

Zavádění hmotnostní cytometrie do lékařské praxe pro rychlejší a spolehlivější vyšetření mozkových nádorů

F. Waloszek Garcia N 'Dua,
Š. Kučková, M. Vášková

Abstrakt

Nedávno byl v laboratoři CLIP jako první přístroj tohoto druhu v České republice nainstalován hmotnostní cytometr CyTOF2, který umožňuje analyzovat současně a na úrovni jedné buňky několiknásobně větší počet buněčných znaků než průtoková cytometrie. Cytometrické vyšetřování mozkových nádorů je ojedinělé i v mezinárodním měřítku a hmotnostní cytometrie podle dostupných publikací nebyla dosud na tento závažný problém aplikována. Po roce práce se na tomto stroji podařilo úspěšně zavést postupy pro přípravu a uchování buněčných suspenzí z mozkových nádorů a sestavit panely protilátek pro identifikaci buněčných populací v mozkových nádorech.

V nadcházejícím období by měly být v laboratoři vyšetřovány mozkové nádory nově vytvořenými postupy a na výzkumné úrovni dokonce rutinně.

Úvod

Tato práce se zabývá zavedením nové bioanalytické metody pro určení různých typů mozkových nádorů, které spolu s akutními leukémiemi patří mezi nejčastější maligní onemocnění dětského věku. Mozkové nádory jsou v této věkové skupině nejčastějšími solidními nádory a také druhou nejčastější příčinou úmrtí. Jedná se o komplexní onemocnění, pro které jsou typické patologické projevy na úrovni DNA, mRNA i proteinů. Velmi často dochází ke změně proteinového profilu a nalezení charakteristických odlišných proteinů má velký význam pro odlišení maligních a nemaligních buněk. [1]

V diagnostice leukémií má své nezastupitelné místo průtoková cytometrie (FC), což je metoda, která má jedinečnou schopnost analýzy velkého počtu znaků na úrovni jedné buňky v krátkém časovém intervalu. Propojuje v sobě principy spektrofotometrie, mikroskopie a metody analýzy obrazu. [2] Podstatou

FC je použití a následné sledování fluorescenčně značených protilátek, které se váží na epitopy na povrchu nebo uvnitř buněk. Fluorescenční technologie jsou široce používány v různých odvětvích, ale jejich schopnost držet krok s neustále se zvyšující potřebou sledování vyššího množství znaků v jedné buňce klesá. I ve velmi dobře vybavených a s cytometrií velmi dobře obeznámených laboratořích je technicky náročné přesáhnout při běžném měření na průtokovém cytometru 10 znaků. Fluorochromy neemitují záření o jediné vlnové délce ale v širších páslech a světlo je sice kanály sbíráno pouze v určitých oblastech vlnových délek, kde emise dosahuje svého maxima, ale i tak je značnou nevýhodou přesvit signálu do vedlejších kanálů, což se projeví zvýšením šumu pozadí. [3]

Cílem práce bylo zavedení metody pro rychlé a spolehlivé vyšetřování mozkových nádorů pomocí nové cytometrické techniky – hmotnostní cytometrie. Metoda využívá monoklonální protilátky označené izotopy těžkých prvků, které se váží na nádorové buňky, které jsou poté analyzovány hmotnostním spektrometrem. [3] Hlavním úkolem bylo zavést postupy pro zpracování nádorové masy a vytvoření panelů znaků, jejichž pomocí bude možné sledovat buněčnou komplexitu mozkových nádorů. Sestavené panely umožní identifikovat infiltrující leukocytární populace, endotelové buňky cévního zásobení nádorů a vlastní nádorové buňky. U nich je pak možné stanovit fáze buněčného cyklu, proteiny definující nádorové kmenové buňky a proteiny, jejichž míra exprese by měla vypovídat o agresivitě nádoru.

Princip hmotnostní cytometrie

Na začátku je důležité si představit přístroj, na kterém probíhal samotný výzkum a pozdější vyšetřování nádorových tkání. Hmotnostní cytometr CyTOF2 (Cytometry by Time Of Flight) je přístroj nové generace, který je rozšířením hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Hlavní předností této metody je využití lanthanoidů, které se v přírodě vyskytují pouze ve formě sloučenin a navíc pouze mimo živé organismy. Kovy těchto vzácných zemin tvoří velké množství izotopů různých atomových hmotností. V případě že výrobce neposkytuje protilátky s požadovaným lanthanoidem, je možné konjugaci provést přímo v laboratoři dle postupů od výrobce. Protilátky dále reagují s nádorovými buňkami. Na základě rozdílných izotopových hmotností, které tak vytvářejí charakteristické značení, je možné rozlišit jejich různé interakce s nádorovými či zdravými buňkami. Hmotnostní cytometr může zpracovat přibližně 1000 buněk za 1 sekundu. [4]

Hledání vhodných postupů pro přípravu a uchování buněčných suspenzí z mozkových nádorů

Vlastní experimentální práce se skládala z několika částí. V první řadě byly zkoumány vhodné postupy pro přípravu a uchování buněčných suspenzí z mozkových nádorů pro následnou analýzu na hmotnostním cytometru, protože jeho obsluha i časová náročnost jsou složitější než u klasického průtokového cytometru, který umožňuje měřit označenou suspenzi protilátkami ihned. Rychlost měření je až 25 000 buněk/s. [3] V rámci přípravy tkání k analýze bylo vyzkoušeno několik pracovních postupů. V prvním případě byly buňky nejprve zafixovány 1,6% paraformaldehydem, poté označeny směsí protilátek a uchovány v methanolu při -80°C . V druhém případě byly buňky nejdříve uskladněny při -80°C v methanolu, díky němuž došlo k permeabilizaci buněčné membrány. Po rozmrazení byly buňky již označeny intracelulárně. Tento postup byl proveden i se vzorkem určeným pro měření na průtokovém cytometru. V posledním případě byl vzorek označen protilátkami a ihned změřen na průtokovém cytometru. Porovnáním výsledků z obou cytometrů bylo možné říci, že pro měření na CyTOFu je možné použít vzorky uchované v methanolu při -80°C . U hmotnostního cytometru byly intracelulárně značené buňky dokonce lépe odlišitelné.

Vytvoření panelů sledovaných antigenů na dětských mozkových nádorech

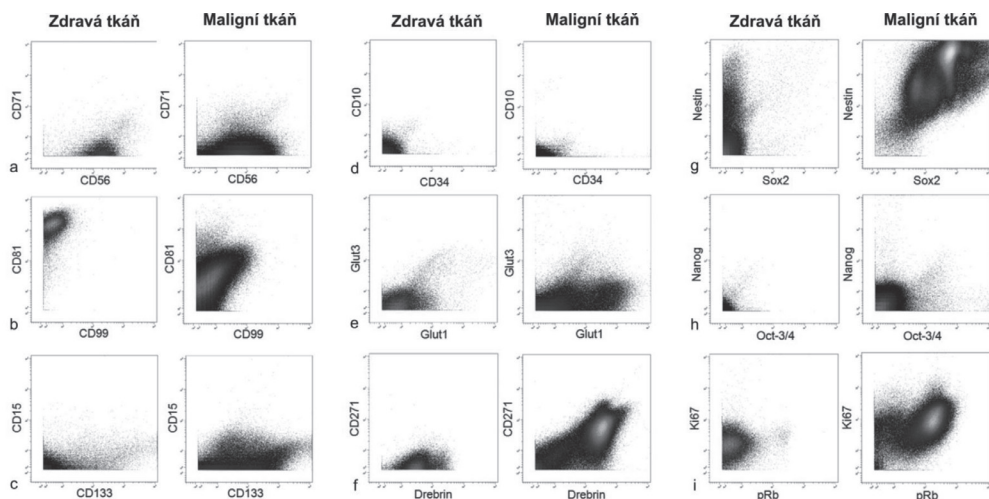
Další část práce byla zaměřena na vytváření panelů pro vyšetřování nádorových tkání. Panely znaků (protilátek) již existují pro diagnostiku různých typů leukémií a cílem této práce bylo je nově vytvořit i pro mozkové nádory, zatím pouze pro výzkumné účely. Panely nejprve zahrnovaly pouze DNA interkalátor používaný k identifikaci jednotlivých buněčných částic a znaky umožňující identifikaci přítomných nenádorových buněk (převážně leukocytů). Po ověření protokolů přípravy vzorků byly přidávány další markery k identifikaci nádorových buněk. Aktuálně existují dva panely. Jeden z nich obsahuje více protilátek pro bližší identifikaci leukocytárních subpopulací pro případné studium infiltrujících buněk imunitního systému. V obou panelech jsou pak zahrnuty protilátky proti molekulám CD45 a CD11b, které umožní vyloučit z analýzy nádorových buněk infiltrující (kontaminující) leukocyty a mikroglie. Antigen CD45 je exprimován všemi krvetvornými buňkami, kromě cirkulujících erytrocytů a trombocytů; značí tedy buněčnou membránu leukocytů. Antigen CD11b nesou myeloidní buňky včetně mikroglie.

V průběhu sestavování panelů bylo změřeno 10 vzorků mozkových nádorů a tři vzorky kontrolní tkáně odebrané při epileptochirurgických výkonech (chirurgickém řešení epilepsie). U vzorku nádorové a kontrolní tkáně je demonstrován možný charakter exprese některých znaků a připravenost panelu pro vyšetřování u nádorových vzorků (obr. 1). Na dílčích obrázcích, které patří námi vybraným a sledovaným znakům z vytvořených panelů, jsou vidět jejich rozdílné distribuce a množství v případě zdravé a maligní mozkové tkáně. Změření kontrolní zdravé tkáně umožnilo zjistit, jaké je pozadí pro znaky, které v kontrolním vzorku nejsou dle očekávání přítomny (na buňkách nervové tkáně to jsou např. CD10, CD34 – Obr. 1d). I když zde na rozdíl od průtokové cytometrie k pozadí nepřispívá autofluorescence buněk, pro obě metody je společná možnost jisté míry nespecifické vazby protilátek i na buňky, které dané znaky nenesou. Vzhledem k možnosti měření mnoha znaků najednou tak k tomuto typu pozadí ve vzorku pro hmotnostní cytometr přispívá více protilátek než u průtokové cytometrie. Míra nespecifické vazby jednotlivých protilátek je různá a závisí také na správném vytitrování protilátek (které bylo součástí sestavování panelů) a kvalitě zpracovávaného vzorku – hlavně na viabilitě (která byla v každém vzorku před jeho přípravou pro hmotnostní cytometr stanovena pomocí průtokové cytometrie).

U proteinů, jejichž přítomnost je v nervové tkáni očekávaná (fyziologická), např. u drebrinu (Obr. 1f), stanovení znaku v nenádorové tkáni umožňuje hodnotit, zda jsou v nádorových buňkách obsaženy v míře vyšší nebo nižší než je fyziologická. [5]

Prezentovaný nádor je tzv. embryonální tumor s abundantním neuropilem a pravými rozetami, s vysokým stupněm malignity (WHO grade 4). Embryonální původ pravděpodobně vysvětluje vysokou pozitivitu transkripčního faktoru Sox2 a proteinu nestinu (Obr. 1g). Transkripční faktory Oct-3/4 a Nanog jsou však negativní (Obr. 1h). Seymour et al. (2015) uvádí, že přítomnost Sox2, Oct-3/4 a Nanog by mohla souviset se stupněm malignity nádoru (tzv. grade). Zjistili také, že Sox2 se vyskytuje u vysoce invazivních mozkových tumorů. [6] Částečně pozitivní jsou i další znaky nádorových kmenových buněk – CD133 a CD271 (Obr. 1f,c).

Dalším proteinem s vyšší pozitivitou než v nenádorové tkáni je drebrin (Obr. 20f), což je také v souladu s vysokým stupněm malignity nádoru. [6] Práce z naší laboratoře prokázala asociaci vysoké exprese proteinu s maligní lymfoproliferací. [7]



Obr. 1: Rozdíly u těch nejzásadnějších odchylek a faktorů, které jsou hlavní při diagnostice nádoru (zdravá tkáň ZT versus maligní tkáň MT) **a)** (ZT): Silná exprese CD81 a negativita CD99. **b)** (MT): Slabá exprese CD81 a negativita CD99, očekává se variabilita obou znaků u různých nádorů. **d)** (ZT): Znaky CD10 a CD34 jsou podle očekávání negativní. **d)** (MT): Znaky CD10 a CD34 jsou negativní (pozitivita je očekávána vzácně u některých typů nádorů). **e)** (ZT): Glut3 ani Glut1 transportér nejsou téměř přítomny. **e)** (MT): Transportér Glut3 je negativní, Glut1 pouze na malé části buněk (očekává se velká variabilita v expresi). **f)** (ZT): Negativita CD271 a očekávaná pozitivita cytoskeletálního proteinu drebrinu. **f)** (MT): Pozitivita CD271 (znak nádorových kmenových buněk) a cytoskeletálního proteinu drebrinu. **g)** (ZT): Téměř negativní cytoskeletální protein nestin a negativní transkripční faktor Sox2. **g)** (MT): Pozitivita cytoskeletálního proteinu nestin a transkripčního faktoru Sox2. **i)** (ZT): Necyklující buňky (Ki67-pRb-). **i)** (MT): Většina buněk je proliferujících (Ki67+pRb+).

Většina buněk ve vzorku tohoto nádoru je proliferujících (Ki67+ pRb+) (Obr. 1i) na rozdíl od buněk nenádorových (Obr. 1j), pozitivita Ki67 je i součástí patologického nálezu. [8] Prezentované grafy jsou pouze jednou z možností prohlížení a analýzy získaných dat. Vždy je možné v dvojrozměrném grafu zobrazit libovolně vybrané znaky (parametry) a ty lze navíc analyzovat v různých tzv. gatech, které jsou definovány jako oblasti buněk mající stejné antigenní vlastnosti (CD45neg nehematopoetické buňky, CD45+ leukocyty, proliferující buňky atd.).

Závěr

Hlavním cílem práce bylo zavedení cytometrického vyšetřování mozkových nádorů do laboratorní praxe. Součástí práce bylo zavedení postupů pro přípravu a uchování buněčných suspenzí z mozkových nádorů pro následnou analýzu na hmotnostním cytometru. Rovněž se podařilo sestavit panely protilátek pro identifikaci nádorových buněk a dalších buněčných populací přítomných v mozkových nádorech, jejichž současná podoba umožňuje v nádorových vzorcích identifikovat infiltrující (a případně kontaminující) leukocytární populace, endotelové buňky cévního

zásobení nádorů a vlastní nádorové buňky. U nich je pak možné stanovit fáze buněčného cyklu, proteiny (povrchové i jaderné transkripční faktory) definující nádorové kmenové buňky a proteiny, jejichž míra exprese by měla vypovídat o agresivitě nádoru.

Po roce, po který byl přístroj k dispozici a kdy se jednalo o technologii, se kterou nebyla v laboratoři žádná předchozí zkušenost, je možné prakticky vyšetřovat vzorky mozkových nádorů. Cytometrické vyšetřování mozkových nádorů je ojedinělé i v mezinárodním měřítku a hmotnostní cytometrie podle dostupných publikací nebyla dosud na tento závažný problém aplikována. V nadcházejícím období by měly být v laboratoři vyšetřovány mozkové nádory již zavedenými postupy a na výzkumné úrovni dokonce rutinně.

Podpora:

Práce byla vypracována s podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR NPU I č. LO1604 a OPVK reg.č.: CZ.2.16/3.1.00/21540.

Použitá literatura

1. Mayer, J., Starý, J. (2002): Leukemie. 1. vydání. Praha: Grada.

2. **Shapiro, H. M. (2003):** Practical flow Cytometry. United States: Wiley, John & Sons.
3. **Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M., Chattopadhyay, P. K. (2012):** A deep profiler's guide to cytometry, Trends in Immunology, 33(7), 323–332.
4. **Doubek, M. (2015):** Significance of minimal residual disease in chronic lymphocytic Leukemia, Klinická onkologie: časopis české a slovenské onkologické společnosti, 28(3), 16–21.
5. **Terakawa, Y., Agnihotri, S., Golbourn, B., Nadi, M., Sabha, N., Smith, C. A., Croul, S. E., Rutka, J. T. (2013):** The role of drebrin in glioma migration a invasion, Experimental Cell Research, 319(4), 517–528.
6. **Seymour, T., Nowak, A., Kakulas, F. (2015):** Targeting aggressive cancer stem cells in Glioblastoma, Frontiers in Oncology, 5.
7. **Vaskova, M., Kovac, M., Volna, P., Angelisova, P., Mejstrikova, E., Zuna, J., Brdicka, T., Hrusak, O. (2011):** High expression of cytoskeletal protein drebrin in TEL/AML1pos b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia identified by a novel monoclonal antibody, Leukemia Research, 35(8), 1111–1113.
8. **Behbehani, G. K., Bendall, S. C., Clutter, M. R., Fantl, W. J. a Nolan, G. P. (2012):** Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle, Cytometry Part A, 81A(7), pp. 552–566. doi: 10.1002/cyto.a.22075.