Harms J.K., Singleton D.C., Dickson B.D., Macann A.M.J., Hay M.P., Jamieson S.M.F. Patient-derived xenograft and organoid models for precision medicine targeting of the tumour microenvironment in head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12(12): 3743, <https://doi.org/10.3390/cancers12123743>.
89. Keysar S.B., Le P.N., Miller B., Jackson B.C., Eagles J.R., Nieto C., Kim J., Tang B., Glogowska M.J., Morton J.J., Padilla-Just N., Gomez K., Warnock E., Reisinger J., Arcaroli J.J., Messersmith W.A., Wakefield L.M., Gao D., Tan A.C., Serracino H., Vasiliou V., Roop D.R., Wang X.J., Jimeno A. Regulation of head and neck squamous cancer stem cells by PI3K and SOX2. *J Natl Cancer Inst* 2016; 109(1): djw189, <https://doi.org/10.1093/jnci/djw189>.
90. Lilja-Fischer J.K., Ulhøi B.P., Alsner J., Stougaard M., Thomsen M.S., Busk M., Lassen P., Steiniche T., Nielsen V.E., Overgaard J. Characterization and radiosensitivity of HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma patient-derived xenografts. *Acta Oncol* 2019; 58(10): 1489–1494, <https://doi.org/10.1080/0284186x.2019.1660802>.
91. Klinghammer K., Otto R., Raguse J.D., Albers A.E., Tinhofer I., Fichtner I., Leser U., Keilholz U., Hoffmann J. Basal

- subtype is predictive for response to cetuximab treatment in patient-derived xenografts of squamous cell head and neck cancer. *Int J Cancer* 2017; 141(6): 1215–1221, <https://doi.org/10.1002/ijc.30808>.
92. Yegodayev K.M., Novoplansky O., Golden A., Prasad M., Levin L., Jagadeeshan S., Zorea J., Dimitstein O., Joshua B.Z., Cohen L., Khrameeva E., Elkabets M. TGF-beta-activated cancer-associated fibroblasts limit cetuximab efficacy in preclinical models of head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12(2): 339, <https://doi.org/10.3390/cancers12020339>.
93. Ko Y.C., Lai T.Y., Hsu S.C., Wang F.H., Su S.Y., Chen Y.L., Tsai M.L., Wu C.C., Hsiao J.R., Chang J.Y., Wu Y.M., Robinson D.R., Lin C.Y., Lin S.F. Index of cancer-associated fibroblasts is superior to the epithelial-mesenchymal transition score in prognosis prediction. *Cancers (Basel)* 2020; 12(7): 1718, <https://doi.org/10.3390/cancers12071718>.
94. Bhatia S., Sharma J., Bukkapatnam S., Oweida A., Lennon S., Phan A., Milner D., Uyanga N., Jimeno A., Raben D., Somerset H., Heasley L., Karam S.D. Inhibition of EphB4–Ephrin-B2 signaling enhances response to cetuximab-radiation therapy in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2018; 24(18): 4539–4550, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-0327>.
95. Kim H.R., Kang H.N., Yun M.R., Ju K.Y., Choi J.W., Jung D.M., Pyo K.H., Hong M.H., Ahn M.J., Sun J.M., Kim H.S., Kim J., Yoo J., Kim K.R., Koh Y.W., Kim S.H., Choi E.C., Yoon S.O., Shim H.S., Paik S., Kim T.M., Cho B.C. Mouse-human co-clinical trials demonstrate superior anti-tumour effects of buparlisib (BKM120) and cetuximab combination in squamous cell carcinoma of head and neck. *Br J Cancer* 2020; 123(12): 1720–1729, <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01074-2>.
96. Campbell K.M., Lin T., Zolkind P., Barnell E.K., Skidmore Z.L., Winkler A.E., Law J.H., Mardis E.R., Wartman L.D., Adkins D.R., Chernock R.D., Griffith M., Uppaluri R., Griffith O.L. Oral cavity squamous cell carcinoma xenografts retain complex genotypes and intertumor molecular heterogeneity. *Cell Rep* 2018; 24(8): 2167–2178, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.058>.
97. Cospier P.F., Abel L., Lee Y.S., Paz C., Kaushik S., Nickel K.P., Alexandridis R., Scott J.G., Bruce J.Y., Kimple R.J. Patient derived models to study head and neck cancer radiation response. *Cancers (Basel)* 2020; 12(2): 419, <https://doi.org/10.3390/cancers12020419>.
98. Liu T., Delavaux C., Zhang Y.S. 3D bioprinting for oncology applications. *J 3D Print Med* 2019; 3(2): 55–58, <https://doi.org/10.2217/3dp-2019-0004>.
99. Cao X., Ashfaq R., Cheng F., Maharjan S., Li J., Ying G., Hassan S., Xiao H., Yue K., Zhang Y.S. A tumor-on-a-chip system with bioprinted blood and lymphatic vessel pair. *Adv Funct Mater* 2019; 29(31): 1807173, <https://doi.org/10.1002/adfm.201807173>.
100. Meng F., Meyer C.M., Joung D., Vallera D.A., McAlpine M.C., Panoskaltsis-Mortari A. 3D bioprinted in vitro metastatic models via reconstruction of tumor microenvironments. *Adv Mater* 2019; 31(10): e1806899, <https://doi.org/10.1002/adma.201806899>.
101. Xie F., Sun L., Pang Y., Xu G., Jin B., Xu H., Lu X., Xu Y., Du S., Wang Y., Feng S., Sang X., Zhong S., Wang X., Sun W., Zhao H., Zhang H., Yang H., Huang P., Mao Y. Three-dimensional bio-printing of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine. *Biomaterials* 2021; 265: 120416, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120416>.
102. Pang Y., Mao S.S., Yao R., He J.Y., Zhou Z.Z., Feng L., Zhang K.T., Cheng S.J., Sun W. TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition in an advanced cervical tumor model by 3D printing. *Biofabrication* 2018; 10(4): 044102, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aadbde>.
103. Gospodinova A., Nankov V., Tomov S., Redzheb M., Petrov P.D. Extrusion bioprinting of hydroxyethylcellulose-based bioink for cervical tumor model. *Carbohydr Polym* 2021; 260: 117793, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117793>.
104. Almela T., Al-Sahaf S., Brook I.M., Khoshroo K., Rasoulianboroujeni M., Fahimipour F., Tahriri M., Dashtimoghadam E., Bolt R., Tayebi L., Moharamzadeh K. 3D printed tissue engineered model for bone invasion of oral cancer. *Tissue Cell* 2018; 52: 71–77, <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.009>.
105. Li X., He J., Shao M., Cui B., Peng F., Li J., Ran Y., Jin D., Kong J., Chang J., Duan L., Yang X., Luo Y., Lu Y., Lin B., Liu T. Downregulation of miR-218-5p promotes invasion of oral squamous cell carcinoma cells via activation of CD44-ROCK signaling. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 646–654, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.151>.
106. Wang N., Wang J., Meng X., Bao Y., Wang S., Li T. 3D microfluidic in vitro model and bioinformatics integration to study the effects of Spatholobi Caulis tannin in cervical cancer. *Sci Rep* 2018; 8(1): 12285, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29848-y>.