

# ВЫДЕЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИЗ ОБРАЗЦОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ПОМОЩЬЮ МИКРОФЛЮИДНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

DOI: 10.17691/stm2020.12.6.08

УДК 616–006.6–033.2–076–036.8–08

Поступила 5.08.2020 г.



**А.Б. Воловецкий**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории нанотераностики Института молекулярной медицины Научно-технологического парка биомедицины<sup>1</sup>;

**П.А. Малинина**, клинический ординатор кафедры онкологии, лучевой терапии и лучевой диагностики<sup>2</sup>;

**А.Ю. Капитанникова**, научный сотрудник лаборатории нанотераностики Института молекулярной медицины Научно-технологического парка биомедицины<sup>1</sup>;

**С.В. Сметанина**, зав. цитологической лабораторией<sup>3</sup>;

**И.А. Круглова**, врач клинической лабораторной диагностики<sup>4</sup>;

**А.В. Масленникова**, д.м.н., зав. кафедрой онкологии, лучевой терапии и лучевой диагностики<sup>2</sup>; профессор кафедры биофизики<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Москва, 119991;

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

<sup>3</sup>Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, ул. Деловая, 11/1, Н. Новгород, 603163;

<sup>4</sup>Городская больница №35, ул. Республиканская, 47, Н. Новгород, 603089;

<sup>5</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950

**Цель исследования** — изучение возможностей инновационной микрофлюидной технологии для выделения циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) из образцов периферической крови онкологических больных.

**Материалы и методы.** С использованием микрофлюидной технологии (на основе специально разработанного силиконового чипа) проведена обработка образцов периферической крови 5 пациентов с диссеминированными злокачественными опухолями эпителиального происхождения. Разделение клеток проходило по критерию их плотности на основе латеральной миграции твердых частиц в жидкости за счет инерционных сил. С помощью разработанной конфигурации чипа выделялись клетки размером более 13 мкм, что больше стандартного размера клеток крови. Полученная целевая фракция клеток была окрашена по методу Романовского–Гимзе. С целью подтверждения эпителиальной природы клеток проведено окрашивание флуоресцентным антителом Anti-Cytokeratin (CK3-6H5)-FITC, для контрастирования ядра применяли краситель DAPI. Для иммуноцитохимического исследования использовали кровь здорового добровольца и опухолевые клетки линии A549.

**Результаты.** Опухолевые клетки в периферической крови (от 1 до 9) удалось выявить у всех 5 пациентов. В образцах крови больных раком гортани, немелкоклеточным раком легкого и раком дна полости рта были идентифицированы кластеры ЦОК из 2–5 клеток. Получено яркое насыщенное окрашивание опухолевых клеток линии A549 с помощью Anti-Cytokeratin (CK3-6H5)-FITC, соответствующее окраске цитоскелета эпителиальных клеток. Успешное контрастирование ядер с помощью красителя DAPI подтвердило, что выделенные целевые клетки при микрофлюидной сепарации не повреждаются.

**Заключение.** Использованная микрофлюидная технология позволяет эффективно выделять неповрежденные ЦОК из периферической крови онкологических больных. Эпителиальная природа выделенных клеток может быть подтверждена с помощью иммуноцитохимического исследования.

**Ключевые слова:** циркулирующие опухолевые клетки; диссеминированный опухолевый процесс; микрофлюидные технологии; жидкостная биопсия; иммуноцитохимическое исследование; флуоресцентные антитела; опухоли эпителиального происхождения; циркулирующие опухолевые кластеры.

**Как цитировать:** Volovetskiy A.B., Malinina P.A., Kapitannikova A.Y., Smetanina S.V., Kruglova I.A., Maslennikova A.V. Isolation of circulating tumor cells from peripheral blood samples of cancer patients using microfluidic technology. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(6): 62–69, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.6.08>

**Для контактов:** Воловецкий Артур Борисович, e-mail: voloveckiy91@gmail.com

## Isolation of Circulating Tumor Cells from Peripheral Blood Samples of Cancer Patients Using Microfluidic Technology

**A.B. Volovetskiy**, PhD, Researcher, Laboratory of Nanotheranostics, Institute for Molecular Medicine, Biomedical Science and Technology Park<sup>1</sup>;

**P.A. Malinina**, Clinical Resident, Department of Oncology, Radiation Therapy and Radiation Diagnostics<sup>2</sup>;

**A.Y. Kapitannikova**, Researcher, Laboratory of Nanoteranology, Institute for Molecular Medicine, Biomedical Science and Technology Park<sup>1</sup>;

**S.V. Smetanina**, Head of the Cytological Laboratory<sup>3</sup>;

**I.A. Kruglova**, Physician of Clinical Laboratory Diagnostics<sup>4</sup>;

**A.V. Maslennikova**, MD, DSc, Head of the Department of Oncology, Radiation Therapy and Radiation Diagnostics<sup>2</sup>; Professor, Department of Biophysics<sup>5</sup>

<sup>1</sup>M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Malaya Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia;

<sup>2</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod Regional Oncologic Dispensary, 11/1 Delovaya St., Nizhny Novgorod, 603163, Russia;

<sup>4</sup>City Hospital No.35, 47 Respublikanskaya St., Nizhny Novgorod, 603089, Russia;

<sup>5</sup>National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

**The aim of the investigation** was to study the potential of an innovative microfluidic technology for the isolation of circulating tumor cells (CTCs) from the peripheral blood samples of cancer patients.

**Materials and Methods.** Peripheral blood samples from 5 patients with disseminated malignant tumors of epithelial origin were processed with the use of the microfluidic technology (based on a specifically designed silicone chip). The cells were separated according to their density criterion based on the lateral migration of solid particles in a liquid due to inertial forces. With the help of the designed chip configuration, the cells over 13  $\mu\text{m}$  in size which is larger than the standard size of blood cells were isolated. The resulting target cell fraction was stained by the Romanowsky–Giemsa method. Staining with the fluorescent Anti-Cytokeratin (CK3-6H5)-FITC antibody was carried out to confirm the epithelial nature of the cells, and the DAPI dye was used to contrast the nucleus. The blood of a healthy volunteer and tumor cells of the A549 line were used for the immunocytochemical studies.

**Results.** The tumor cells in peripheral blood (in the number of 1 to 9) were detected in all 5 patients. CTC clusters of 2–5 cells were identified in blood samples from the patients with laryngeal cancer, non-small cell lung cancer, and floor of the mouth cancer. A bright saturated staining of the A549 tumor cells was obtained using the Anti-Cytokeratin (CK3-6H5)-FITC antibody, corresponding to the staining of the cytoskeleton of epithelial cells. Successful nuclear staining with DAPI confirmed that the isolated target cells are not damaged during microfluidic separation.

**Conclusion.** The microfluidic technology that has been used enables effective intact CTCs isolating from the peripheral blood of cancer patients. The epithelial nature of the isolated cells can be confirmed by immunocytochemical studies.

**Key words:** circulating tumor cells; disseminated tumor process; microfluidic technologies; fluid biopsy; immunocytochemical study; fluorescent antibodies; tumors of epithelial origin; circulating tumor clusters.

### Введение

Способность к метастазированию является одной из ключевых особенностей злокачественных опухолей. Программа метастатического каскада включает в себя последовательно потерю адгезии клетками первичного очага (сайта), миграцию их из первичного очага, активацию эпителиально-мезенхимального перехода, интравазацию, циркуляцию в кровотоке с последующим распространением по кровеносному руслу и завершается экстравазацией и пролиферацией с формированием вторичного метастатического очага (сайта) [1]. Эти «ступени» метастатического

каскада связывает уникальное состояние опухолевой клетки — циркуляция и выживание в системном кровотоке. Часть клеток «оседает» в органах с формированием пула «спящих» опухолевых клеток (dormant cancer cells), другая часть продолжает циркулировать в периферической крови и формирует пул циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) [2]. Впервые ЦОК были обнаружены и задокументированы австралийским патологоанатомом Т.Р. Ashworth более века тому назад [3], однако понимание клинического, а также прогностического и предиктивного значения ЦОК появилось только в последнее десятилетие. Гистологическое исследование биоптатов первичной

и/или метастатической опухоли позволяет выявить ее молекулярный профиль и назначить адекватную лекарственную терапию.

Эта информация может оказаться недостаточной в свете существующих доказательств временной и пространственной гетерогенности новообразования, в особенности той, которая возникает в результате селекции опухолевых клонов «под давлением» противоопухолевой терапии [4]. Проведение повторной процедуры биопсии опухолевого очага не всегда возможно или может быть существенно затруднено технически при локализации его во внутренних органах. Таким образом, ЦОК являются наиболее удобным объектом для динамического исследования, так как могут быть получены путем простого забора периферической крови пациента. Они представляют собой динамически изменяющуюся фракцию клеток, тем самым являясь ключом к пониманию гетерогенности опухоли, биологии метастазирования, и открывают возможности контроля над эволюцией опухоли. Задача выделения ЦОК из образца крови и их последующей характеристики до настоящего времени полностью не решена, что является одним из главных препятствий для реализации их прогностического потенциала в клинике.

В принципе все методы выделения ЦОК можно подразделить на биологические и физические. В основе биологических методов лежит способность опухолевых клеток взаимодействовать со специфическими антителами. В настоящее время этот подход рассматривается как «золотой стандарт» выделения ЦОК с эпителиальным фенотипом, характеризуется высокой воспроизводимостью и специфичностью, а соответствующая технология CellSearch одобрена для клинического применения FDA (Food and Drug Administration) [5]. Основным ее недостатком является невозможность сепарации клеток, утративших эпителиальный фенотип в результате эпителиально-мезенхимального перехода, которые, как считается, играют ключевую роль в качестве драйвера метастатического процесса [6].

На указанной способности опухолевых клеток основана работа системы, в которой используется обогащенный моноклональными антителами к молекулам адгезии эпителиальных клеток EpCAM функционализированный наконечник, вводимый в стандартный катетер Сельдингера, который дает возможность подсоединения системы непосредственно к кровеносному руслу пациента с анализом большого объема крови, благодаря чему EpCAM-позитивные ЦОК улавливаются и задерживаются на наконечнике [7, 8].

Альтернативой позитивной селекции являются методики негативного выделения, основанные на связывании лейкоцитов со специфическими антителами (CD45) и последующем их удалении из анализируемого образца (Label-free [9] и RosetteSep [10]). Существенным преимуществом такой селекции является возможность выделения ЦОК независимо от их иммунофенотипа, а также сохранение этих клеток

жизнеспособными и пригодными для дальнейшего исследования и/или культивирования [11].

К биологическим методам селекции ЦОК относят также подсчет и выделение их с помощью флуоресцентного сортирования (fluorescence-activated cell sorting, FACS) посредством проточной цитометрии. Данный метод дает возможность получения клеточных клонов высокой степени чистоты, но требует подбора антител и большого стартового количества материала [12, 13]. К недостаткам метода также можно отнести сложность одновременной оценки большого числа параметров (8–12) из-за перекрытия спектров флуоресценции и достаточно высокую стоимость [14].

Отличием магнитного сортирования (magnetic-activated cell sorting, MACS; Miltenyi Biotec, Германия) является использование конъюгатов специфических антител к целевой фракции клеток с супермагнитными наночастицами, что позволяет проводить сепарацию в условиях направленного магнитного поля. Технология достаточно проста, но отличается высокой стоимостью системы и расходных материалов. Кроме того, как для любого другого биологического метода сепарации, эффективность его зависит от сродства выбранных антител к целевому белку [15].

Методы физической селекции ЦОК основаны на отличии физических свойств опухолевых клеток от таковых у нормальных клеток: их размера, плотности и механических свойств (жесткости, способности к деформации). Селекция, основанная на различиях размера нормальных и опухолевых клеток, позволяет разделять их с помощью простой микрофльтрации, поскольку клетки крови имеют, как правило, меньшие размеры по сравнению с опухолевыми клетками [16, 17]. Метод является простым в исполнении и использовании и относительно дешевым, однако не лишен и существенных недостатков: есть вероятность пропустить раковые клетки с малыми размерами, фильтр достаточно легко засоряется и может использоваться только для анализа ограниченного объема крови.

Разделение клеток при центрифугировании в соответствии с их плотностью [18, 19] несет риск потери отдельных клеток в результате образования агрегатов и имеет низкую чувствительность, поскольку раковые клетки гетерогенны и не являются идентичными по своим физическим свойствам.

Наиболее перспективным методом выделения ЦОК из периферической крови представляется использование микрофлюидных систем, в основе работы которых лежит латеральная миграция твердых частиц в жидкости за счет инерционных сил [20, 21]. Это дает возможность выделять более крупные по сравнению с нормальными клетками крови опухолевые клетки. К недостаткам метода относятся большое количество «фоновых» лейкоцитов, что затрудняет подсчет и характеристику выделенных ЦОК, а также высокая стоимость расходных материалов [22–28]. В то же время сам по себе микрофлюидный чип имеет относительно невысокую стоимость, требует минимального объема

образцов крови и позволяет сепарировать опухолевые клетки независимо от их фенотипа, что обуславливает значительное преимущество этой системы по сравнению с сертифицированной для клинического применения системой CellSearch.

До сих пор выбор того или иного метода сепарации ЦОК из периферической крови для использования в рутинной клинической практике с минимальными потерями и максимальным удобством остается дискуссионным. В нашем исследовании с целью выделения ЦОК из периферического кровотока была использована микрофлюидная технология на основе силиконового чипа определенной конфигурации.

**Цель исследования** — изучение возможностей инновационной микрофлюидной технологии для выделения циркулирующих опухолевых клеток из образцов периферической крови онкологических больных и последующей их характеристики.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на базе химиотерапевтического отделения поликлиники Нижегородского областного клинического онкологического диспансера (дневной стационар). Были изучены образцы периферической крови 5 пациентов с диссеминированными злокачественными новообразованиями эпителиального происхождения, которые получали системное лечение по поводу прогрессирования заболевания с развитием метастатического процесса. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрено Этическим комитетом Нижегородского областного клинического онкологического диспансера. От каждого пациента предварительно было получено добровольное информированное согласие. Общие сведения о пациентах представлены в разделе «Результаты».

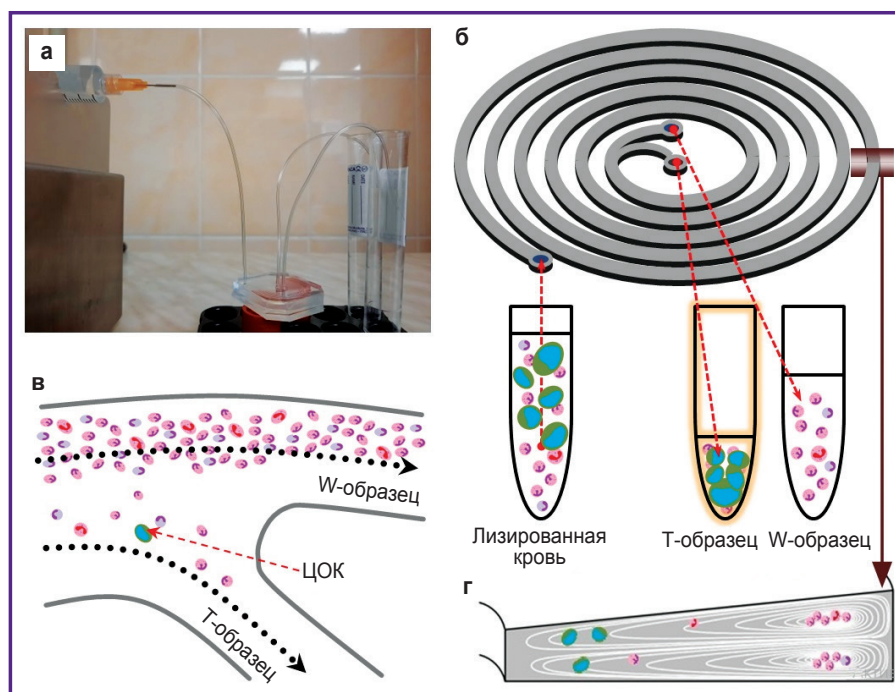
Критерии включения: установленный диагноз диссеминированного злокачественного новообразования эпителиальной природы (рак); гистологическая верификация первичной опухоли и вторичных метастатических очагов; функциональный статус по шкале ECOG 0–2. Критерием исключения являлся функциональный статус по шкале ECOG 3–4.

**Подготовка образцов крови.** Образцы периферической крови отобранных пациентов забирали из локтевой вены в

одноразовые стерильные вакуумные пробирки, обработанные ЭДТА-К3. Чтобы исключить попадание в образец эпителиальных клеток после прокола кожи, первый миллилитр крови пациента утилизировали, а далее забирали кровь в объеме 9 мл. В течение не более 3 ч после забора кровь обрабатывали лизирующим буфером комнатной температуры (MACS Separation Buffer; Miltenyi Biotec) в соотношении крови и буфера 1,0:2,5 в течение 20 мин путем постоянного перемешивания с целью разрушения эритроцитарной фракции. Потом кровяной лизат центрифугировали (CM-6M; ELMI, Латвия; 5 мин, 500 g), надосадочную жидкость утилизировали, а осадок, содержащий цельные ЦОК, разбавляли раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) до 10 мл.

**Описание микрофлюидного чипа и технология клеточной сепарации.** Следующим этапом исследования было сепарирование полученной суспензии с помощью шприцевого насоса (SpLab01; «Вилитек», Россия) и силиконового спирального микрофлюидного чипа (рис. 1).

В шприцевый насос устанавливали шприц с полученной клеточной суспензией и выставляли постоянную скорость выходящего потока (1,7 мл/мин). Из шприца по пластиковой трубке с внутренним диаметром 0,5 мм суспензия клеток попадала в чип (рис. 1, а, б). Внутри чипа происходило разделение клеток по их плотности на основе латеральной миграции твердых частиц в жидкости за счет инерционных сил (рис. 1, в, г). Вследствие этого подавляющее



**Рис. 1. Установка для сепарирования:**

а — внешний вид; б — схематическое изображение силиконового микрофлюидного чипа; в — развилка в центре чипа; г — поперечное сечение полости витка чипа с распределением частиц внутри в зависимости от их размера

число клеток размером менее 13 мкм в соответствии с принципом работы чипа сепарировались в «мусорную» пробирку (далее W-образец), а подавляющее количество клеток размером более 13 мкм — в «таргетную» пробирку (далее T-образец). Следует отметить, что в T-образце присутствует значительное количество лейкоцитов, что требует дополнительной верификации клеток в нем.

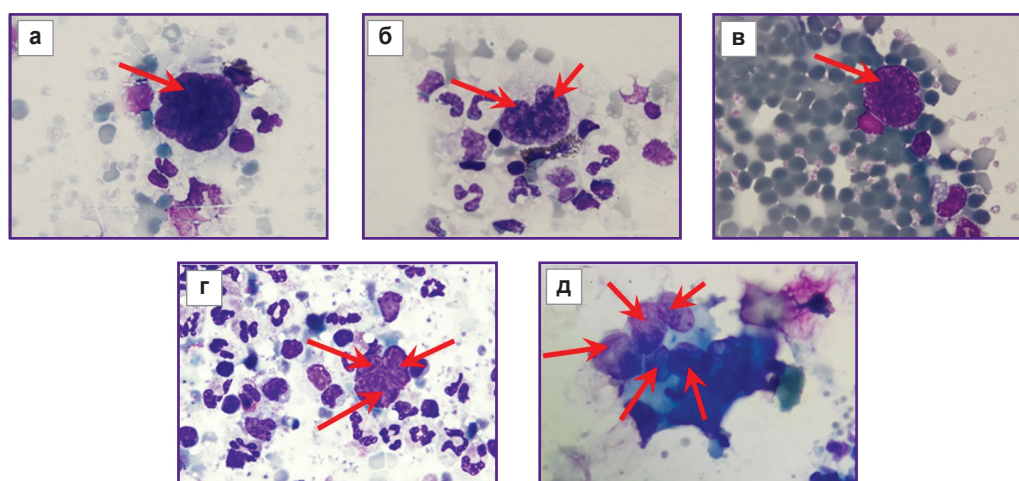
**Выявление циркулирующих опухолевых клеток в таргетных образцах.** Окрашивание образцов крови 5 пациентов выполняли по Романовскому–Гимзе. С использованием цитоцентрифуги Awel C12 (Domel, Словения) в течение 9 мин при 500 g проводили седиментацию клеток из обогащенной ЦОК суспензии на предметное стекло, после чего образцы фиксировали по Май–Грюнвальду в течение 3 мин. Зафиксированные мазки крови помещали в рабочий раствор Романовского–Гимзе, по истечении 30 мин препараты промывали проточной водой в течение 1–2 с и высушивали на воздухе.

**Иммуноцитохимическое окрашивание красителями Anti-Cytokeratin-FITC и DAPI.** Для отработки методики характеристики ЦОК клетки клеточной линии карциномы легкого человека A549 (номер по каталогу ATCC® CCL-185™) в количестве 5000 кл. добавляли в образцы крови здорового добровольца в объеме 9 мл и сепарировали по изложенной выше методике. Культивирование клеток проводили в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 2 ммоль L-глутамин («ПанЭко») и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup>. На каждом этапе пассирования клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина-версена («ПанЭко»). Субкультивирование выполняли через 2–3 сут по достижении культурой 80% конfluence [29].

С использованием цитоцентрифуги Awel C12 в течение 9 мин при 500 g проводили седиментацию клеток из обогащенной ЦОК суспензии на предметное стекло, после чего полученные препараты фиксировали при комнатной температуре в среде параформальдегида Тритон X-100 (1%) в течение 7–10 мин. Далее препараты промывали в PBS и высушивали. Для блокировки неспецифического связывания препараты инкубировали с 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBST (0,1% раствор Твин в PBS, pH=7,2) в течение 90 мин при комнатной температуре во влажной среде и слегка высушивали. После этого на предметное стекло с образцом наносили разведенный в пропорции 1:50 раствор меченого антитела Anti-Cytokeratin (CK3-6H5)-FITC (Miltenyi Biotec) и в течение 4 ч инкубировали при комнатной температуре во влажной среде. После этого полученные образцы обрабатывали красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) с последующей экспозицией в течение 10 мин и отмывкой в PBS. Использование DAPI (окрашивание ядра) в данном исследовании обусловлено необходимостью дополнительной верификации целостности выявленных клеток.

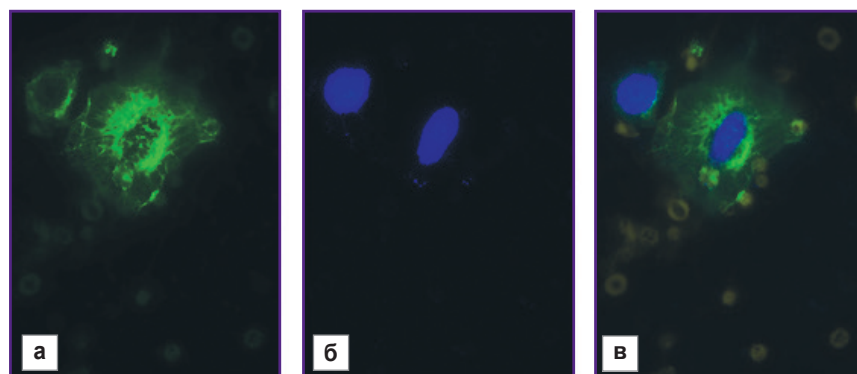
Выбор флуоресцентного антитела Anti-Cytokeratin (CK3-6H5)-FITC был обусловлен в первую очередь необходимостью выявить признаки эпителиальной принадлежности выделенных клеток, что однозначно будет указывать на их опухолевую природу. Помимо этого использование метки FITC позволяет отделить принимаемый флуоресцентный сигнал от DAPI.

На завершающем этапе препараты высушивали и закрепляли монтирующей средой (ProLong AntiFade Reagent; Thermo Fisher Scientific, США). Полученные препараты хранили в фольге в темноте при температуре 4 °С.



**Рис. 2. Изображения атипичных клеток в образцах крови исследуемых пациентов:**  
 а — при раке альвеолярного отростка нижней челюсти; б — при раке гортани; в — при раке щитовидной железы; г — при немелкоклеточном раке легкого; д — при раке дна полости рта. Окраска по Романовскому–Гимзе; ×100. Стрелками обозначены атипичные клетки в «таргетных» образцах крови после сепарации в микрофлюидном чипе

**Микроскопическое исследование.** Фотографические (рис. 2) и флуоресцентные (рис. 3) изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 DUO на инвертированном штативе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение флуоресценции Anti-Cytokeratin (СК3-6Н5)-FITC проводили на длине волны 488 нм, регистрацию сигнала — 525 нм. Возбуждение флуоресценции DAPI выполняли на длине волны 405 нм, регистрацию сигнала — 470 нм.



**Рис. 3. Клетки с атипичной морфологией, полученные из образца периферической крови здорового добровольца с предварительным добавлением линии клеток A549:**

а — окраска флуоресцентными антителами Anti-Cytokeratin (СК3-6Н5)-FITC; возбуждение флуоресценции — 488 нм; прием сигнала — 525 нм; б — контрастирование ядер с помощью DAPI; возбуждение флуоресценции — 405 нм; прием сигнала — 470 нм; в — наложение Anti-Cytokeratin (СК3-6Н5)-FITC и DAPI

### Результаты и обсуждение

Опухолевые клетки в периферической крови удалось выявить у всех 5 пациентов. Количество выявленных ЦОК у пациентов, включенных в исследование, представлено в таблице. В образцах крови больных раком гортани (рис. 2, б), немелкоклеточным раком легкого (рис. 2, в) и раком дна полости рта (рис. 2, д) были идентифицированы кластеры ЦОК из 2–5 клеток.

На следующем этапе проведено иммуноцитохимическое фенотипирование клеток эпителиальной природы. Исследование выполняли на клеточной линии карциномы легкого A549, предварительно добавленной в образец периферической крови здорового добровольца и сепарированной по изложенной выше методике. Получено яркое насыщенное окрашивание клеток с атипичной морфологией с помощью Anti-Cytokeratin (СК3-6Н5)-FITC, соответствующее окрашке цитоскелета эпителиальных клеток (рис. 3, а). Успешное контрастирование ядер с помощью DAPI

(рис. 3, б) показало целостность выявленных атипичных клеток (при сепарации выделенные в Т-образец клетки не повреждаются).

Таким образом, в данном исследовании была отработана в клинике методика сепарации ЦОК из образцов периферической крови с использованием микрофлюидного чипа. Установлено, что при данной технологии у пациентов с диссеминированным опухолевым процессом ЦОК выделяются в количестве, сопоставимом с ранее полученными данными [26]. Основной проблемой при работе с микрофлюидным чипом оказалось большое количество «мусорных» белых клеток крови в итоговом образце, что затрудняет идентификацию опухолевых клеток и требует дальнейшего усовершенствования технологии с целью более качественной сепарации «целевого» и «мусорного» образцов. Дальнейшие исследования предполагают

### Сведения о пациентах и количество циркулирующих опухолевых клеток, выделенных из образцов периферической крови

Пациент, возраст, пол	Диагноз, статус по шкале ECOG	Количество циркулирующих опухолевых клеток в образце
№1, 69 лет, муж.	Рак слизистой оболочки полости рта (альвеолярный отросток нижней челюсти справа) — $cT_{4a}N_{2c}M_1$ (PULM), IV С стадия. Клиническая группа II. Гистологическое заключение — умеренно-дифференцированный плоскоклеточный рак, ECOG 1	5
№2, 54 года, муж.	Рак гортани — $cT_3N_{2b}M_1$ (OSS), IV С стадия. Клиническая группа II. Гистологическое заключение — низкодифференцированный плоскоклеточный рак, ECOG 1	2 клетки в кластере
№3, 37 лет, жен.	Рак щитовидной железы $cT_3N_{1b}M_1$ (HEP), II стадия. Клиническая группа II. Гистологическое заключение — папиллярный рак, ECOG 1	1
№4, 52 года, муж.	Немелкоклеточный рак легкого (медиастинальная форма) — $cT_3N_xM_1$ (OSS), IV стадия. Клиническая группа II. Гистологическое заключение — низкодифференцированный плоскоклеточный рак без ороговения, ECOG 2	9, в их числе 2 кластера из 2 и 3 клеток соответственно
№5, 67 лет, жен.	Рак дна полости рта — $cT_2N_2M_1$ (PULM), IV С стадия. Клиническая группа II. Гистологическое заключение — умеренно-дифференцированный плоскоклеточный рак, ECOG 1	7, в их числе кластер из 5 клеток

работу с образцами крови большего объема (20 мл) и поиск возможностей снижения стоимости технологии.

Иммуноцитохимическое исследование с антителами к цитокератину позволило подтвердить эпителиальную природу выделенных клеток. При взаимодействии Anti-Cytokeratin (СК3-6Н5)-FITC (антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой) с опухолевыми клетками происходит специфическое связывание элементов цитоскелета, что позволяет детектировать и отличать эти клетки от клеток крови при лазерно-сканирующей микроскопии.

В экспериментах отмечено выгорание флуоресцентной метки FITC в течение суток, что обуславливает необходимость ее замены в дальнейших исследованиях.

Подтверждение эпителиальной природы клеток, обнаруженных в периферической крови, является важным, но не всегда достаточно информативным для характеристики всех выявленных ЦОК из-за феномена эпителиально-мезенхимального перехода. Для ЦОК, как и для опухолевых клеток в целом, свойственна гетерогенность популяции, и логичным дальнейшим шагом будет подбор дополнительных антител для более полной характеристики выделенного пула клеток.

### Заключение

Технология иммуноцитохимического окрашивания циркулирующих опухолевых клеток позволяет эффективно выделять эти клетки из периферической крови онкологических больных, однако требуется усовершенствование методики верификации полученных клеток, в том числе использование более стабильных флуоресцентных меток, привязанных к антителу (Alexa fluor 488, 568, 647).

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №19-34-60034.

**Конфликт интересов** отсутствует.

### Литература/References

1. San Juan B.P., Garcia-Leon M.J., Rangel L., Goetz J.G., Chaffer C.L. The complexities of metastasis. *Cancers (Basel)* 2019; 11(10): 1575, <https://doi.org/10.3390/cancers11101575>.
2. Chistiakov D.A., Chekhonin V.P. Circulating tumor cells and their advances to promote cancer metastasis and relapse, with focus on glioblastoma multiforme. *Exp Mol Pathol* 2018; 105(2): 166–174, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.07.007>.
3. Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869; 14: 146–149.
4. Lugade A.A., Sorensen E.W., Gerber S.A., Moran J.P., Frelinger J.G., Lord E.M. Radiation-induced IFN- $\gamma$  production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J Immunol* 2008; 180(5): 3132–3139, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3132>.

5. Allard W.J., Matera J., Miller M.C., Repollet M., Connelly M.C., Rao C., Tibbe A.G., Uhr J.W., Terstappen L.W. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20): 6897–6904, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0378>.

6. McCorry A.M., Loughrey M.B., Longley D.B., Lawler M., Dunne P.D. Epithelial-to-mesenchymal transition signature assessment in colorectal cancer quantifies tumour stromal content rather than true transition. *J Pathol* 2018; 246(4): 422–426, <https://doi.org/10.1002/path.5155>.

7. Saucedo-Zeni N., Mewes S., Niestroj R., Gasiorowski L., Murawa D., Nowaczyk P., Tomasi T., Weber E., Dworacki G., Morgenthaler N.G., Jansen H., Propping C., Sterzynska K., Dyszkiewicz W., Zabel M., Kiechle M., Reuning U., Schmitt M., Lücke K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* 2012; 41(4): 1241–1250, <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1557>.

8. Saliba A.E., Saias L., Psychari E., Minc N., Simon D., Bidard F.C., Mathiot C., Pierga J.Y., Fraissier V., Salamero J., Saada V., Farace F., Vielh P., Malaquin L., Viovy J.L. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(33): 14524–14529, <https://doi.org/10.1073/pnas.1001515107>.

9. Bu J., Kang Y.T., Kim Y.J., Cho Y.H., Chang H.J., Kim H., Moon B.I., Kim H.G. Dual-patterned immunofiltration (DIF) device for the rapid efficient negative selection of heterogeneous circulating tumor cells. *Lab Chip* 2016; 16(24): 4759–4769, <https://doi.org/10.1039/c6lc01179a>.

10. Buscaill E., Alix-Panabières C., Quincy P., Cauvin T., Chauvet A., Degrandi O., Caumont C., Verdon S., Lamrissi I., Moranvillier I., Buscaill C., Marty M., Laurent C., Vendrely V., Moreau-Gaudry F., Bedel A., Dabernat S., Chiche L. High clinical value of liquid biopsy to detect circulating tumor cells and tumor exosomes in pancreatic ductal adenocarcinoma patients eligible for up-front surgery. *Cancers (Basel)* 2019; 11(11): 1656, <https://doi.org/10.3390/cancers11111656>.

11. Wu C., Hao H., Li L., Zhou X., Guo Z., Zhang L., Zhang X., Zhong W., Guo H., Bremner R.M., Lin P. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009; 4(1): 30–36, <https://doi.org/10.1097/jto.0b013e3181914125>.

12. Basu S., Campbell H.M., Dittel B.N., Ray A. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp* 2010; 41: 1546, <https://doi.org/10.3791/1546>.

13. 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. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol* 2011; 29(12): 1120–1127, <https://doi.org/10.1038/nbt.2038>.

14. Perfetto S.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(8): 648–655, <https://doi.org/10.1038/nri1416>.

15. Wang X., Sun L., Zhang H., Wei L., Qu W., Zeng Z.,

Liu Y., Zhu Z. Microfluidic chip combined with magnetic-activated cell sorting technology for tumor antigen-independent sorting of circulating hepatocellular carcinoma cells. *Peer J* 2019; 7: e6681, <https://doi.org/10.7717/peerj.6681>.

16. Hofman V., Bonnetaud C., Ilie M.I., Vielh P., Vignaud J.M., Fléjou J.F., Lantuejoul S., Piaton E., Mourad N., Butori C., Selva E., Poudenx M., Sibon S., Kelhef S., Vénissac N., Jais J.P., Mouroux J., Molina T.J., Hofman P. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 2011; 17(4): 827–835, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-0445>.

17. Hosokawa M., Yoshikawa T., Negishi R., Yoshino T., Koh Y., Kenmotsu H., Naito T., Takahashi T., Yamamoto N., Kikuhara Y., Kanbara H., Tanaka T., Yamaguchi K., Matsunaga T. Microcavity array system for size-based enrichment of circulating tumor cells from the blood of patients with small-cell lung cancer. *Anal Chem* 2013; 85(12): 5692–5698, <https://doi.org/10.1021/ac400167x>.

18. Gertler R., Rosenberg R., Fuehrer K., Dahm M., Nekarda H., Siewert J.R. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162: 149–155, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59349-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59349-9_13).

19. Huang Q., Wang F.B., Yuan C.H., He Z., Rao L., Cai B., Chen B., Jiang S., Li Z., Chen J., Liu W., Guo F., Ao Z., Chen S., Zhao X.Z. Gelatin nanoparticle-coated silicon beads for density-selective capture and release of heterogeneous circulating tumor cells with high purity. *Theranostics* 2018; 8(6): 1624–1635, <https://doi.org/10.7150/thno.23531>.

20. Segré G., Silberberg A. Radial particle displacements in Poiseuille flow of suspensions. *Nature* 1961; 189: 209–210.

21. Segré G., Silberberg A. Behaviour of macroscopic rigid spheres in Poiseuille flow. Part 2. Experimental results and interpretation. *J Fluid Mech* 1962; 14(1): 136–157, <https://doi.org/10.1017/S0022112062001111>.

22. Warkiani M.E., Khoo B.L., Wu L., Tay A.K., Bhagat A.A.,

Han J., Lim C.T. Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics. *Nat Protoc* 2016; 11(1): 134–148, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.003>.

23. Lee P., Gaige T., Hung P. Microfluidic systems for live cell imaging. *Methods Cell Biol* 2011; 102: 77–103, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374912-3.00004-3>.

24. Valencia P.M., Farokhzad O.C., Karnik R., Langer R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2012; 7(10): 623–629, <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.168>.

25. Deng Y., Zhang Y., Sun S., Wang Z., Wang M., Yu B., Czajkowsky D.M., Liu B., Li Y., Wei W., Shi Q. An integrated microfluidic chip system for single-cell secretion profiling of rare circulating tumor cells. *Sci Rep* 2014; 4: 7499, <https://doi.org/10.1038/srep07499>.

26. Warkiani M.E., Guan G., Luan K.B., Lee W.C., Bhagat A.A., Chaudhuri P.K., Tan D.S., Lim W.T., Lee S.C., Chen P.C., Lim C.T., Han J. Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells. *Lab Chip* 2014; 14(1): 128–137, <https://doi.org/10.1039/c3lc50617g>.

27. Chaudhuri P.K., Ebrahimi Warkiani M., Jing T., Kenry, Lim C.T. Microfluidics for research and applications in oncology. *Analyst* 2016; 141(2): 504–524, <https://doi.org/10.1039/c5an00382b>.

28. Shirani E., Razmjou A., Tavassoli H., Landarani-Isfahani A., Rezaei S., Abbasi Kajani A., Asadnia M., Hou J., Ebrahimi Warkiani M. Strategically designing a pumpless microfluidic device on an “inert” polypropylene substrate with potential application in biosensing and diagnostics. *Langmuir* 2017; 33(22): 5565–5576, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00537>.

29. Фрешни Р.Я. *Культура животных клеток. Практическое руководство*. БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010; 714 с.

Freshni R.Ya. *Kul'tura zhivotnykh kletok. Prakticheskoe rukovodstvo* [Animal cell culture. A practical guide]. BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010; 714 p.