

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЕДИНИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КАК ОСНОВА ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© Т. Г. Рукша,¹ Е. Ю. Сергеева, А. В. Комина

Красноярский государственный медицинский университет, Красноярск, 660022;

¹*электронный адрес: tatyana_ruksha@mail.ru*

Культирование и анализ единичных опухолевых клеток становятся все более актуальными в связи с гетерогенностью опухолей, являющейся основной причиной неэффективности таргетной терапии при онкологических заболеваниях. Решение этой проблемы — динамическая оценка состояния и состава опухоли. Сравнительное исследование единичных опухолевых клеток позволяет выявить принципиальные различия между опухолевыми клонами, ключевые молекулы-мишени для противоопухолевых препаратов, создать индивидуальные алгоритмы лечения для пациентов. Для получения единичных опухолевых клеток используют проточную цитометрию, магнитный сортинг, микрофлюидные системы и лазерную микродиссекцию. Анализ единичных опухолевых клеток осуществляется посредством высокопроизводительных методов: секвенирования транскриптома, секвенирования экзома, что позволяет оценить не только качественные, но и количественные изменения генов, прежде всего — мутационный статус клетки. Применение высокопроизводительных методов анализа единичных стволовых опухолевых клеток позволило выявить гены, играющие важную роль в опухолевой трансформации, показать гетерогенность популяции стволовых опухолевых клеток, обнаружить клинически значимые мутации в популяции циркулирующих опухолевых клеток и определить маркеры резистентности к противоопухолевым препаратам. Использование высокопроизводительных методов анализа для изучения опухолевого микроокружения позволяет оценить специфику взаимодействий между опухолевыми клетками и ассоциированными с опухолью компонентами микроокружения. Таким образом, применение и совершенствование современных биотехнологических подходов позволят решить проблемы, обусловленные опухолевой гетерогенностью, а значимость полученных с их помощью результатов будет повышаться как для клеточной биологии, так и для клинической фармакологии и онкологии.

Ключевые слова: опухолевая гетерогенность, стволовые опухолевые клетки, циркулирующие опухолевые клетки, высокопроизводительные методы, секвенирование.

Секвенирование генома человека и последующее использование данного подхода для секвенирования геномов клеток злокачественных новообразований привели к созданию новых способов противоопухолевой терапии на основе целенаправленного воздействия на молекулы-мишени с целью ингибирования пролиферации клеток опухоли. Применение таргетной терапии при ряде онкологических заболеваний (в частности, при немелкоклеточном раке легкого, меланоме кожи, раке молочной железы и колоректальном раке) приводит к повышению показателей выживаемости пациентов (Ndoye, Weeraratna, 2016; Notsuda et al., 2017; Sambhi et al., 2017; Takegawa et al., 2017). Вместе с тем, как стало понятно в дальнейшем, эффективное использование таргетных препаратов существенно ограничено гетерогенностью опухолей, лежащей в основе ключевых механизмов развития резистентности. Таким образом, использование статичных режимов противоопухолевой терапии вызывает гибель отдельных субклонов опухоли, но при этом может не оказывать воздействия на другие субклоны опухоли. Резистентные популяции опухолевых клеток могут давать начало следующим этапам роста и прогрессии опухоли. Эти на-

блюдения привели к заключению о том, что подходы к противоопухолевой терапии должны быть основаны на динамической оценке состояния (состава) опухоли для выбора наиболее эффективных способов супрессии роста новообразования (Jonsson et al., 2017). В данном обзоре изложены основные аспекты разработки подходов к противоопухолевой терапии на основе вышеуказанной парадигмы, описаны проблемы внедрения этих технологий в клиническую практику и способы их устранения.

Косвенными признаками гетерогенности опухолевой ткани являются хорошо известные врачам различия в течении и исходах онкологических заболеваний одного и того же вида у разных пациентов. Новообразование может существенно различаться по гистотипу, а также по морфологическим характеристикам отдельных клеток, в том числе в пределах одного гистотипа опухоли. Еще в 1967 г. Уиллис (Willis) предположил, что в основе развития опухоли могут лежать несколько очагов пролиферации, клетки которых принадлежат к разным клонам. В 1988 г. Ноувелл (Nowell) представил данные о переходе моноклоновой стадии заболевания в поликлоновую вследствие вторичных мутаций (Hesketh, 2013). Данные

Сравнение методов получения единичных клеток для высокопроизводительного анализа

Метод	Принцип метода	Преимущества	Недостатки	Литературный источник
Проточная цитометрия	Специфическая окраска клеток флуоресцентно мечеными антителами, специфичными к маркерным белкам, с последующим разделением субклонов по длине волны или интенсивности флуоресценции	Позволяет оценивать основные процессы в клетке: апоптоз, пролиферацию, быстро и точно разделять клоны клеток по различным характеристикам	Не позволяет одновременно оценивать много параметров из-за перекрытия спектров флуоресценции (до 8—12 параметров); высокая стоимость в сравнении с альтернативными методами	Perfetto et al., 2004; Bendall et al., 2012
Масс-цитометрия	Мечение клеток антителами с изотопными метками с последующим разделением по изотопным пикам	Позволяет одновременно анализировать множество параметров, используя множество маркеров	Повышенные требования к чистоте работы, отсутствию контаминации, ограниченный спектр коммерческих меток, сложная структура анализа данных	Bendall et al., 2011, 2012
Магнитный сортинг (MACS)	Мечение белков в клетках специфическими антителами, конъюгированными с магнитными частицами, с последующим осаждением клеток-мишеней на магните	Простота, экономическая эффективность	Высокая стоимость системы, расходных материалов, зависимость качества разделения от сродства антител к мишеневому белку	Gross et al., 2015; Hu et al., 2016
Флуоресцентный сортинг (FACS)	Ассоциация методов проточной цитометрии и сортирга	Возможность получения клеточных клонов высокой степени чистоты	Требуется подбор антител, необходимо большое стартовое количество материала	Basu et al., 2010; Dalerba et al., 2011
Микрофлюидные системы	Группа устройств, позволяющих разделять, культивировать и анализировать единичные клетки в микро- и нанообъемах	Широкий спектр исследований при минимальных объемах образцов, возможность проведения исследований биологических процессов в динамике	Высокая стоимость отдельных элементов систем, затруднения с повторным использованием расходных материалов (стерилизация)	Lee et al., 2011; Valencia et al., 2012; Deng et al., 2014
Лазерная микродиссекция (LCM)	Отделение единичных клеток или их компартментов при помощи лазерного луча с визуализацией с помощью микроскопа	Позволяет получить единичные клетки из плотных тканей и тканей, фиксированных формалином и заключенных в парафин, быстрое получение единичных клеток	Высокая стоимость оборудования и дополнительных материалов, высокие требования к микроскопической визуализации	Curran et al., 2000; Gross et al., 2015

концепции на сегодняшний день претерпели существенные изменения, но они отражают постепенное развитие понимания феномена гетерогенности опухолевой ткани и его клинической значимости.

Одним из актуальных подходов в решении проблемы резистентности опухоли к терапии является сравнительный анализ единичных опухолевых клеток, который должен привести либо к выявлению критически важных различий между опухолевыми клонами, идентификации ключевых молекул в отношении чувствительности к противоопухолевым агентам, либо к созданию новых алгоритмов для выявления индивидуальной чувствительности отдельного пациента к терапии.

Методы выделения единичных опухолевых клеток

Для анализа единичных клеток важным является соблюдение трех требований: 1) выбранные клетки обязательно должны содержать полный геном или транскриптом; 2) обязательно наличие («попадание») содержимого

единичных клеток в анализируемой пробе; 3) исключение возможности контаминации образца биологическим материалом других клеток.

Таким образом, репрезентативные результаты можно получить при обеспечении не только адекватного количества, но и качества материала. Механическое повреждение клеток, деградация нуклеиновых кислот, а также использование таких распространенных фиксаторов, как формалин, могут в значительной степени влиять на качество образца и собственно результата в дальнейшем (Kronis, El-Heliebi, 2015).

Чтобы получить интересующие исследователя единичные опухолевые клетки, существует несколько способов — проточная цитометрия, магнитный сортирг, микрофлюидные системы и лазерная микродиссекция (см. таблицу). Предварительно, до применения проточной цитометрии или микрофлюидных технологий, необходимо получить суспензию отдельных опухолевых клеток с помощью механического измельчения ткани или использования гидролитических ферментов — коллагеназы. Помимо ферментативного метода для анализа единичных клеток можно использовать выделение ядер клеток.

С этой целью образцы ткани опухоли объемом до 1 мм³ отсортировываются в лизирующем буфере, содержащем DAPI (флуоресцентный ДНК-интеркалирующий краситель) (Saadatpou et al., 2015).

Лазерная микродиссекция позволяет выделять отдельные клетки из тканей, фиксированных в формалине и залитых в парафин, а также из замороженных тканей. Обычно исследователь маркирует интересующую область на срезе, а затем извлекает из ткани данный комплекс клеток с помощью углекислотного лазера. Преимуществом данного метода является возможность получения клеток из фрагмента ткани, представляющего интерес для исследователя. С другой стороны, недостатком данного метода является возможность повреждения клеток и их ядер лазером, что может в дальнейшем приводить к искажению результатов.

С помощью проточной цитометрии единичные опухолевые клетки могут быть выделены из предварительно полученной суспензии клеток из свежих тканей и даже могут быть распределены по фракциям посредством меченых флуоресцентными антителами специфически экспрессирующихся антигенов (Schmidt, Efferth, 2016). Схожая технология лежит в основе магнитного сортирования, только для выделения интересующих популяций клеток используются антитела, связанные с магнитными частицами.

Выделение единичных опухолевых клеток с помощью микрофлюидных устройств основано на анализе образцов в ультратонких объемах и применении микрофлюидных клеточных сортеров (Ying, Wang, 2013). Миниатюризация объемов образца и реагентов является ключевым преимуществом при использовании микрофлюидных устройств. Традиционно микрофлюидный модуль включает в себя канал, обеспечивающий ламинарный поток клеток, устройство для гидродинамической фокусировки входящего потока анализируемого раствора, устройство для капельного перемешиваемого поступления образца, регулятор направления жидкости и наноканалы для пространственной ориентации макромолекул с целью их дальнейшей детекции (Streets, Huang, 2014). Применение данного способа позволяет повысить чувствительность метода и снизить уровень погрешностей. Недостатком данного подхода является сложность сочетания непосредственно приборов для микрофлюидики с другими устройствами, работающими при более низком разрешении (Wang et al., 2015).

В единичной клетке содержится количество ДНК, недостаточное для осуществления анализа высокопроизводительными методами. Считается, что в среднем одна клетка содержит 6 пг ДНК и 10—30 пг тотальной РНК (из которой только 5 % является мРНК) (Zhang et al., 2016). Если же дальнейшее исследование предполагает применение высокопроизводительных методов, то требуется выполнение преамплификации. В частности, для анализа РНК необходимо выполнение реакции обратной транскрипции тотальной РНК. Это может быть осуществлено в один или два этапа, для анализа единичных клеток предпочтительнее постановка двухэтапной реакции обратной транскрипции, так как это позволяет в дальнейшем разделить кДНК для выполнения различных исследований. При осуществлении одноэтапной реакции обратной транскрипции такое невозможно, так как в этом случае реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция осуществляются последовательно в одной и той же реакционной смеси.

Помимо этого, предварительное осуществление полногеномной амплификации требуется для получения необходимого количества ДНК. Выполнение полногеномной амплификации возможно несколькими способами: амплификация с множественным замещением цепи (multiple displacement amplification), полимеразная цепная реакция, а также сочетание двух данных методов.

При применении амплификации с множественным замещением цепи используются рэндом-праймеры — случайные шестинуклеотидные праймеры, посредством которых синтезируются короткие перекрывающиеся фрагменты кДНК, в целом комплементарные всей мРНК. Обычно в качестве фермента используется ф29 ДНК-полимераза, получаемая из бактериофага ф29 *Bacillus subtilis* и обладающая высокой процессивностью и точностью репликации (Cardoso et al., 2004): данный фермент добавляет 70 тыс. нуклеотидов каждый раз, когда соединяется с комплексом праймер—матрица. Это позволяет полимеразе постоянно копировать матрицу, одновременно увеличивая последовательность молекулы кДНК (Lasken, 2009). Выполнение полногеномной амплификации на основе полимеразной цепной реакции является менее уязвимым к повреждению ДНК, поэтому приводит к более высокой эффективности по сравнению с технологией амплификации с множественным замещением цепи (Vabayan et al., 2016). Поэтому является обоснованным создание способов полногеномной амплификации с использованием этих двух технологий.

Применение в дальнейшем высокопроизводительных методов позволяет изучать механизмы межклеточных взаимодействий, цитотоксичности противоопухолевых препаратов, исследовать уникальные профили секретируемых клетками молекул (Rakszewska et al., 2014).

Анализ единичных опухолевых клеток

Впервые результаты, полученные при анализе транскриптома единичных клеток с помощью секвенирования, были опубликованы Тангом с соавторами в 2009 г. (Tang et al., 2009). В 2011 г. впервые были представлены результаты исследования единичных опухолевых клеток на основе секвенирования, при этом авторы провели данный анализ в тканях опухолей двух видов — трижды негативной протоковой карциномы молочной железы и диссеминированной карциномы печени. Исследование проводили с предварительной сепарацией опухоли на секторы с учетом их анатомической структуры. Дальнейшее разделение клеточных популяций осуществляли с помощью проточной цитометрии на основе оценки плоидности ядер. Авторы выявили отчетливое разделение анеуплоидных клеток метастазов и первичной опухоли, указывая на то, что эти два пула клеток развивались отдельно с момента формирования вторичных очагов (Navin et al., 2011).

Приблизительно с 2012 г. спектр исследований в отношении анализа единичных опухолевых клеток значительно расширяется. Выполненный в единичных опухолевых клетках почечно-клеточного рака и клетках нормальной ткани анализ экзосом показал, что только незначительная часть клеток характеризуется высокой частотой мутаций. Наиболее часто встречались мутации с частотой 0—5 %, что указывает на широкую распространенность так называемых пассажирских мутаций в опухолевых клетках. 15—20 % мутаций были схожими для

всех анализируемых опухолевых клеток, а 70 % оказались специфичными для каждой отдельной клетки. При более детальном анализе было выявлено превалирование замен $C \cdot G \rightarrow T \cdot A$, описанных ранее как типичных для светлоклеточного подтипа почечно-клеточной карциномы (Xu et al., 2012). Сравнительный анализ результатов секвенирования экзона опухоль-иницирующих клеток рака мочевого пузыря (фенотип EPCAM+ CD44+ CD49f+) первичной опухоли и регионарных лимфатических узлов показал значительное соответствие по средней частоте аллелей. Процедура клеточного сортирования позволила выявить единичные клетки с вышеуказанным фенотипом в лимфатических узлах при отсутствии изменений, в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, что подтверждает возможность и актуальность сочетанного применения технологий выделения единичных клеток посредством сортирования и их анализа на основе секвенирования нового поколения для диагностики микрометастазов (Prado et al., 2017).

Данные подходы также позволяют анализировать не только качественное, но и количественное содержание копий генов. В качестве примера можно привести определение транслокации $t(14;18)$, в результате которой наблюдается повышение экспрессии апоптозоассоциированного гена *BCL2*. Известно, что данная мутация может встречаться у здоровых людей и в то же время диагностируется у 80 % пациентов с фолликулярной лимфомой, а также в 25 % случаев у больных с крупноклеточной В-клеточной лимфомой. При использовании цифровой ПЦП определено, что у здоровых лиц определяется в 9 мкг $\sim 3 \cdot 10^6$ копий $t(14;18)$ (Shuga et al., 2013), что может быть применено в диагностике лимфом в дальнейшем.

Еще одним перспективным подходом в системной биологии является интеграция данных, полученных посредством анализа высокопроизводительными методами единичных клеток на различных уровнях, например сравнительного анализа результатов прочтения генома и транскриптома. Исследование копийности генов 8-й хромосомы и соотношение этого с уровнем мРНК в единичных клетках показали, что экспрессия генов коррелирует с числом копий соответствующего участка генома. Помимо этого, гены, характеризующиеся большей вариабельностью в числе транскриптов между клетками, обычно имеют отношение к участкам генома с пониженным числом копий, и наоборот. Данный факт может указывать на влияние вариаций числа копий генов на экспрессию генов (Dey et al., 2015).

Применение высокопроизводительных методов для определения особенностей опухолевых стволовых клеток

Особую важность анализ единичных опухолевых клеток приобрел в связи с развитием учения об опухолевых стволовых клетках. Опухолевые стволовые клетки (опухоль-иницирующие клетки) рассматриваются как небольшая популяция опухолевых клеток, способная к формированию опухоли, поддержанию численности опухолевых клеток, а также появлению гетерогенных клонов опухолевых клеток, составляющих собственно злокачественное новообразование (Abbaszadegan et al., 2017). Считается, что опухоль-иницирующие клетки могут быть циркулирующими (преимущественно в периферической

крови) или статичными (локализуясь в тканях различных органов). При этом опухоль-иницирующие клетки характеризуются повышенной резистентностью к химиотерапевтическим средствам за счет нескольких механизмов, например посредством функционирования в них ABC-транспортных белков (Dean et al., 2005).

В эксперименте с иммортализованными стволовыми клетками печени посредством повышения экспрессии онкогена MYC последние были трансформированы в опухолевые клетки. Выполненный далее анализ транскриптома выявил более 1000 различно экспрессирующихся генов, связанных практически со всеми аспектами жизнедеятельности клеток — метаболизм, адгезия, рост и деление, клеточный цикл. При этом было выявлено 6 генов (*CDO1*, *C22orf39*, *DKK2*, *ENPEP*, *GPX6* и *SRPX2*), экспрессия которых была полностью прекращена в опухолевых стволовых клетках. На основе полученных данных авторы предполагают, что данные гены также могут играть важную роль в опухолевой трансформации (Aravalli et al., 2015).

Анализ 59 опухолевых клеток, полученных от 3 пациентов с раком эпителия мочевого пузыря, определил клональное сходство нормальных эпителиальных клеток и клеток опухоли. В стволовых опухолевых клетках было выявлено шесть мутаций, не описанных ранее для данного вида опухоли. Дальнейшее одновременное воссоздание при помощи технологии редактирования генома трех из вышеуказанных мутаций — в генах *ARID1A*, *GPRC5A* и *MLL2* — вызывало повышение способности клеток к самообновлению и формированию опухоли (Yang et al., 2017). При анализе единичных клеток, полученных от пациента с BRAF/NRAS-негативной меланомой, на основе РНК-секвенирования были выявлены три основные группы разновидностей опухолевых клеток — стромальный, пролиферативный и пигментный типы. При этом отдельной субпопуляции опухолевых стволовых клеток определено не было, но 10 % клеток имели повышенную экспрессию ABC-транспортеров, а также другого маркера опухолевых стволовых клеток — альдегиддегидрогеназы (Gerber et al., 2017).

И совсем недавно было показано, что сама популяция опухолевых стволовых клеток может быть весьма гетерогенной. Например, при хроническом миелолейкозе опухолевые стволовые клетки CD45RA⁻ и CD26⁺ были наименее чувствительны к тирозинкиназным ингибиторам. В итоге авторы определили популяцию опухолевых стволовых клеток Lin-CD34⁺CD38^{-low}CD45RA⁻cKIT-CD26⁺ как наиболее значимую мишень с точки зрения повышения эффективности терапии (Warfvinge et al., 2017).

Клиническая значимость исследований циркулирующих опухолевых клеток высокопроизводительными методами

Несомненную важность в отношении разработки новых методов диагностики новообразований, определения маркеров для прогнозирования течения данных заболеваний и ответа на противоопухолевую терапию имеет анализ как единичных циркулирующих опухолевых клеток, так и их РНК и ДНК, циркулирующих в периферической крови. Циркулирующие опухолевые клетки представляют собой гетерогенную популяцию опухолевых клеток, распространяющихся посредством кровотока

и являющихся потенциальным источником развития метастазов. Пул циркулирующих опухолевых клеток неоднороден и может быть представлен не только эпителиальными опухолевыми клетками, но также опухолевыми клетками, находящимися в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода, гибридными (ЭМП+/эпит+) клетками, циркулирующими опухолевыми стволовыми клетками. Циркулирующие стволовые клетки могут быть единичными и организованными в кластеры (Jia et al., 2017).

Определение мутационного статуса циркулирующих опухолевых клеток является привлекательным с точки зрения определения клинически значимых мутаций, например при HER2-негативном раке молочной железы, мутаций в 9-м и 20-м экзонах гена *PIK3CA*, что необходимо для прогнозирования развития резистентности к таргетной терапии у таких пациентов (Gasch et al., 2016).

У пациентов с раком поджелудочной железы единичные опухолевые клетки были проанализированы с применением методов NanoVelco-лазерной микродиссекции, полногеномной амплификации и секвенирования по Сэнгеру. Для анализа было выбрано 385 единичных клеток, 163 из которых были получены из клеточных культур, а 222 — из периферической крови 12 KRAS-позитивных пациентов. В клеточных культурах в 67 % мутации были гомозиготными, 38 % — гетерозиготными, в образцах опухоли, полученных от пациентов, мутации были обнаружены в 27.7 % случаев (Court et al., 2016). На основе микрофлюидных устройств было выполнено секвенирование РНК единичных циркулирующих опухолевых клеток рака поджелудочной железы. Дальнейший кластерный анализ показал, что в циркулирующих опухолевых клетках присутствуют как эпителиальные (цитокератины), так и мезенхимальные маркеры (виментин) — так называемый феномен «бифенотипического состояния». Определялась aberrantная экспрессия белков, связанных с инвазией и миграцией клеток, в частности белка Sparc, что отличает циркулирующие опухолевые клетки от клеток первичной опухоли и клеточных культур данного типа опухоли. Помимо этого, циркулирующие опухолевые клетки характеризовались низким уровнем экспрессии генов, связанных с пролиферацией, но при этом определялся высокий уровень транскриптов генов эпителиально-мезенхимального перехода, что может быть связано с возможностью циркулирующих опухолевых клеток давать начало дистантным вторичным опухолевым очагам (Ting et al., 2014).

При раке предстательной железы секвенирование экзона циркулирующих опухолевых клеток позволило выявить порядка 40 % мутаций, специфичных для циркулирующих опухолевых клеток, но не для первичной опухоли (Lack et al., 2017). Схожие результаты были получены в результате РНК-секвенирования 77 циркулирующих клеток, полученных от 13 пациентов с раком предстательной железы (в среднем 6 циркулирующих опухолевых клеток от 1 пациента). Исследование, выполненное с применением микрофлюидных устройств, показало значительную гетерогенность клеток, в том числе в отношении частоты мутаций гена андрогенового рецептора (AR), вариантов сплайсинга РНК (Miyamoto et al., 2015). Обнаружено, что неканоническая активация сигнального пути Wnt снижает антипролиферативный эффект ингибирования AR, супрессия данного сигнального пути приводит к восстановлению эффективности терапевтического воздействия (Miyamoto et al., 2015).

Использование секвенирования нового поколения для анализа статуса 50 опухоль-ассоциированных генов в образцах, полученных от 4 пациентов с метастазирующим раком молочной железы и содержащих по 3—5 опухолевых клеток периферической крови, показало гетерогенность исследуемых клеток, в том числе и полученных от 1 пациента. Наибольшее число мутаций было обнаружено в гене TP53, а несоответствие между мутационным статусом первичной опухоли и циркулирующими опухолевыми клетками наблюдали у 3 пациентов из 4 (De Luca et al., 2016). Другое исследование единичных опухолевых клеток было выполнено с использованием образцов крови 20 пациентов с метастазирующим раком молочной железы. Для анализа использовали 5 или меньшее число клеток, при этом сначала проводили полногеномную амплификацию, затем секвенирование для оценки статуса гена *PIK3CA*, мутации которого встречаются в 30 % случаев рака молочной железы (Elwy et al., 2017). У 18 из 20 пациентов удалось выполнить секвенирование 9-го и 20-го экзонов гена *PIK3CA*, дикий тип был выявлен у 12 пациентов. Из оставшихся 6 обследуемых с мутантным *PIK3CA* гетерогенность в анализируемых клетках определялась у 2 пациентов как потеря гетерозиготности, у 3-го пациента было выявлено три различных варианта исследуемого гена. В 6 из 18 случаев определяли мутацию в первичной опухоли, у 1 пациента было выявлено несоответствие между результатами, полученными для клеток первичной опухоли и для циркулирующих опухолевых клеток периферической крови: в первичной опухоли был выявлен дикий тип *PIK3CA*, в циркулирующих опухолевых клетках была выявлена мутация в 20-м экзоне (Pestrin et al., 2015). Таким образом, с одной стороны, применение технологий анализа единичных опухолевых клеток периферической крови можно расценивать как перспективный подход, так как получаемые результаты в значительной степени можно соотносить с характером генома клеток первичной опухоли; с другой стороны, проблема дискордантных образцов в значительной степени может снижать специфичность данного метода на сегодняшний день.

Применение исследований единичных опухолевых клеток для выбора средств противоопухолевой терапии

Несомненно, большое значение имеет использование высокопроизводительных методов анализа опухолевых клеток для выявления маркеров резистентности. В частности, при раке легких с мутантным геном *EGFR* были выявлены нуклеотидные варианты, связанные с резистентностью к тирозинкиназным ингибиторам (Jia et al., 2013). Полнотранскриптомный анализ с помощью секвенирования единичных клеток метастазирующего рака молочной железы позволил обнаружить незначительные различия между клетками до и после инкубации с противоопухолевым препаратом паклитакселом, а также между резистентными и чувствительными популяциями клеток, но в то же время значительную гетерогенность наблюдали и внутри вышеуказанных групп клеток на уровне единичных клеток. Резистентные к паклитакселу клетки содержали сплайсированные варианты РНК генов, продукты которых участвуют в формировании и стабилизации микротрубочек, а также связаны с процессами адгезии и сигнализацией с поверхности клетки (Lee et al., 2014).

В другом исследовании с помощью секвенирования гена Т-клеточного рецептора у пациентов с опухолями молочной железы оценивали число опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в единице объема до и после лечения иммунотерапевтическими средствами. Было выявлено, что результаты секвенирования коррелируют с данными гистологических исследований на основе окраски образцов опухоли гематоксилином и эозином. Помимо этого, секвенирование Т-клеточного рецептора позволяет получить дополнительные данные о клональном разнообразии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Результаты секвенирования гена Т-клеточного рецептора могут применяться в качестве прогностического фактора при проведении иммунотерапии (Page et al., 2016).

Дополнительно стоит отметить, что для молекулярной и клинической онкологии имеет значение единичный анализ не только собственно опухолевых клеток, но и других «участников» канцерогенеза. На данный момент под этим стоит подразумевать в первую очередь опухолевое микроокружение — его характеристика с помощью высокопроизводительных методов анализа также позволяет лучше представлять специфику межклеточных взаимодействий, происходящих в опухолевом очаге.

Сравнительно недавнее исследование (Reuben et al., 2017) опухолевого микроокружения с помощью проточной цитометрии и с выделением единичных субпопуляций иммунных клеток (Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, В-клетки, нормальные киллеры, дендритные клетки, макрофаги, мастоциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы) показало, что наибольшие различия в уровнях наблюдались среди субпопуляций CD4⁺, CD8⁺ и регулярных Т-клеток. Анализ результатов прочтения генома клеток меланомы и уровня вышеуказанных компонентов опухолевого микроокружения показал, что более высокая мутационная нагрузка коррелирует с повышением числа CD8⁺-клеток в микроокружении, что, по мнению авторов, связано с увеличением возможности появления иммуногенных эпителиев, способных индуцировать антиген-специфичный ответ (Reuben et al., 2017).

Заключение

Таким образом, формирование представления об опухолях как о сложных многоуровневых динамических системах привело к закономерному развитию методов исследования отдельных компонентов данных систем на основе современных биотехнологических подходов. В совокупности с методами биоинформатики подобные подходы позволяют быстрее формировать целостное представление об изменениях, происходящих при прогрессии новообразования.

Вместе с тем на сегодняшний день существует ряд принципиальных факторов, снижающих информативность анализа единичных клеток. В первую очередь речь идет о проблеме возникновения технических артефактов и шумов во время выделения единичных клеток, во время постановки полногеномной амплификации и непосредственного осуществления высокопроизводительных технологий. Данные артефакты необходимо дифференцировать от истинных изменений, имеющих место в анализируемых клетках. Для решения данных проблем уже разработан ряд способов. В частности, для распознавания ложноположительных результатов, возникших при выполнении полногеномной амплификации, тре-

буются выполнение амплификации двух аллелей и вторичное подтверждение данных с помощью повторного анализа исходного образца опухоли. Также для снижения уровня ошибок при секвенировании можно использовать ДНК-штрихкодирование (Hou et al., 2012).

В заключение стоит подчеркнуть еще раз, что перспективность применения высокопроизводительных методов и анализа единичных клеток связана с необходимостью решения проблемы опухолевой гетерогенности. По мере совершенствования вышеуказанных подходов результаты таких исследований будут становиться все более значимыми не только для клеточной биологии, но и для клинической фармакологии и онкологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (договор 16-44-242056/16 от 17.11.2016) и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (соглашение № 11 от 12.08.2016).

Список литературы

- Abbaszadegan M. R., Bagheri V., Razavi M. S., Momtazi A. A., Sahebkar A., Gholamin M. 2017. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: a review. *J. Cell. Physiol.* 232 : 2008—2018.
- Aravalli R. N., Talbot N. C., Steer C. J. 2015. Gene expression profiling of MYC-driven tumor signatures in porcine liver stem cells by transcriptome sequencing. *World J. Gastroenterol.* 21 : 2011—2029.
- Babayan A., Alawi M., Gormley M., Muller V., Wikman H., McMullin R. P., Smirnov D. A., Li W., Geffken M., Pantel K., Joosse S. A. 2016. Comparative study of whole genome amplification and next generation sequencing performance of single cancer cells. *Oncotarget*. Doi: 10.18632/oncotarget.10701.
- Basu S., Campbell H. M., Dittel B. N., Ray A. 2010. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J. Vis. Exp.* 41 : pii: 1546.
- Bendall S. C., Nolan G. P., Roederer M., Chattopadhyay P. K. 2012. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* 33 : 323—332.
- Bendall S. C., Simonds E. F., Qiu P., Amir el-AD., Krutzik P. O., Finck R., Bruggner R. V., Melamed R., Trejo A., Ornatsky O. I., Balderas R. S., Plevritis S. K., Sachs K., Pe'er D., Tanner S. D., Nolan G. P. 2011. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science.* 332 : 687—696.
- Cardoso J., Molenaar L., de Menezes R. X., Rosenberg C., Morreau H., Moslein G., Fodde R., Boer J. M. 2004. Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res.* 32 : e146.
- Court C. M., Ankeny J. S., Sho S., Hou S., Li Q., Hsieh C., Song M., Liao X., Rochefort M. M., Wainberg Z. A., Graeber T. G., Tseng H. R., Tomlinson J. S. 2016. Reality of single circulating tumor cell sequencing for molecular diagnostics in pancreatic cancer. *J. Mol. Diagn.* 18 : 688—696.
- Curran S., McKay J. A., McLeod H. L., Murray G. I. 2000. Laser capture microscopy. *Mol. Pathol.* 53 : 64—68.
- Dalerba P., Kalisky T., Sahoo D., Rajendran P. S., Rothenberg M. E., Leyrat A. A., Sim S., Okamoto J., Johnston D. M., Qian D., Zabala M., Bueno J., Neff N. F., Wang J., Shelton A. A., Visser B., Hisamori S., Shimono Y., van de Wetering M., Clevers H., Clarke M. F., Quake S. R. 2011. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat. Biotechnol.* 29 : 1120—1127.
- Dean M., Fojo T., Bates S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer.* 5 : 275—284.
- De Luca F., Rotunno G., Salvianti F., Galardi F., Pestrin M., Gabellini S., Simi L., Mancini I., Vannucchi A. M., Pazzagli M.,

- Di Leo A., Pinzani P. 2016. Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 7 : 26 107—26 119.
- Deng Y., Zhang Y., Sun S., Wang Z., Wang M., Yu B., Czajkowsky D. M., Liu B., Li Y., Wei W., Shi Q. 2014. An integrated microfluidic chip system for single-cell secretion profiling of rare circulating tumor cells. *Sci. Rep.* 4 : 7499.
- Dey S. S., Kester L., Spanjaard B., Bienko M., van Oudenaarden A. 2015. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat. Biotechnol.* 33 : 285—289.
- Elwy F., Helwa R., El Leithy A. A., Shehab El din Z., Assem M. M., Hassan N. H. 2017. PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients; frequency and clinicopathological perspective in egyptian patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 18 : 57—64.
- Gasch C., Oldopp T., Mauermann O., Gorges T. M., Andreas A., Coith C., Müller V., Fehm T., Janni W., Pantel K., Riethdorf S. 2016. Frequent detection of PIK3CA mutations in single circulating tumor cells of patients suffering from HER2-negative metastatic breast cancer. *Mol. Oncol.* 10 : 1330—1343.
- Gerber T., Willscher E., Loeffler-Wirth H., Hopp L., Schaden-dorf D., Scharthl M., Anderegg U., Camp G., Treutlein B., Binder H., Kunz M., Gerber T., Willscher E., Loeffler-Wirth H., Hopp L., Schaden-dorf D., Scharthl M., Anderegg U., Camp G., Treutlein B., Binder H., Kunz M. 2017. Mapping heterogeneity in patient-derived melanoma cultures by single-cell RNA-seq. *Oncotarget*. 8 : 846—862.
- Gross A., Schoendube J., Zimmermann S., Steeb M., Zengerle R., Koltay P. 2015. Technologies for single-cell isolation. *Int. J. Mol. Sci.* 16 : 16 897—16 919.
- Hesketh R. 2013. Introduction to cancer biology. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 335 p.
- Hou Y., Song L., Zhu P., Zhang B., Tao Y., Xu X., Li F., Wu K., Liang J., Shao D., Wu H., Ye X., Ye C., Wu R., Jian M., Chen Y., Xie W., Zhang R., Chen L., Liu X., Yao X., Zheng H., Yu C., Li Q., Gong Z., Mao M., Yang X., Yang L., Li J., Wang W., Lu Z., Gu N., Laurie G., Bolund L., Kristiansen K., Wang J., Yang H., Li Y., Zhang X., Wang J. 2012. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell*. 148 : 873—885.
- Hu P., Zhang W., Xin H., Deng G. 2016. Single cell isolation and analysis. *Front. Cell Develop. Biol.* 4 : 116.
- Jia P., Jin H., Meador C. B., Xia J., Ohashi K., Liu L., Pirazzoli V., Dahlman K. B., Politi K., Michor F., Zhao Z., Pao W. 2013. Next-generation sequencing of paired tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutant lung cancer cell lines identifies spectrum of DNA changes associated with drug resistance. *Genome Res.* 23 : 1434—1445.
- Jia S., Zhang R., Li Z., Li J. 2017. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*. Doi: 10.18632/oncotarget.17184.
- Jonsson V. D., Blakely C. M., Lin L., Asthana S., Matni N., Olivas V., Pazarentos E., Gubens M. A., Bastian B. C., Taylor B. S., Doyle J. C., Bivona T. G. 2017. Novel computational method for predicting polytherapy switching strategies to overcome tumor heterogeneity and evolution. *Sci. Rep.* 7 : 44 206.
- Kroneis T., El-Heliebi A. 2015. Whole genome amplification by isothermal multiple strand displacement using Phi29 DNA Polymerase. *Methods Mol. Biol.* 1347 : 111—117.
- Lack J., Gillard M., Cam M., Paner G. P., VanderWeele D. J. 2017. Circulating tumor cells capture disease evolution in advanced prostate cancer. *J. Transl. Med.* 15 : 44.
- Lasken R. S. 2009. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method. *Biochem. Soc. Trans.* 37 (Pt 2) : 450—453.
- Lee M. C., Lopez-Diaz F. J., Khan S. Y., Tariq M. A., Dayn Y., Vaske C. J., Radenbaugh A. J., Kim H. J., Emerson B. M., Pourmand N. 2014. Single-cell analyses of transcriptional heterogeneity during drug tolerance transition in cancer cells by RNA sequencing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 111 : E4726—E4735.
- Lee P., Gaige T., Hung P. 2011. Microfluidic systems for live cell imaging. *Methods Cell Biol.* 102 : 77—103.
- Miyamoto D. T., Zheng Y., Wittner B. S., Lee R. J., Zhu H., Broderick K. T., Desai R., Fox D. B., Brannigan B. W., Trautwein J., Arora K. S., Desai N., Dahl D. M., Sequist L. V., Smith M. R., Kapur R., Wu C. L., Shioda T., Ramaswamy S., Ting D. T., Toner M., Maheswaran S., Haber D. A. 2015. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science*. 349 : 1351—1356.
- Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., McIndoo J., Cook K., Stepansky A., Levy D., Esposito D., Muthuswamy L., Krasnitz A., McCombie W. R., Hicks J., Wigler M. 2011. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 472 : 90—94.
- Ndoye A., Weeraratna A. T. 2016. Autophagy — an emerging target for melanoma therapy. *F1000Res*. 5. pii: F1000 Faculty Rev-1888. Doi: 10.12688/f1000research.8347.1.
- Notsuda H., Bradbury P. A., Tsao M. S. 2017. HER2 transmembrane domain mutations: rare new target for non-small cell lung cancer therapy. *J. Thorac. Oncol.* 12 : 422—424.
- Page D. B., Yuan J., Redmond D., Wen Y. H., Durack J. C., Emerson R., Solomon S., Dong Z., Wong P., Comstock C., Diab A., Sung J., Maybody M., Morris E., Brogi E., Morrow M., Sacchini V., Elemento O., Robins H., Patil S., Allison J. P., Wolchok J. D., Hudis C., Norton L., McArthur H. L. 2016. Deep sequencing of T-cell receptor DNA as a biomarker of clonally expanded TILs in breast cancer after immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 4 : 835—844.
- Perfetto S. P., Chattopadhyay P. K., Roederer M. 2004. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4 : 648—655.
- Pestrin M., Salvianti F., Galardi F., De Luca F., Turner N., Malorni L., Pazzagli M., Di Leo A., Pinzani P. 2015. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol. Oncol.* 9 : 749—757.
- Prado K., Zhang K. X., Pellegrini M., Chin A. I. 2017. Sequencing of cancer cell subpopulations identifies micrometastases in a bladder cancer patient. *Oncotarget*. Doi: 10.18632/oncotarget.17312.
- Rakszewska A., Tel J., Chokkalingam V., Huck W. T. S. 2014. One drop at a time: toward droplet microfluidics as a versatile tool for single-cell analysis. *NPG Asia Materials*. 6 : e133.
- Reuben A., Spencer C. N., Prieto P. A., Gopalakrishnan V., Reddy S. M., Miller J. P., Mao X., Petaccia De Macedo M., Chen J., Song X., Jiang H., Chen P.-L., Beird H. C., Garber H. R., Roh W., Wani K., Chen E., Haymaker C., Forget M.-A., Little L. D., Gumbs C., Thornton R. L., Hudgens C. W., Chen W.-S., Austin-Breneman J., Szczepaniak Sloane R., Nezi L., Cogdill A. P., Bernatchez C., Roszik J., Hwu P., Woodman S. E., Chin L., Tawbi H., Davies M. A., Gershenwald J. E., Amaria R. N., Glitza I. C., Diab A., Patel S. P., Hu J., Lee J. E., Grimm E. A., Tetzlaff M. T., Lazar A. J., Wistuba I. I., Clise-Dwyer K., Carter B. W., Zhang J., Futreal P. A., Sharma P., Allison J. P., Cooper Z. A., Wargo J. A. 2017. Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *npj Genomic Medicine*. 2 : Doi: 10.1038/s41525-017-0013-8.
- Saadatpour A., Lai S., Guo G., Yuan G. C. 2015. Single-cell analysis in cancer genomics. *Trends Genet.* 31 : 576—586.
- Sambi M., Haq S., Samuel V., Qorri B., Haxho F., Hill K., Harless W., Szewczuk M. R. 2017. Alternative therapies for metastatic breast cancer: multimodal approach targeting tumor cell heterogeneity. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 9 : 85—93.
- Schmidt F., Efferth T. 2016. Tumor heterogeneity, single-cell sequencing, and drug resistance. *Pharmaceuticals (Basel)*. 9 : E33.
- Shuga J., Zeng Y., Novak R., Lan Q., Tang X., Rothman N., Vermeulen R., Li L., Hubbard A., Zhang L., Mathies R. A., Smith M. T. 2013. Single molecule quantitation and sequencing of rare translocations using microfluidic nested digital PCR. *Nucleic Acids Res.* 41 : e159.
- Streets A. M., Huang Y. 2014. Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 25 : 69—77.
- Takegawa N., Yonesaka K. 2017. HER2 as an emerging onco-target for colorectal cancer treatment after Failure of anti-epider-

mal growth factor receptor therapy. *Clin. Colorectal Cancer*. Doi: 10.1016/j.clcc.2017.03.001.

Tang F., Barbacioru C., Wang Y., Nordman E., Lee C., Xu N., Wang X., Bodeau J., Tuch B. B., Siddiqui A., Lao K., Surani M. A. 2009. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods*. 6 : 377—382.

Ting D. T., Wittner B. S., Ligorio M., Vincent Jordan N., Shah A. M., Miyamoto D. T., Aceto N., Bersani F., Brannigan B. W., Xega K., Ciciliano J. C., Zhu H., MacKenzie O. C., Trautwein J., Arora K. S., Shahid M., Ellis H. L., Qu N., Bardeesy N., Rivera M. N., Deshpande V., Ferrone C. R., Kapur R., Ramaswamy S., Shioda T., Toner M., Maheswaran S., Haber D. A. 2014. Single-cell RNA sequencing identifies extracellular matrix gene expression by pancreatic circulating tumor cells. *Cell Rep*. 8 : 1905—1918.

Valencia P. M., Farokhzad O. C., Karnik R., Langer R. 2012. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol*. 7 : 623—629.

Wang X., Yi L., Mukhitov N., Schrell A. M., Dhumpa R., Roper M. G. 2015. Microfluidics-to-mass spectrometry: a review of coupling methods and applications. *J. Chromatogr. A*. 1382 : 98—116.

Warfvinge R., Geirsonson L., Sommarin M. N. E., Lang S., Karlsson C., Roschupkina T., Stenke L., Stentoft J., Olsson-Stromberg U., Hjorth-Hansen H., Mustjoki S., Soneji S., Richter J., Karlsson G. 2017. Single-cell molecular analysis defines therapy response and immunophenotype of stem cell subpopulations in CML. *Blood*. 129 : 2384—2394.

Xu X., Hou Y., Yin X., Bao L., Tang A., Song L., Li F., Tsang S., Wu K., Wu H., He W., Zeng L., Xing M., Wu R., Jiang H., Liu X., Cao D., Guo G., Hu X., Gui Y., Li Z., Xie W., Sun X., Shi M., Cai Z., Wang B., Zhong M., Li J., Lu Z., Gu N., Zhang X., Goodman L., Bolund L., Wang J., Yang H., Kristiansen K., Dean M., Li Y., Wang J. 2012. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell*. 148 : 886—895.

Yang Z., Li C., Fan Z., Liu H., Zhang X., Cai Z., Xu L., Luo J., Huang Y., He L., Liu C., Wu S. 2017. Single-cell sequencing reveals variants in ARID1A, GPRC5A and MLL2 driving self-renewal of human bladder cancer stem cells. *Eur. Urol*. 71 : 8—12.

Ying L., Wang Q. 2013. Microfluidic chip-based technologies: emerging platforms for cancer diagnosis. *BMC Biotechnol*. 13 : 76.

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., Wu S. 2016. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects. *Cancer Res*. 76 : 1305—1312.

Поступила 16 I 2017

HIGH THROUGHPUT ANALYSIS OF SINGLE CANCER CELLS AS THE BASIS FOR PERSONALIZED THERAPY OF ONCOLOGICAL DISEASES

T. G. Ruksha,¹ E. Yu. Sergeeva, A. V. Komina

Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022;

*e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Cultivation and analysis of single cancer cells are getting more actual due to cancer heterogeneity, the main cause of ineffective target therapy under cancer. The solution of this problem is a dynamic assessment of the state and composition of the tumor. A comparative study of single cancer cells allows identify the principle differences between tumor clones, key molecular targets for anticancer drugs, to create individual treatment algorithms for patients. Flow cytometry, magnetic-activated cell sorting, microfluidic systems, laser capture microdissection are used to separate single cancer cells. Analysis of single cancer cells is carried out by means of the high throughput methods: transcriptome sequencing, exome sequencing. It allows to assess qualitative as well as quantitative gene alterations, and, firstly, gene mutation status of cell. Investigation of single stem cells by the high throughput methods has revealed some genes involved in cancer transformation, and also, heterogeneity of cancer stem cell population. The clinically significant mutations have been shown in circulating tumor cell population. Because of these methods, the markers of anticancer drug resistance have been found out. The use of the high throughput methods for the analysis of tumor microenvironment allows to assess the specificity of cell-cell interactions. Therefore, the use and the improvement of modern biotechnological approaches allows to solve the problems caused by cancer heterogeneity and the received results for cell biology as well as clinical pharmacology and oncology will be getting more significant.

Key words: cancer heterogeneity, cancer stem cells, circulating tumor cells, high throughput methods, sequencing.