



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00707**

(22) Data de depozit: **21/09/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. **3/2020**

(71) Solicitant:
• **ONCO TEM DIAGNOSTIC**,
STR.SF.ELEFTERIE, NR.9, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **GALATEANU BIANCA**, ȘOS.OLTENIȚEI,
NR.48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **HUDITA ARIANA**, STR.OLTEȚ, NR.25,
BRAȘOV, BV, RO;
• **COSTACHE MARIETA**, STR.TELITA,
NR.12, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NEGREI CAROLINA**, STR.NAZARCEA
NR.46, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **GINGHINA OCTAV**, STR.VASILE LASCAR,
NR.100, BUCUREȘTI, B, RO;

• **ARDELEANU CARMEN MARIA**,
STR. OLARI NR. 40, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **BUBURUZAN LAURA**, CALEA RAHOVEI,
NR.338, BL.37, SC.1, AP.57, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **IROFEI MARIA ANCA**,
STR.POPEȘTI LEORDENI- VEST, NR.29,
POPEȘTI LEORDENI, IF, RO;
• **DOBREA CAMELIA MARIOARA**,
STR.BABA NOVAC, NR.13A, BL.2, SC.3,
ET.7, AP.58, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(74) Mandatar:
ROMPATENT DESIGN S.R.L., STR.ȚEPEȘ
VODĂ NR.130, ET.1, AP.C1, SECTOR 2,
BUCUREȘTI

(54) **PROCEDEU DE SELECȚIE A CELULELOR TUMORALE
CIRCULANTE DE ADENOCARCINOM DE COLON
PENTRU ANALIZA PRIN CITOMETRIE ÎN FLUX**

(57) Rezumat:

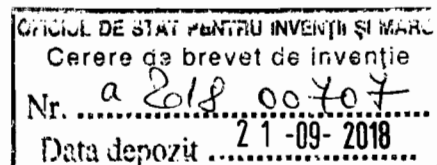
Invenția se referă la un procedeu de selecție a celulelor tumorale circulante de adenocarcinom de colon, pentru analiza prin citometrie în flux. Procedeu conform invenției constă în aceea că proba de sânge periferic, recoltat pe anticoagulant, este îmbogățită cu celule tumorale circulante, prin depleția celulelor CD45⁺ din fracția de celule nucleate din sânge, și marcarea

celulelor rezultante cu anticorpi anti-EpCam-FITC, anti-panCK-AF647 și anti-MUC-1-AF750, pentru detecție, și numărate prin citometrie în flux.

Revendicări: 1
Figuri: 3



Procedeu de selectie a celulelor tumorale circulante de adenocarcinom de colon pentru analiza prin citometrie in flux



1. Introducere:

De-a lungul timpului cancerul a constituit unul dintre cauzele majore ale mortalității în rândul oamenilor, în special începând cu secolul XX. Acest motiv a dus la dorința tot mai mare a oamenilor de a cerceta, descoperi și combate această boală precum și de a înțelege mecanismele de acțiune, cauzele și metodele de prevenire a dezvoltării acestei boli devastatoare. Devreme în timpul formării și creșterii unei tumori primare (de exemplu: de sân, de colon, de plămân sau de prostată), o parte din celule se desprind și ajung în circulația sangvină (10^6 cel/1g tesut tumoral/zi) [1,2]. Aceste celule circulă în sângele periferic al pacienților (1-10 cel/1ml sânge periferic) singure sau grupate în clustere de dimensiuni variate [3–6]. Analiza acestor celule tumorale circulante (CTCs) provenite din tumori diagnosticate anterior estede fapt o "biopsie lichidă" în timp real, care aduce informații deosebit de valoroase pentru realizarea prognosticului și pentru modularea terapiei [7]. Avantajele acestei metode de monitorizare față de metodele de laborator (markeri tumorali serici) și imagistice recomandate în prezent (CT, RMN, ecografie, etc) sunt multiple [8], printre ele amintim: (i) sensibilitate crescută, (ii) specificitate, (iii) caracter informativ cu privire la aspecte fenotipice, (iv) caracter cantitativ și (v) rapiditate.

Majoritatea pacienților diagnosticați cu cancer nu prezintă metastază detectabilă clinic. Cu toate acestea, recidiva și progresia la distanță sunt cele mai frecvente cauze ale mortalității la pacienții care suferă de cancer, ceea ce indică o urgență în dezvoltarea strategiilor de prevenire a metastazelor. În Statele Unite ale Americii, cancerul colorectal este al treilea cel mai frecvent tip de cancer care cauzează moartea atât în cazul femeilor cât și în cazul bărbaților [9]. Pacienții diagnosticați cu cancer colorectal în stadiu incipient suferă rezecție tumorală chirurgicală cu scopul vindecării prin îndepărtarea tumorii, dar 20-30% dintre acești pacienți ajung să sufere de metastază în următorii 5 ani de la operație. Acest lucru sugerează că un proces ascuns de dezvoltare a metastazei era deja în curs de desfășurare sau celulele tumorale viabile cu potențial metastazic proliferativ s-au integrat în circulația

sanguină de la situsul tumorii primare în timpul rezecției chirurgicale care a cauzat recidivarea bolii în cazul acestor pacienți. Celulele circulante tumorale prezente în sânge sunt deseori detectate atât în stadii incipiente cât și în stadii avansate ale pacienților cu cancer și au fost considerate un pronostic în majoritatea tumorilor de tip epitelial incluzând sân, colorectal [10], cancer de prostată, ovarian [11] și alte tipuri de cancere ginecologice. A fost recunoscută importanța lor tot mai mare în dezvoltarea bolii și astfel au fost inițiate mai multe studii atât pe animale de laborator folosite ca și modele, cât și pe studii în cohortă. În special, detectarea celulelor circulante tumorale la pacienții care prezintă stadiul incipient de dezvoltare a bolii și prezintă risc de dezvoltare a metastazei pot beneficia de terapie cu adjuvanți după rezecția tumorii primare.

Prezența celulelor tumorale circulante în circulația pacienților bolnavi de cancer a fost evidențiată pentru prima dată de Thomas Ashworth în 1869. După aproape 150 de ani de la această observare, importanța detectării celulelor circulante tumorale cât și caracterizarea lor moleculară a devenit evidentă [12]. Celulele tumorale circulante pot fi izolate într-o manieră noninvazivă și astfel pot fi utilizate ca și o "biopsie lichidă" pentru a putea urmări dezvoltarea tumorii pacientului de-a lungul tratamentului. Aceste celule pot furniza informații semnificative pentru o înțelegere mai bună a biologiei tumorii și a diseminării celulelor. Caracterizarea lor moleculară oferă un potențial unic în înțelegerea mai bună a biologiei metastazei și a rezistenței acesteia la terapiile aplicate [13]. Analiza celulelor tumorale circulante prezintă un domeniu promițător atât pentru stadiile incipiente, cât și pentru stadiile avansate de cancer.

Detectarea celulelor tumorale circulante și caracterizarea lor moleculară sunt extrem de provocatoare deoarece aceste celule sunt prezente în număr foarte mic, iar cantitatea de probă disponibilă este relativ mică. Detectarea celulelor tumorale circulante a fost demonstrată ca fiind de o reală utilitate în managementul clinic al pacienților diagnosticați cu cancer de tip solid, astfel numeroase sisteme de analiză pentru detectarea, izolarea și caracterizarea acestor celule au fost dezvoltate. Astfel, noi arii de cercetare au fost direcționate spre dezvoltarea unor teste noi ce presupun caracterizarea moleculară a celulelor tumorale circulante. A fost observată o heterogenitate mare a celulelor tumorale circulante, chiar și la același individ, atunci când a fost realizat profilul unei celule tumorale circulante unice de dimensiuni mari și

prin măsurarea directă a expresiei genice într-o celulă circulantă tumorală unică. Oricum, numeroase întrebări rămân fără răspuns atunci când privim la biologia celulelor tumorale circulante, în privința unei metode optime de numărare și caracterizare, precum și în dezvoltarea unei metode clinice acceptate de platformele medicale [14]. Țintele cercetărilor privind potențialul clinic al celulelor tumorale circulante includ: estimarea riscului de recidivă sau de progresare a metastazei, observarea în timp real a eficienței tratamentului asupra unui pacient, identificarea țintelor terapeutice și a mecanismelor de rezistență, înțelegerea dezvoltării metastazei în tipul de cancer pe care îl are pacientul.

Tehnici de detecție a celulelor tumorale circulante

Tehnicile de detecție a celulelor tumorale circulante cuprind două părți: abordări privind îmbogățirea /izolarea (tehnici morfologice și imunologice) și abordări privind detecția (tehnici citometrice și pe baza acizilor nucleici).

Metode de îmbogățire a celulelor tumorale circulante

Metodele de îmbogățire a celulelor tumorale circulante sunt bazate pe aspecte morfologice ale celulelor tumorale circulante (mărime și densitate) sau pe selecția celulelor tumorale folosind metode de imunoseparare. Majoritatea acestor metode includ un pas de îmbogățire inițial, cum ar fi centrifugarea în gradient de densitate, filtrarea în funcție de mărime sau separarea imunomagnetică pentru a crește probabilitatea detecției celulelor aflate în număr foarte mic [15].

1. Separarea în funcție de densitate

Bazele separării celulelor în funcție de densitate sunt date de migrarea diferită a celulelor în timpul centrifugării, în conformitate cu densitatea lor, ceea ce ducea la o separare a diferitelor tipuri de celule în straturi distincte. Particulele mai ușoare, ceea ce includ celulele tumorale și cele mononucleare, precum și plasma, rămân la suprafață, iar particulele mai grele, incluzând eritrocitele și neutrofilele, migrează către baza tubului de centrifugă. Separarea în gradient de densitate a celulelor tumorale circulante din cancerul pulmonar a fost realizată folosind metode Ficoll-hypaque sau Oncoquick pentru a separa celulele tumorale circulante și celulele mononucleare de alte tipuri celulare din sânge. Comparând procedura convențională cu Ficoll, tehnica Oncoquick a fost dezvoltată pentru a evita contaminarea straturilor de celule unul cu altul în urma centrifugării, utilizând membrane poroase [16].

2. Separarea în funcție de mărime

Abordările în privința separării care au la bază colectarea celulelor în funcție de mărime, sunt deasemenea folosite. Majoritatea leucocitelor din sângele periferic măsoară între 8-11 micrometri și sunt mai mici decât celulele tumorale circulante provenite din cancere de origine epitelială. Astfel, ele pot fi ușor îndepărtate din probă prin filtrarea printr-o membrană poroasă de policarbonat. Cele mai folosite instrumente ce utilizează membrane cu microfiltru au fost aplicate cu diferite abordări în privința filtrării, cum ar fi izolarea în funcție de mărime a celulelor tumorale epiteliale (ISET). Printre metodele directe utilizate în detecția celulelor tumorale circulante, tehnologia ISET favorizează separarea substanțială a celulelor tumorale circulante în cancerul pulmonar [17]. Mai mult decât atât, deoarece aceste celule sunt disponibile pentru analiza histopatologică, această metodă conferă specificitate pentru identificarea diferitelor fenotipuri ale celulelor tumorale circulante.

3. Separarea imunomagnetică

Una din cele mai utilizate metode de îmbogățire este cea imunomagnetică folosind markeri specifici care sunt exprimați pe suprafața celulelor tumorale circulante. Implică un "pat imunologic magnetic" și un sistem bazat pe ferofluid. Sunt utilizate două caracteristici în procedeele de izolare imunologică curente: markerii specifici celulelor epiteliale (molecula de adeziune epiteliale: EpCAM și citokeratine: CK), care sunt exprimați de celulele tumorale de origine epitelială și markeri tumorali specifici care sunt exprimați de unele tipuri de celule tumorale. Aceste abordări folosesc anticorpi care se leagă de proteine țintă prezente pe suprafața celulelor și acoperă atât strategiile de selecție pozitivă, cât și strategiile de selecție negativă. Din cauza absenței antigenelor tumorale specifice, proteinele specifice celulelor epiteliale, cum ar fi EpCAM și CK au fost utilizate pentru selecția pozitivă a celulelor tumorale circulante, iar anticorpi pentru antigene specifice de pe suprafața leucocitelor, cum ar fi CD45 au fost utilizate pentru a epuiza leucocitele din probele de sânge în cazul selecției negative. Izolarea imunomagnetică este realizată cu anticorpi monoclonali cuplați cu bile magnetice; un magnet puternic și permanent e utilizat pentru a izola celulele tumorale circulante de leucocitele din mediu folosind forța magnetică.

Metode de detecție a celulelor tumorale circulante

Metodele de detectare a celulelor tumorale circulante pot fi clasificate sumar în două grupe: abordări citometrice și abordări bazate pe studiul acizilor nucleici. Tehnicile

bazate pe citometrie utilizează abordări imunocitochimice utilizate pentru a analiza și caracteriza diferite celule tumorale; tehnicile bazate pe studiul acizilor nucleici detectează secvențele ADN sau ARN care au modele distincte de expresie în celulele tumorale și le compară cu secvențele ADN sau ARN din celulele sanguine normale.

1. Abordări imunocitochimice

În imunocitochimie, celulele, pentru a fi detectate sunt atașate pe un suport solid pentru o manipulare mai ușoară. După fixare, celulele sunt căptușite cu unul sau mai mulți anticorpi. Alegerea markerilor petrivii este o provocare, pentru ca antigenele exprimate doar de către celulele tumorale circulante sunt foarte puține. Anticorpilor specifici antigenelor de pe suprafața celulelor epiteliale, cum ar fi EpCAM și CK, sunt cei mai utilizați markeri pentru detecția celulelor tumorale de origine epitelială. Anticorpilor pentru proteine specifice celulelor epiteliale pot indica dacă și cât de multe celule tumorale circulante sunt prezente, iar anticorpilor specifici leucocitelor pot fi utilizați pentru a evita rezultatele fals pozitive. Colorarea poate fi realizată folosind anticorpi primari cu etichete detectabile (cum ar fi molecule fluorescente) sau cu anticorpi secundari detectabili care să se lege de anticorpilor primari. Aceste aplicații de etichetare utilizează reacții enzimatic colorate sau tehnici de fluorescență, iar pentru vizualizare se folosește lupa sau microscopul cu fluorescență. Câteva tehnici de imunofluorescență sunt utilizate în prezent pentru a formula o valoare limită de detectare. Dispozitivele automate de scanare (sistemele automatizate de imagistică celulară (ACIS)) stimulează detectarea celulelor tumorale circulante în timp ce diminuează discrepanța dintre observatori și includ tehnologia de scanare cu fișiere optice, citometrul de scanare cu laser și citometria în flux.

2. Tehnici bazate pe analiza acizilor nucleici

ADN-ul circulant liber poate fi eliberat atât din celulele de tumora primară, cât și din tumora metastatică sau din celulele tumorale circulante apoptotice. Astfel, detecția ADN-ului în plasmă poate avea doar însemnătatea prezenței acizilor nucleici circulanți și nu a celulelor tumorale circulante, sugerând că prezența ADN-ului circulant în circulația sanguină nu are relevanță în detectarea celulelor tumorale circulante. O strategie alternativă ce se bazează pe studiul acizilor nucleici, este detectarea ARNm asociat tumorilor prin reacția PCR revers-transcripție (RT-PCR), care, la ora actuală, este una dintre cele mai utilizate metode în toată lumea pentru detectarea celulelor tumorale circulante la pacienții cu cancer pulmonar [18]. Recent, numeroase studii au

utilizat RT-PCR și variante ale acestei tehnici pentru detectarea celulelor tumorale circulante la pacienții cu cancer pulmonar prin evaluarea expresiei markerilor asociați tumorii (cum ar fi ARNm pentru CEA, ARNm pentru LUNX, ARNm pentru CK19) în circulația periferică. Avantajul abordărilor bazate pe studiul ARN-ului pentru detecția celulelor tumorale circulante este aceea că degradarea ARN-ului eliberat din celule este foarte rapidă în probele de sânge. Prin urmare, transcriptii detectabilei ARN dintr-o probă sunt viabili în celulele tumorale. ARN-ul total este extras din celule prin metode standard și transcris la ADNc folosind reverstrascriptaze. Ulterior, amplificarea PCR e realizată cu ADNc folosind primeri specifici transcriptului de interes.

Pentru a crește sensibilitatea, o reacție PCR adițională ce utilizează câțiva primeri poate fi realizată pe produsul de amplificare al primei reacții (nested PCR). Ambele controale, pozitive au negative, sunt folosite în aceste reacții. În plus, genele housekeeping, cum ar fi gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) și actina- β sunt utilizate pe post de control intern pentru a optimiza calitatea ARN-ului și pentru a normaliza nivelul de expresie al genelor de interes.

Deși detecția și numărarea celulelor tumorale circulante în scopuri de cercetare se face utilizând mai multe tehnologii, singurul sistem omologat (acreditat FDA - *Food and Drug Administration* SUA) este sistemul închis CellSearch® (Janssen Diagnostic LLC) [19]. Strategia de detecție a celulelor circulante provenite din tumori cu ajutorul acestui sistem se bazează pe utilizarea unor kituri specifice [19, 20] care conțin nanoparticule magnetice (așa numitele *ferrofluids*) cuplate cu anticorpi anti-EpCam (clona IgG1 Vu1d9), anti-CK8,18 și 19 (clona C11) și anti-CD45. În plus, kitul mai conține și DAPI pentru marcarea nucleilor. Astfel, cu ajutorul acestui kit se realizează (i) o selecție pozitivă a celulelor (pe baza markerilor EpCam, CK8, 18 și 19 și DAPI) și (ii) o selecție negativă a celulelor (pe baza markerului leucocitar CD45). **Concret, în prezent celulele nucleate (DAPI+) în populația de celule EpCam+ și CK+ din celulele CD45- sunt considerate de interes (EpCam+/CK+/DAPI+/CD45-).**

Spre deosebire de sistemul mai sus menționat, noi ne propunem să utilizăm pentru detecția și numărarea CTCs o tehnologie care stă la baza diagnosticului patologiilor hematologice în întreaga lume: citometria în flux. Această tehnologie constă în marcarea fluorescentă cu anticorpi specifici, a markerilor celulari de interes și detecția semnalului fluorescent rezultat cu ajutorul unui instrument omologat pentru diagnostic in vitro (IVD) – citometrul în flux [21].

Propunem această abordare în contextul în care, celulele tumorale circulante exprimă în afara celor doi markeri epiteliali utilizați la ora actuală și o serie de antigene specifice tipului tumoral de origine. Astfel, alegerea markerilor pentru analize imunocitochimice prin citometrie în flux se poate face în primul rând pornind de la tipul de cancer diagnosticat și apoi, în funcție de gradul de dediferențiere al celulelor circulante.

2. Materiale si metode

A. Material biologic

Model celular *in vitro*

În acest studiu au fost utilizate celule tumorale de adenocarcinom de colon, aparținând liniei celulare HT-29 (ATCC, HTB-38). Celulele HT-29 au fost cultivate în mediu de cultură Dulbecco's modified Eagle's Medium low glucose (DMEM lg) (Sigma-Aldrich, cod D2902), suplimentat cu 3,5 g glucoză, 1,5 g NaHCO₃, 1% antibiotic-antimicotic (ABAM) (Sigma-Aldrich, cod A5955) și 10% ser fetal bovin (SFB) (Gibco, cod 10106-151). Incubarea s-a realizat la 37°C, într-o atmosferă umedă de 5% CO₂, iar mediul de cultură a fost schimbat la fiecare trei zile. Pentru multiplicare, celulele HT-29 ajunse la confluență au fost desprinse de pe substrat cu o soluție de 2,5% tripsina – 0,53mM EDTA și recultivate la o densitate celulară inferioară.

Probele de sange

Probele de sange au fost recoltate de personal calificat, cu respectarea tuturor procedurilor medicale și în acord cu reglementările Declarației de la Helsinki. Probele de sange au fost furnizate în scopuri de cercetare de LotusMed, laborator subcontractat de OncoTeam Diagnostic în cadrul proiectului de cercetare 19PTE/2016 Tumflow finanțat de UEFISCDI (Aprobarea Comisiei de etică a OncoTeam Diagnostic SRL: 1/01.09.2016). Toate studiile *in vitro* cuprinse în acest material au fost executate în cadrul Universității din București și sunt parte integrantă a proiectului de cercetare mai sus menționat. Acest studiu a primit aprobarea Comisiei de Etică a Universității din București: 1/28.02.2018.

B. Validarea unui panel de markeri pentru detecția și numărarea celulelor tumorale colorectale circulante

Conform literaturii de specialitate (Virgo și Gibbis, 2012) celulele tumorale colorectale circulante exprimă pe suprafața lor markerii: EpCam, Her2, EGFR, panCK, c-MET, MUC-1 și SOX2. Față de aceste antigene a fost creat un panel de anticorpi direct cuplați cu fluorocromi. Alegerea anticorpilor cuplați cu fluorocromi a depins de caracteristicile citometrului în flux utilizat pentru detecție (dotarea cu lasere de excitație și cu filtre pentru detecția lungimilor de undă de emisie) și de suprapunerile spectrale ale spectrelor de emisie a fluorocromilor. Astfel, panelul de anticorpi creat pentru detectarea și numărarea celulelor tumorale colorectale circulante este prezentat în tabelul 1.

Tabelul 1: Panelul de anticorpi utilizat pentru detecția și numărarea prin citometrie în flux a celulelor tumorale colorectale circulante

Marker	Fluorocrom
+ EpCam	FITC
+HER2	PerCp Cy 5.5
+EGFR	APC
+panCK	AF 647
c-MET	AF700
+MUC-1	AF750
+SOX2	PB

Validarea acestui panel a fost realizată prin două metode: microscopie de fluorescență și citometrie în flux, folosind celule tumorale de cancer colorectal aparținând liniei HT-29.

a) Validarea expresiei markerilor prin microscopie

Pentru validarea expresiei markerilor prin microscopie, celulele au fost însămânțate pe coverslip la densitatea de 2.5×10^4 celule/probă. După 24h celulele au fost fixate și permeabilizate cu kit-ul Fix and Perm (Nordic MU BIO) conform indicațiilor producătorului.

Protocol de lucru

- Se fixează monostratul celular cu 100 μ l/probă din reactivul A (mediu de fixare, depozitat și utilizat la temperatura camerei);
- Se spală monostratul cu 5 ml tampon fosfat salin;

- Se permeabilizează și se marchează fluorescent celele cu 100 μl din reactivul B (mediu de permeabilizare) și 20 μl din anticorp monoclonal conjugat: EpCam-FITC (StemCell Technologies, code: 60136FI), Her-2-PerCp Cy5.5 (Biolegend, code: 324416), EGFR-APC (Biolegend, code: 352906), panCK-AF647 (Santa-Cruz Biotechnology, code: sc-8018-AF647), c-MET-AF700 (Novusbio, code: FAB3582N), MUC-1-AF750 (Novusbio, code: FAB6298S) și Sox-2-PB (Biolegend, code: 656112)
- Se spală celulele cu tampon fosfat salin;
- Se analizează la microscop.

Pentru analiza celulelor prin microscopie a fost utilizat și marcajul fluorescent DAPI pentru vizualizarea nucleilor. Analizarea celulelor a fost făcută la microscopul confocal Carl Zeiss utilizând softul Zen 2010, versiunea 6.0.

b) Validarea expresiei markerilor prin citometrie în flux

S-au însămânțat celule în plăci cu 6 godeuri la densitate de 0.3×10^5 celule/godeu. După 24h s-au desprins celulele prin tratat enzimatic cu tripsină și EDTA, s-au centrifugat, iar peletul celular a fost prelucrat folosind kitul Fix and Pearm (Nordic MU BIO), conform protocolului de mai jos:

Protocol de lucru

- Celulele au fost fixate cu 100 μl/probă din reactivul A (mediu de fixare);
- După fixare, celulele au fost spălate prin adăugarea a 5 ml tampon fosfat salin/probă și centrifugare 5 min la 300 g;
- După înlăturarea supernatantului peste peletul de celule se adaugă 100 μl/probă din reactivul B (mediu de permeabilizare) și 20 μl din anticorpul monoclonal conjugat potrivit: EpCam-FITC (StemCell Technologies, code: 60136FI), Her-2-PerCp Cy5.5 (Biolegend, code: 324416), EGFR-APC (Biolegend, code: 352906), panCK-AF647 (Santa-Cruz Biotechnology, code: sc-8018-AF647), c-MET-AF700 (Novusbio, code: FAB3582N), MUC-1-AF750 (Novusbio, code: FAB6298S) și Sox-2-PB (Biolegend, code: 656112);
- Se vortexează la viteză mică pentru 1-2 secunde;
- Se incubează la 15 min la temperatura camerei;
- Celulele se spală cu tampon fosfat salin cum a fost decris anterior;

- Se înlătură supernatantul iar celulele se resuspendă în lichid de teacă pentru citometru pentru analiza imediată sau în 0.5 ml formaldehidă 1.0% și se depozitează la 2-8°C la întuneric;

- Analiza celulelor fixate se face în 24 de ore.

Pentru analizarea probelor s-a folosit citometrul în flux Gallios (Beckman Coulter) și softul Gallios.

C. Selectia celulelor tumorale dintr-o proba de sange

Pentru detectia celulelor tumorale colorectale circulante s-au introdus 10^6 celule HT-29 (adenocarcinom colorectal) într-o probă de sânge.

Proba astfel obținută a fost supusă în primă fază unui proces de izolare a celulelor nucleate din sânge cu ajutorul kitului Limpho prep (StemCell Technologies, Canada). Apoi s-a realizat depleția celulelor CD45⁺ din fracția anterior obținută cu ajutorul kitului RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell Technologies, Canada).

Protocol de lucru:

- Se adaugă în proba de sânge care conține 10^6 celule HT-29 50 μ l mix preparat în conformitate cu indicațiile kitului de depleție CD45⁺ RosetteSep™ ;
- Se incubează la temperatura camerei 20 min;
- Se diluază proba într-un volum de 1:1 cu mediul recomandat și se amestecă ușor;
- Se adaugă mediul pentru formarea gradientului de densitate din kitul Lymphoprep;
- Se centrifughează la 1200g pentru 20 min;
- Se colectează fracția de celule mononucleate care este îmbogățită cu celule CD45⁻ și se transferă într-un tub nou;
- Frația colectată se spală cu mediul recomandat;
- Se centrifughează la 300g timp de 10 min;
- Se repetă etapa de spălare și centrifugare; probele au fost analizate imediat în citometru.

3. Rezultate

A. Validarea panelului de markeri

Panelul de markeri selectați a fost testat și validat atât printr-o metodă calitativă (microscopie) cât și printr-o metodă cantitativă (citometrie în flux).

1. Validarea panelului de markeri prin microscopie

Pentru validarea expresiei markerilor de interes de către celulele HT-29 s-a realizat marcajul fluorescent cu anticorpulii specifici. Imaginile de microscopie captate la microscopul confocal Carl Zeiss sunt prezentate în figura 1 și arată că în urma realizării marcajului fluorescent cu DAPI, toți nucleii celulari din probele analizate au fost marcați fluorescent (albastru). Cu toate acestea, semnalul fluorescent pentru antigenele țintă a fost pozitiv doar în cazul EpCam și panCK (fig. 1 a și d).

Fig. 1 prezintă imagini de microscopie de confocală realizate prin analiza celulelor tumorale de adenocarcinom de colon marcate fluorescent cu: a) anticorp anti-EpCam - FITC, b) anticorp anti-Her2-PerCp Cy5.5, c) anticorp anti-RGFR-APC, d) anticorp anti-panCK-AF647, e) anticorp anti-c-MET-AF700, f) anticorp anti-MUC-1-AF750 și anticorp anti-Sox-2-PB; nucleii celulari au fost marcați cu DAPI (fluorescență albastră).

În concluzie, prin microscopie a fost posibilă validarea markerilor EpCam și panCK din panelul inițial selectat.

2. Validarea panelului de markeri prin citometrie în flux

Citometria în flux a fost utilizată ca metodă cantitativă, cu o sensibilitate crescută, pentru detecția expresiei markerilor de interes. Pentru realizarea analizei, s-a realizat un set de probe marcate cu anticorpulii de interes direct cuplați cu fluorocromi și controalele lor de izotip prelucrate în mod identic probelor și marcate cu anticorpulii: IgG- FITC (Beckman Coulter, code A07795), IgG- PerCp Cy5.5 (Biolegend, code 400149), IgG- APC (Biolegend, code 400121), IgG- AF700 (Novusbio, code IC002N), IgG-AF750 (Novusbio, code IC002S) and IgG-PB (Biolegend, code 400131)). Astfel, pentru toți fluorocromii selectați s-a ales și un control de izotip pentru eliminarea erorilor generate de legări nespecifice.

Pentru analiza în citometrie în flux a fost creat un protocol de lucru la citometrul Gallios care a presupus generarea următoarelor diagrame:

a) diagrama a doi parametrii: FF și FS care oferă informații cu privire la dimensiunea și granularitatea celulelor analizate și care are rolul de a afișa populația de celule analizate.

b) câte o histogramă (diagramă cu câte un singur parametru de fluorescență) pentru fiecare detector de culoare utilizat: FL1 pentru FITC, FL4 pentru PerCp Cy5.5, FL6 pentru APC, FL7 pentru AF700, FL8 pentru AF750 și FL9 pentru PB.

Într-o primă etapă a fost achiziționată o probă nemarcată pentru ajustarea parametrilor FS și SS astfel încât populația de celule să fie afișată în diagrama FS/SS descrisă mai sus. În continuare au fost achiziționate toate probele marcate cu controalele de izotip pentru stabilirea zonei de negativitate pe scala de fluorescență a histogramelor. După efectuarea acestor ajustări au fost achiziționate probele marcate cu anticorpii de interes direct cuplați cu fluorocromi, iar histogramele rezultate au fost prezentate în figura 2.

Fig. 2 prezintă histograme de citometrie în flux obținute în urma analizei celulelor HT-19 marcate cu a) anticorp anti-EpCam-FITC, b) anticorp anti-Her2-PerCp Cy5.5, c) anticorp anti-RGFR-APC, d) anticorp anti-panCK-AF647, e) anticorp anti-c-MET-AF700, f) anticorp anti-MUC-1-AF750 și anticorp anti-Sox-2-PB (citometru în flux Gallios Beckman Coulter, Software Gallios).

În concluzie, prin citometrie în flux a fost confirmată expresia celor două antigene validate prin microscopie: EpCam și panCK și în plus, a fost validată expresia MUC-1.

B. Selectia celulelor tumorale colorectale circulante

Pentru optimizarea protocolului de detecție a celulelor tumorale colorectale circulante a fost necesară parcurgerea unei etape de optimizare a selecției celulelor HT-29 într-o probă de sânge. Această etapă este esențială pentru optimizarea protocolului de îmbogățire a probei cu celulele de interes și a constat în depleția celulelor CD45⁺ (celule nucleate sangvine) dintr-o probă de sânge care conține 10⁶ celule HT-29.

Conform protocolului descris în capitolul de materiale și metode, secțiunea C, cu ajutorul kitului RosettesSep de depleție CD45⁺, odată cu izolarea fracției de celule nucleate s-a realizat depleția celulelor CD45⁺, iar celulele rămase au fost marcate cu anticorpi anti-EpCam-FITC, anti-panCK-AF647 și anti-MUC-1-AF750 (validați anterior) și analizate în citometrul în flux Cytotflex (Beckman Coulter).

Protocolul de achiziție și de analiză a inclus următoarele diagrame:

a) diagrama cu doi parametri: FS și SS care oferă informații cu privire la dimensiunea și granularitatea celulelor analizate și care are rolul de a afișa populația de celule analizată;

b) câte o histogramă (diagramă cu un singur parametru de fluorescență) pentru fiecare detector de culoare utilizat;

c) o diagramă cu doi parametri: FITC și AF647 în care se disting populațiile de celule pozitive pentru FITC (Celule EpCam pozitive), pentru AF647 (celule panCK pozitive), și pentru ambele marcaje;

d) o diagramă cu doi parametri: FITC și AF647 în care se disting populațiile de celule pozitive pentru FITC (Celule EpCam pozitive), pentru AF750 (celule MUC-1 pozitive), și pentru ambele marcaje;

În figura 3 sunt prezentate histogramele obținute în urma achiziționării probei. Rezultatele arată că în urma procesării probei au fost recuperate celule EpCam, panCK și MUC-1 pozitive (fig. 3 a, b și c). Mai mult, aceste celule sunt triplu pozitive pentru markerii analizați (fig. 3 d și e).

Fig. 3 prezintă histograme de citometrie obținute în urma analizei celulelor izolate prin depleția celulelor CD45⁺ dintr-o probă de sânge care conține 10⁶ celule HT-29: a) histograma pe detectorul pentru FITC (EpCam), b) histograma pe detectorul pentru AF647 (panCK) și c) histograma pe detectorul pentru AF750 (MUC-1). Diagrame cu doi parametri: d) FITC (EpCam)/AF647 (panCK) și e) FITC (EpCam)/AF750 (MUC-1).

Aceste rezultate indică eficiența izolării celulelor tumorale dintr-o probă de sânge adoptând strategia de selecție negativă, prin depleția celulelor CD45⁺. Rezultatele de citometrie in flux arată ca 96.04% din celulele izolate au fost pozitive pentru EpCam, panCK și MUC-1.

4. Concluzii

Am validat prin microscopie confocală și citometrie in flux expresia markerilor EpCam, panCK și MUC-1 de către celulele tumorale de adenocarcinom de colon HT-29 și am optimizat un protocol de selecție a celulelor tumorale colorectale HT-29 dintr-o probă de sânge prin depleția celulelor CD45⁺. Verificarea recuperării celulelor HT-29 din probă de sânge s-a realizat pe baza expresiei markerilor anterior validați (EpCam, panCK și MUC-1), prin citometrie in flux. Eficiența selecției a fost de 96.04%.

Revendicări depuse conform
art. 14 alin. 7 din legea nr. 64 / 1991
la data de 06 -11- 2018

REVENDICARI

1. Procedeu de selectie a celulelor tumorale circulante de adenocarcinom de colon pentru analiza prin citometrie in flux **caracterizat prin aceea ca** proba de sange periferic (recoltat pe anticoagulant) este „imbogatita” cu celule tumorale circulante prin depletia celulelor CD45⁺ din fractia de celule nucleate din sange si marcarea celulelor rezultate cu anticorpi anti-FITC, anti-panCK-AF647 si anti-MUC-1-AF750 pentru detectie si numarare in citometru in flux.

FIG. 1

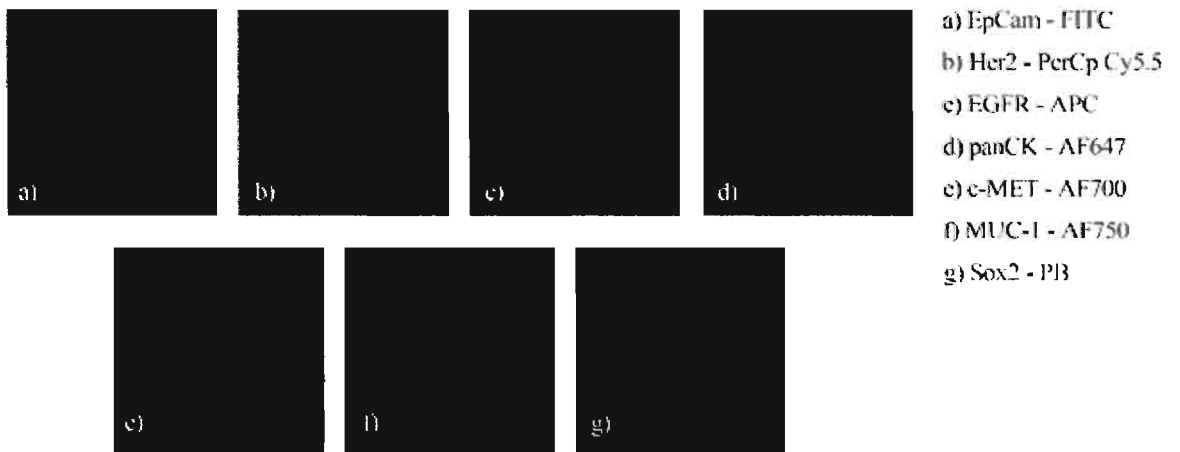


FIG. 2

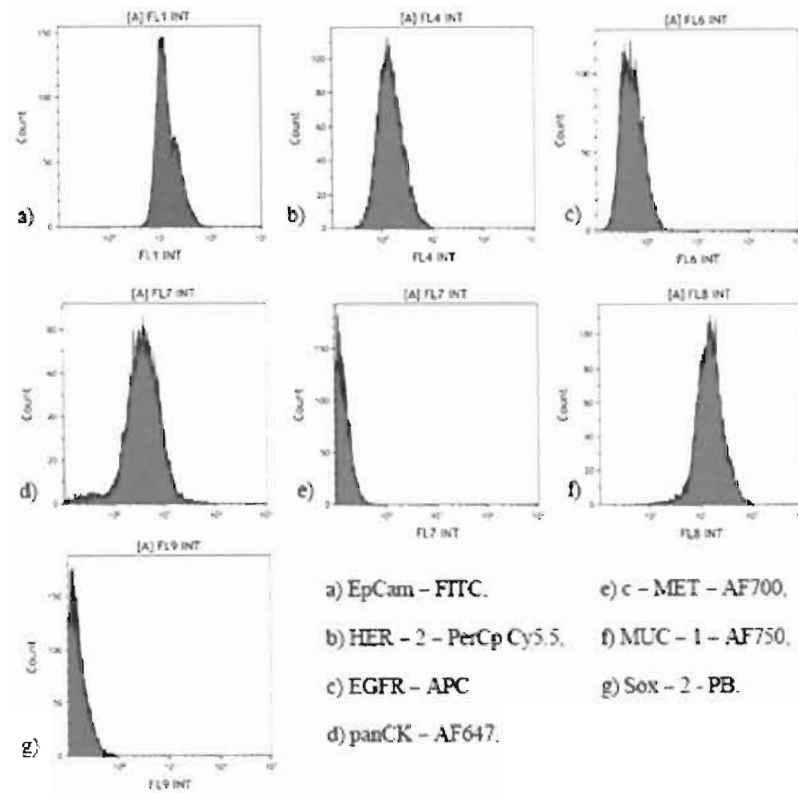


FIG. 3

