

## **Одноклеточное РНК секвенирование в онкологии. Обзор литературы**

**А.М. Исмаилов**

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Российская Федерация, 101000, г. Москва, ул. Мясницкая, д. 20**

**\* Контактная информация: Исмаилов Алы Мехтиевич, магистр ВШЭ  
ФКН АДБМ**

**Email: [neuro.promotion@gmail.com](mailto:neuro.promotion@gmail.com)**

**Введение:** Онкологические заболевания являются одними из ведущих причин смерти в мире. Биологические механизмы онкогенеза до сих пор концентрируют фокус внимания многих исследователей по всему миру. Внедрение scRNA-seq в исследовательскую практику представляет собой важный шаг в эволюции изучения онкологии, понимании особенностей гетерогенности опухолей и биологических процессов, лежащих в их основе. В последние годы scRNA-seq стал мощным инструментом для исследования клеточной гетерогенности, выявления подтипов опухолей, анализа микросреды опухоли и предсказания терапевтического ответа. В данном обзоре мы рассмотрим последние достижения в области scRNA-seq в онкологии, выявим основные методы и подходы, а также обсудим перспективы его применения в клинической практике.

**Цель исследования:** систематический обзор литературы по применению scRNA-seq в онкологии, в частности: оценка текущего состояния исследований в этой области, выявления ключевых методов и технологий scRNA-seq, используемых для анализа клеточной гетерогенности и

опухолевой микросреды, идентификации основных результатов, полученных с использованием scRNA-seq в онкологических исследованиях.

**Материалы и методы:** Для достижения поставленных целей был произведен поиск данных в интернет-ресурсе *Pubmed*. Было проанализировано 42 статьи, опубликованных между 1991 и 2023 годами.

**Результаты:** Внедрение single-cell RNA sequencing в практику научных лабораторий позволил более глубоко и детально анализировать гетерогенность опухолей на уровне отдельных клеток. Значительная часть публикаций направлена на изучение иммунологического окружения опухолей, инфильтрации опухолей различными клетками иммунной системы и транскриптомного анализа последних с целью анализа иммунно-онкологических взаимодействий. Важные результаты связаны в том числе с выявлением новых субтипов опухолей, молекулярных механизмов онкогенеза и метастазирования, а также путей резистентности к лечению, антиапоптотических процессов. Некоторые ограничения и вызовы, такие как сложность анализа данных, стандартизация методов и потребность в интеграции с другими исследовательскими подходами.

**Заключение:** Транскриптомный анализ на уровне отдельных клеток представляет собой мощный инструмент для исследования онкологических процессов, позволяя более глубоко понять гетерогенность опухолей и молекулярные механизмы онкогенеза. Продвижение в методологии scRNA-seq и аналитических подходах значительно расширяет наши возможности в области иммунотерапии рака. Приложения scRNA-seq в онкологии предоставляют новые перспективы для диагностики, прогнозирования, разработки лечения и понимания механизмов развития опухолей. Несмотря на значительный прогресс, существуют вызовы, такие как сложность анализа данных, потребность в стандартизации методов и необходимость в

дальнейших исследованиях для раскрытия полного потенциала scRNA-seq в онкологии. Дальнейшие исследования и инновации в области scRNA-seq могут привести к новым открытиям и улучшениям в диагностике, лечении и понимании онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** single cell RNA sequencing, scRNA-seq, онкогенез, онкология, микроокружение опухоли, метастазирование.

**Конфликт интересов:** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность, финансирование:** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

#### **Список сокращений:**

- scRNA-seq - одноклеточное РНК секвенирование (single cell RNA sequencing)
- ДНК (DNA) - дезоксирибонуклеиновая кислота (Deoxyribonucleic Acid)
- РНК (RNA) - рибонуклеиновая кислота (Ribonucleic Acid)
- TNF- $\alpha$  - фактор некроза опухоли-альфа (Tumor Necrosis Factor-alpha)
- pRb - ретинобластомный белок (Retinoblastoma protein)
- VEGF - фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor)
- FGF1/2 - фактор роста фибробластов 1 и 2 (Fibroblast Growth Factor 1 and 2)
- CAMs - клеточные адгезионные молекулы (Cell Adhesion Molecules)
- IgCAMs - иммуноглобулиновые клеточные адгезионные молекулы (Immunoglobulin Cell Adhesion Molecules)
- GLUT - семейство транспортеров глюкозы (Glucose Transporter)
- MUC1 - мукополисахарид 1 (Mucin 1)
- NK - натуральные киллеры (клетки) (Natural Killer cells)
- МОО (TME) - микроокружение опухоли (Tumor Microenvironment)
- TAM - опухоль-ассоциированные макрофаги (tumor associated macrophages)

- BAX - белок с проапоптотической активностью из семейства Bcl-2 (Apoptosis regulator BAX, aka bcl-2-like protein 4)
- CD - кластер дифференцировки (Cluster of Differentiation)
- MRC1 - маннозорецептор С-типа 1 (Mannose Receptor C Type 1)
- CCL18 - цитокин из семейства CC-хемокинов (Chemokine (C-C motif) ligand 18)
- TILs - опухоль инфильтрирующие лимфоциты (Tumor-Infiltrating Lymphocytes)
- IRF8 - регуляторный фактор интерферона 8 (Interferon Regulatory Factor 8)
- XCL1 - цитокин принадлежащий к семейству C-хемокинов (Chemokine (C motif) ligand 1)
- PPAR $\gamma$  - гамма-пероксисомный пролифератор-активированный рецептор (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)
- SPP1 - остеопонтин (secreted phosphoprotein 1 aka osteopontin)
- CAFs - опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer-Associated Fibroblasts)
- TREM2 - триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2)
- HAVCR2 - клеточный рецептор вируса гепатита А 2 типа (Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2)
- CREM - модулятор ответа на цАМФ (cAMP response element modulator)
- cAMP - циклический аденозинмонофосфат (Cyclic AMP, or 3' –5' -cyclic adenosine monophosphate )
- MMP9 - матриксная металлопротеиназа или желатиназа В (Matrix metalloproteinase-9)
- PPAR $\gamma$  - рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (Peroxisome proliferator-activated receptors)
- TREM2 - Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
- PD1 - белок апоптоза 1 (Programmed cell death protein 1; CD279)
- PD-L1 - первый лиганд белка PD1
- LAG3 - белок из суперсемейства иммуноглобулинов (Lymphocyte-activation gene 3; CD223)
- CTLA-4 - Цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4)

- VISTA - Высокоэкспрессивный ингибитор Т-клеток (V-domain Ig suppressor of T cell activation)
- TIGIT - Т-клеточный иммуноглобулин и иммуноглобулин-подобный рецептор (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)
- ADORA2 - Аденозиновый рецептор A2 (Adenosine Receptor A2)

## **Введение.**

В 2000 году Hanahan D. et al опубликовали статью под названием “Hallmarks of cancer”, в которой определили шесть патофизиологических механизмов онкогенеза [2].

- самообеспечение факторов роста (growth factors)
- рефрактерность к факторам-ингибиторам роста
- ингибирование апоптоза
- безлимитный репликативный потенциал
- самообеспечение ангиогенеза
- перитуморозная инвазия и метастазирование

Факторы роста – необходимые сигнальные молекулы для перехода от покоящегося состояния клетки к митотически активному состоянию. Биологически это устроено следующим образом: на поверхности клеток есть специфические трансмембранные рецепторы к такого рода молекулам (например эритропоэтин, инсулиноподобный фактор роста 1),

активирование которых приводит к изменению метаболизма клеток и запускает процесс пролиферации и/или дифференцировки. Зависимость клеток от внешнего регулирования этих тонких процессов очевидна на примере опухолей, которые способны сами производить факторы роста, тем самым ауторегулировать пролиферацию самих себя. Примерами могут послужить синтез фактора роста производимого тромбоцитами (PDGF) и фактора роста опухолей альфа (TNF  $\alpha$ ) глиобластомами и саркомами [3].

Напротив факторам роста, в нормальных тканях присутствуют также и антипролиферативные факторы, цель которых перевести клетки из митотически активного состояния в состояние покоя. Эти молекулы также взаимодействуют с трансмембранными рецепторами на поверхности клеток, вызывая метаболические изменения. Влияние факторов-ингибиторов роста происходит путем перевода клеток в состояние G0, из которого они могут выйти когда это будет инициировано факторами роста. Белок pRb, находясь в гипофосфорилированном состоянии, блокирует деление клеток путем регуляции функции генов E2F. E2F - группа генов, которые кодируют семейство транскрипционных факторов, три из которых (E2F1, 2 и E2F3a) являются активаторами, остальные шесть - супрессорами. E2F - контролируют экспрессию генов ответственных за переход из состояния G1 в S [3, 4].

Апоптоз является следующим важным механизмом регуляции популяции клеток. Ген кодирующий p53 является излюбленной мутацией в опухолях в том числе потому что он вызывает апоптоз путем гиперэкспрессии BAX в ответ на повреждение ДНК, BAX в свою

очередь приводит к высвобождению цитохрома С из митохондрии, последний является мощной проапоптотической молекулой [5].

Существует следующая проблема стоящая на пути злокачественного роста опухолей - теломеры. Американский анатом Леонард Хейфлик еще в 60-е годы прошлого столетия экспериментально показал феномен ограничения числа делений клеток после приблизительно 50-й итерации, инициированное истончением теломер, коротких (6 оснований) повторов на концах хромосом [6]. Связано это, как известно, с неспособностью ДНК-полимеразы начать репликацию с 3' конца ДНК. Большинство опухолей способны синтезировать теломеразу - фермент "достраиваемый" описанные выше повторы на концах хромосом [7].

Опухоли должны обладать ангиопротрофическим потенциалом, поскольку именно кровь является источником необходимых нутриентов и кислорода. Злокачественные опухоли с ярко выраженным потенциалом роста могут даже иметь признаки некроза в центре опухоли, связанный с превалированием роста клеток над ростом сосудов питающих эти клетки. Такой феномен нередко можно встретить у глиобластом, избыточные клеточные массы которых часто подвергаются некрозу [8]. Опухоли в процессе быстротекущей эволюции приобретают способность к влиянию на рост сосудов путем синтеза VEGF и FGF 1/2, каждый из которых связывается с соответствующим трансмембранным рецептором на эндотелии сосудов [3, 9].

Инвазивный характер роста опухолей и метастазирования являются важными маркерами в онкологии. Молекулы клеточной адгезии (CAMs) являются ключевой группой поверхностных белков которые регулируют

клеточную адгезию либо с другими клетками либо с межклеточным матриксом [10]. Существует четыре больших суперсемейства молекул клеточной адгезии: иммуноглобулиновое суперсемейство (IgCAMs), кадгерины (cadherins), интегрины (integrins), селектины. Изменения в экспрессии белков суперсемейства IgCAMs играют ключевую роль в инвазии и метастазировании опухолей [11].

Накопленные данные, полученные за последние десятилетия, открыли концептуально новый взгляд на онкогенез и биологическое поведение опухолей. В 2011 году Hanahan D. et al опубликовали статью, по сути являющейся продолжением их работы 2000 года, “Hallmarks of Cancer: The next Generation“, в которой авторы добавили еще два онкологических маркера к уже имеющимся и вышеописанным шести: репрограммирование энергетического метаболизма и уклонение от иммунного ответа. Раковые клетки как известно используют преимущественно глюкозу в качестве основного источника энергии, причем отдавая предпочтение именно гликолизу а не окислительному фосфорилированию продуктов гликолиза в митохондриях. Учитывая пролиферативные темпы раковых клеток, им необходимо извлекать много энергии, а учитывая их предпочтение анаэробному гликолизу им необходимо компенсировать 18-кратную разницу в эффективности окислительного фосфорилирования благодаря большей биодоступности самой глюкозы. Это происходит благодаря гиперэкспрессии глюкозных транспортеров, таких как GLUT1 [12].

Еще одной важной характеристикой онкологических клеток является способность к избеганию иммунного ответа. Koebel C.M., et al. в экспериментах на мышах показали манифестацию рака после удаления



Т-лимфоцитов и введения антител к интерферону гамма [13]. Опухоли имеющие гистологически инфильтрованную строму НК-клетками, NKT-клетками, Т-лимфоцитами имеют более благоприятный прогноз [14-16]. Описаны случаи спонтанного регресса в размерах опухоли благодаря массивному лимфоцитарному инфильтрированию в строму опухоли [17-19]. Муцин MUC1 - трансмембранный гликопротеин гиперэкспрессия которого распространена среди разных карцином является опухолевым антигеном, и естественный гуморальный иммунный ответ к нему связан с благоприятным прогнозом у пациенток с раком молочной железы [20]. Описан случай возникновения донорской опухоли у пациента принимающего иммуносупрессивную терапию после трансплантации тканей от здорового донора, что позволяет заподозрить “покоящееся” состояние опухолевых клеток при функционально полноценной иммунной системе [21]. Таким образом именно взаимодействие иммунной системы и раковых клеток считается одной из самых важных на данный момент целей для исследования, поскольку благодаря регуляции иммунного ответа раковые клетки могут избегать иммунного ответа и следовательно эволюционировать и расти, медленно или быстро убивая организм хозяина. Мейнстримом последнего десятилетия стали так называемые single-cell RNA-sequencing исследования, главная цель которых пролить истину на иммунное микроокружение опухоли, взаимодействие опухоли с окружающими ее агентами иммунной системы, которые по какой то причине перестают идентифицировать опухолевые клетки как чужеродные.

## **Single-cell RNA-sequencing и микроокружение опухоли.**

scRNA-seq - метод исследования в основе которого лежит анализ транскриптомных данных индивидуальных клеток [22, 23]. Типичный протокол данной процедуры включает несколько этапов: получение образца для исследования, изоляция отдельных клеток образца, лизирование мембран, ДНК, белков и извлечение РНК из клетки, обратное транскрибирование, амплификация ДНК, секвенирование и анализ данных [26]. В отличие от так называемого bulk-sequencing - процесса при котором анализируется транскриптом многих тысяч клеток и усредняется впоследствии, single cell дает возможность изучить профиль экспрессируемых генов конкретной клетки, а полученные транскриптомные данные можно сравнить между клетками, что позволяет идентифицировать редкие популяции клеток или, что пользуется широкой популярностью в данный момент, изучить особенности микроокружения опухоли (МОО) [24]. МОО стало предметом пристального изучения учеными по всему миру. Именно с биологическими характеристиками и особенностями устройства МОО связывают такие процессы как генезис опухоли, инвазия, метастазирование и даже фармакологическую резистентность к некоторым химиотерапевтическим подходам [27, 28]. Предполагается что МОО может играть двойственную роль относительно активного содействия или ингибирования развития опухоли, что во многом зависит от сложных биохимических каскадов, на которые может воздействовать опухоль [29]. Пристальное внимание научного мира к взаимодействию опухоли и его микроокружения может пролить больше света на биологию онкогенеза и открыть новые терапевтические стратегии, в

основе которых будут лежать иммунотерапевтические подходы [30]. Опухолевое микроокружение состоит из стромальных клеток - представляющих из себя неоформленную соединительную ткань; иммунных клеток - макрофагов, дендритных клеток, плазмоцитов, Т-клеток и прочих эффекторных и антигенпрезентирующих элементов; сосудов; внеклеточный матрикс. Одновременное измерение экспрессии генов в отдельных клетках тысяч опухолевых клеток, и, в частности, лимфоцитов инфильтрирующих опухолевую строму, может помочь получить всестороннее представление о микросреде опухоли и выявить новые направления для разработки терапии [41].

Mathewson N.D. et al. с помощью scRNA-seq открыли потенциальную иммунотерапевтическую цель - CD161 рецептор, экспрессируемый геном NK-клеток *KLRB1*. Инактивация этого гена или антитело-опосредованное ингибирование CD161 приводило к усилению цитотоксического эффекта Т клеток на клетки глиомы *in vivo* [25]. Gui-Ming Li et al. обнаружили значительную разницу в МОО у пациентов с ранним и поздним началом колоректального рака, а именно более высокую иммуносупрессивность у пациентов с ранним началом рака [31]. Составлен детальный атлас метастазов колоректального рака печени на основе одноклеточного и пространственного анализа, выявлены макрофаги М2-подобного типа с высокой метаболической активностью и фенотипом MRC1+ CCL18+ на метастатических участках. Выявлено, что эффективное проведение неоадьювантной химиотерапии способно замедлить такую метаболическую активацию, что предполагает возможность направленного воздействия на метаболические пути для предотвращения метастазирования [32].

Выявлены различные подтипы иммунных клеток и их соответствующие транскрипционные факторы. У CD8<sup>+</sup> (TIL) из ткани рака желудка было обнаружено снижение уровня транскрипционного фактора IRF8 по сравнению с контролем [33]. Выделен подтип M2-макрофагов, характеризующийся высоким уровнем экспрессии CCL18 и транскрипционного фактора CREM, который, вероятно, участвует в прогрессировании опухоли, а также новый подтип активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с высоким уровнем экспрессии XCL1, что ассоциировано с более высокими показателями выживаемости пациентов [34]. Выявлено, что макрофаги, проявляющие активность MMP9, представляют собой терминально дифференцированные TAM-макрофаги, а PPAR $\gamma$  играет ключевую роль в их дифференцировке. Описаны разнообразные подпопуляции злокачественных гепатоцитов и их разносторонние функции в формировании иммунной микросреды гепатоцеллюлярной карциномы [35]. Liu Y et al., был описан так называемый “опухолевый иммунологический барьер”, биологическая структура, которая образовывается при взаимодействии SPP1+ макрофагов и CAFs. Ингибирование SPP1 или макрофаг-специфическое удаление SPP1 у мышей разрушало описанную иммунологическую структуру и делало клетки гепатоцеллюлярной карциномы чувствительными к иммунотерапии [36]. Макрофаги с экспрессией TREM2 играли важную роль в подавлении CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Дефицит TREM2 усиливал терапевтический эффект блокады анти-PD-L1 путем усиления противоопухолевой активности CD8<sup>+</sup> Т-клеток [37]. Было выявлено наличие трех отдельных популяций эпителиальных клеток: одна базальная и две луминальные (L1 секреторные и L2 гормоночувствительные), что создает основу для понимания

дисфункций, происходящих в организме во время рака молочной железы [38]. Обнаружены существенные различия в составе стромальных и иммунных клеток между нормальной тканью пищевода и тканью опухоли. LAG3 и HAVCR2 могут быть потенциальными целями для иммунотерапии при плоскоклеточном раке пищевода [39]. Примечательно, при изучении разных типов меланом выявили что аркальный подтип характеризовался подавленной иммунной средой по сравнению с меланомой на неаркальной области. Обнаружена гиперэкспрессия нескольких генов, которые могут быть использованы в иммунотерапии, включая PD-1, LAG-3, CTLA-4, VISTA, TIGIT и ADORA2 [40]. Были представлены подробные функциональные и пространственные характеристики иммунных клеток в классической лимфоме Ходжкина с разрешением на уровне одной клетки. Идентифицирована субпопуляция LAG3+ Т-клеток, аналогичных регуляторным Т-клеткам, которая способствует избеганию иммунологического ответа опухолью [42].

## **Заключение.**

В заключении обзора литературы можно подчеркнуть ключевые моменты и выводы, сделанные на основе представленных исследований: Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) представляет собой мощный метод исследования, который позволяет изучать транскрипционные профили отдельных клеток, открывая новые перспективы в понимании биологических процессов, в том числе онкогенеза. Анализ микросреды опухоли (МОО) с использованием scRNA-seq помогает идентифицировать различные клеточные популяции, включая иммунные клетки, стромальные клетки и клетки опухоли, а также выявлять

особенности их взаимодействия. Взаимодействие между опухолью и ее микросредой играет важную роль в онкогенезе, метастазировании и резистентности к лечению, и его более глубокое понимание может привести к разработке новых иммунотерапевтических стратегий. Идентификация потенциальных иммунотерапевтических мишеней, таких как PD-1, LAG-3, CTLA-4, VISTA, TIGIT и ADORA2, показывает перспективы для развития новых подходов к лечению рака. Дальнейшее исследование МОО с использованием scRNA-seq представляет собой важное направление в онкологической науке и может привести к разработке персонализированных подходов к лечению рака.

### **Список литературы.**

1. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. Cell. 2011;144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer ArchiveDOI:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
3. Fedi P Tronick S.R Aaronson S.A Growth factors. in: Holland J.F Bast R.C Morton D.L Frei E Kufe D.W Weichselbaum R.R Cancer Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, MD 1997 (41–64.pp)

4. Weinberg R.A The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995; 81: 323-330
5. Green D.R Reed J.C Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281: 1309-1312
6. Hayflick L Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*. 1997; 62: 1180-1190
7. Shay J.W Bacchetti S A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*. 1997; 33: 787-791
8. Steven M Markwell, James L Ross, Cheryl L Olson, Daniel J Brat. Necrotic reshaping of the glioma microenvironment drives disease progression. *Acta Neuropathol* . 2022 Mar;143(3):291-310. doi: 10.1007/s00401-021-02401-4. Epub 2022 Jan 17.
9. Veikkola T Alitalo K VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol*. 1999; 9: 211-220
10. Chothia, C.; Jones, E. Y. (1997). "The molecular structure of cell adhesion molecules". *Annual Review of Biochemistry*. 66: 823–862. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.823. ISSN 0066-4154. PMID 9242926.
11. Johnson J.P Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev*. 1991; 10: 11-22
12. DeBerardinis R.J. Lum J.J. Hatzivassiliou G. Thompson C.B. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation.

13. Koebel C.M., et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450:903–907. doi: 10.1038/nature06309.
14. Haanen J.B., et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006;55:451–458. doi: 10.1007/s00262-005-0018-5.
15. Pages F., et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005;353:2654–2666. doi: 10.1056/NEJMoa051424.
16. Zhang L., et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:203–213. doi: 10.1056/NEJMoa020177.
17. Halliday G.M., Patel A., Hunt M.J., Tefany F.J., Barnetson R.S. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World J. Surg.* 1995;19:352–358. doi: 10.1007/BF00299157.
18. Inoue T., Yoneda K., Manabe M., Demitsu T. Spontaneous regression of merkel cell carcinoma: a comparative study of TUNEL index and tumor-infiltrating lymphocytes between spontaneous regression and non-regression group. *J. Dermatol. Sci.* 2000;24:203–211. doi: 10.1016/S0923-1811(00)00103-1.
19. Kerr K.M., et al. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology*. 1998;33:55–63.



20. Finn O.J., et al. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 1995;**145**:61–89. doi: 10.1111/j.1600-065X.1995.tb00077.x.
21. Strauss D.C. Thomas J.M. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 790-796
22. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10:57–63.
23. Wang L, Xi Y, Yu J, Dong L, Yen L, Li W. A statistical method for the detection of alternative splicing using RNA-seq. *PLoS One.* 2010;5(1):e8529. 10.1371/journal.pone.0008529.
24. van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth Ii MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, et al. Single-cell RNA-Seq reveals AML hierarchies relevant to disease progression and immunity. *Cell.* 2019;176(6):1265–1281. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.031.
25. Mathewson ND, Ashenberg O, Tirosh I, Gritsch S, Perez EM, Marx S, et al. Inhibitory CD161 receptor identified in glioma-infiltrating T cells by single-cell analysis. *Cell.* 2021;**184**(5):1281–1298. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.022.
26. Yeo AT, Rawal S, Delcuze B, Christofides A, Atayde A, Strauss L, et al. Single-cell RNA sequencing reveals evolution of immune landscape during glioblastoma progression. *Nat Immunol.* 2022;**23**:971–984.
27. Lei Y, Tang R, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. *J Hematol Oncol.* 2021;**14**:91.

28. Xin S, Liu X, Li Z, Sun X, Wang R, Zhang Z, et al. ScRNA-seq revealed an immunosuppression state and tumor microenvironment heterogeneity related to lymph node metastasis in prostate cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2023;**12**:49.
29. Chong Z-X, Ho W-Y, Yeap S-K, Wang M-L, Chien Y, Verusingam ND, Ong H-K. Single-cell RNA sequencing in human lung cancer: Applications, challenges, and pathway towards personalized therapy. *J Chin Med Assoc*. 2021;**84**:563–576.
30. Tian B, Li Q. Single-cell sequencing and its applications in liver cancer. *Front Oncol*. 2022;**12**:857037.
31. Li G-M, Xiao G-Z, Qin P-F, Wan X-Y, Fu Y-J, Zheng Y-H, et al. Single-cell RNA sequencing reveals heterogeneity in the tumor microenvironment between young-onset and old-onset colorectal cancer. *Biomolecules*. 2022;**12**:1860.
32. Wu Y, Yang S, Ma J, Chen Z, Song G, Rao D, et al. Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level. *Cancer Discov*. 2022;**12**:134–153.
33. Fu K, Hui B, Wang Q, Lu C, Shi W, Zhang Z, et al. Single-cell RNA sequencing of immune cells in gastric cancer patients. *Aging*. 2020;**12**:2747–2763.
34. Song G, Shi Y, Zhang M, Goswami S, Afridi S, Meng L, et al. Global immune characterization of HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma identifies macrophage and T-cell subsets associated with disease progression. *Cell Discov*. 2020;**6**:90.

35. Lu Y, Yang A, Quan C, Pan Y, Zhang H, Li Y, et al. A single-cell atlas of the multicellular ecosystem of primary and metastatic hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2022;**13**:4594.
36. Liu Y, Xun Z, Ma K, Liang S, Li X, Zhou S, et al. Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy. *J Hepatol*. 2023;**78**:770–782
37. Tan J, Fan W, Liu T, Zhu B, Liu Y, Wang S, et al. TREM2<sup>+</sup> macrophages suppress CD8<sup>+</sup> T-cell infiltration after transarterial chemoembolisation in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2023.
38. Nguyen QH, Pervolarakis N, Blake K, Ma D, Davis RT, James N, et al. Profiling human breast epithelial cells using single cell RNA sequencing identifies cell diversity. *Nat Commun*. 2018;**9**:2028.
39. Chen Z, Zhao M, Liang J, Hu Z, Huang Y, Li M, et al. Dissecting the single-cell transcriptome network underlying esophagus non-malignant tissues and esophageal squamous cell carcinoma. *EBioMedicine*. 2021;**69**:103459.
40. Li J, Smalley I, Chen Z, Wu J-Y, Phadke MS, Teer JK, et al. Single-cell characterization of the cellular landscape of acral melanoma identifies novel targets for immunotherapy. *Clin Cancer Res Offic J Am Assoc Cancer Res*. 2022;**28**:2131–2146.
41. Andor N, Simonds EF, Czerwinski DK, Chen J, Grimes SM, Wood-Bouwens C, et al. Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints. *Blood*. 2019;**133**:1119–1129.

42. Aoki T, Chong LC, Takata K, Milne K, Hav M, Colombo A, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals disease-defining T-cell subsets in the tumor microenvironment of classic Hodgkin lymphoma. *Cancer Discov.* 2020;**10**:406–421.