

УДК 57.083

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Железняк И.А. (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики)

Научный руководитель – старший научный сотрудник Арсентьева Н.А.
(НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера)

Существуют различные методы обнаружения циркулирующих опухолевых клеток в крови больных. Проведен анализ существующих методов и разработка новой методики идентификации на основе иммунофлуоресценции и проточной цитометрии. Обнаружение циркулирующих опухолевых клеток играет важную роль в диагностике и лечении пациентов с онкопатологией.

Введение. Обнаружение циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови было впервые описано более века назад австрийским патоморфологом Т.Р. Эшвордом. Опухолевые клетки входят в кровообращение после отделения от первичной опухоли и могут мигрировать, чтобы достичь отдаленных органов, где они могут имплантироваться и дать начало метастазам. Метастазы, вызванные попаданием ЦОК в кровотоки или лимфатические сосуды, является основным фактором, способствующим смерти у онкологических больных. Таким образом, идентификация ЦОК дает прогностическую информацию при злокачественном образовании и распространении метастатической опухоли.

В настоящее время огромные усилия сосредоточены на оптимизации технических аспектов выделения и оценки ЦОК из периферической крови. Один из способов выделения ЦОК – технология ISET (Париж), при которой путем пропускания цельной крови через фильтр с порами 8 мкм в диаметре выделяются ЦОК. Основным недостатком этого подхода – неспособность захватывать небольшие ЦОК, что делает затруднительным клиническое применение этого метода. Многие исследователи при определении ЦОК в крови использовали систему CellSearch (США). В основе этой технологии лежат методы иммунофлуоресценции, иммуномагнитного разделения и проточной цитометрии. Недостатком является высокая вероятность ложноположительного результата из-за экспрессии используемых антигенов на неопухолевых клетках. Самым перспективным методом является CTC-chip, основанным на микропроточной системе. Для данной технологии нет клинических подтверждений.

Следовательно, в будущем мониторинг ЦОК может стать рутинным анализом для клинического исследования, что поможет спрогнозировать эффективность терапии у онкологических больных.

Основная часть. Наиболее перспективными технологиями выделения ЦОК являются иммуномагнитные методы, так как они позволяют проводить дальнейшие исследования клеток. Оценка уровня экспрессии нескольких маркеров увеличивает специфичность и чувствительность методов анализа.

Присутствующие в крови пациента ЦОК являются очень редкими событиями, поэтому необходимо обогащать образец для большей концентрации ЦОК в полученном образце. Для этого необходимо использовать метод выделения мононуклеарных клеток периферической крови на градиенте плотности. Для этого используем Ficoll-Нураque: из-за разницы в плотности, можно разделить ЦОК и мононуклеарные клетки из клеток крови, а также необходимо использовать клеточную среду RPMI, которая традиционно используется для выращивания лимфоидных клеток человека. Для контроля выделения целесообразно использовать общий клинический анализ, взятый до и после выделения мононуклеаров.

После выделения в результате общего клинического анализа должно произойти увеличение лимфоцитов примерно на 60-70%.

Далее для идентификации клеток интереса необходимо использовать специальные клеточные маркеры, что поможет отделить их от лейкоцитов. Для этого используем метод магнитной сепарации клеток. На поверхности ЦОК находятся эпителиальные маркеры, поэтому для выделения добавляем ЕpСAM-PE – молекулы клеточной адгезии. Далее необходимо добавить магнитные частицы против PE и инкубировать. После помещения образца в магнитный штатив клетки интереса останутся на стенках пробирки со стороны магнита.

Дальнейший этап – использование панели моноклональных антител для дальнейшего анализа на проточном цитометре. Панель состоит из CD45 – поверхностный лейкоцитарный антиген, DAPI – маркер жизнеспособности клеток, ЕpСAM, цитокератины (СК) – белки цитоскелета, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста и CD66 – раково-эмбриональный антиген.

Финальным этапом является анализ экспрессии на проточном цитофлуометре. Методом поэтапного гейтирования в программе выделяем клетки ЦОК. Путь гейтирования начинается с выделения одиночных клеток, из них выделяем живые клетки (DAPI+), из живых клеток выделяем клетки, имеющие негативную экспрессию по лейкоцитарному антигену, так как ЦОК не имеют поверхностных антигенов, которые бы могли связаться с CD45. Далее находим клетки по положительной экспрессии на белки цитоскелета и молекулы клеточной адгезии (ЕpСAM+ и Cytokeratin+) и принимаем их за ЦОК. В популяции ЦОК (Cytoker+ЕpCam+) определяем экспрессию маркеров EGFR и CD66, что позволяет нам выделить еще четыре субпопуляции клеток. Вероятно, будет наблюдаться негативная экспрессия на антиген CD66 и положительная экспрессия на EGFR, так как опухолевые клетки являются трансформированными эпителиальными клетками.

Выводы. Методика апробирована на семи пациентах с такими диагнозами, как рак ректоксичного отдела с метастазами в печени и рак предстательной железы. Результаты показали прямую корреляционную зависимость в содержании субпопуляций клеток: CD45-CD66+, CD45-ЕpCam+Cytokeratin+EGFR+CD66-.

Таким образом, данные субпопуляции клеток возможно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров терапии рака предстательной железы. Однако учитывая разнонаправленные тенденции количества исследуемых субпопуляций клеток у обследованных пациентов, индивидуальные особенности больных, необходимы дальнейшие исследования с большей выборкой человек, группой сравнения пациентов и пациентами с другим видом рака. Данные исследования помогут достичь высокого уровня доказательности для внедрения в клиническую практику.

Железняк И.А. (автор)

Подпись

Арсентьева Н.А. (научный руководитель)

Подпись