

### **Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego**

Przedmiotem wynalazku jest sposób identyfikacji komórek prawidłowych i komórek nowotworowych, w szczególności prawidłowych limfocytów B i komórek chłoniaków nieziarniczych u pacjentów z podejrzeniem chłoniaka. Wynalazek należy do dziedziny diagnostyki nowotworów układu chłonnego.

Chłoniaki nie-Hodgkinowskie (NHL) są ósmą przyczyną zachorowań na nowotwory na świecie u mężczyzn i jedenastą u kobiet. Szacuje się, że chłoniaki te diagnozuje się rocznie u ponad 350 000 osób. Liczba zgonów wynosi około 200 000. W Polsce chłoniaki nie-Hodgkinowskie stanowią około 3% zachorowań i zgonów na choroby nowotworowe u mężczyzn i 2.5% u kobiet wg. Krajowego Rejestru Nowotworów, 2014r . W ciągu wielu lat coraz dokładniejszych badań ustalono, że pod tą samą nazwą kryją się różne podtypy chorób. Mimo iż chłoniaki mogą mieć początkowo podobne objawy kliniczne, to ich profil genetyczny i molekularny jest odmienny, a zatem są zróżnicowane pod względem rokowania, przebiegu i leczenia.

Obecnie stosowane procedury diagnostyczne u pacjentów z podejrzeniem choroby rozrostowej układu chłonnego obejmują ocenę patomorfologiczną tkanek pobranych ze zmienionego chorobowo narządu bądź też cytometrię przepływową materiału biopsyjnego.

Jako standard w diagnostyce chłoniaków stosuje się badanie histopatologiczne na podstawie badania różnych materiałów w zależności od obrazu klinicznego. Wycinki pobierane drogą chirurgiczną najczęściej pochodzą z węzłów chłonnych lub tkanek pozawęzłowych: skóry, przewodu pokarmowego, szpiku kostnego, śledziony, grasicy i migdałków. W większości przypadków w celu doprecyzowania rodzaju chłoniaka konieczne jest wykorzystanie przynajmniej jednego badania dodatkowego: immunohistochemii, badania genetycznego lub molekularnego.

PK/4935/AR

Badanie immunohistochemiczne to diagnostyka różnicowa chłoniaków opierająca się na National Comprehensive Cancer Network. Interpretacja immunofenotypu powinna być skorelowana z obrazem klinicznym i cechami morfologicznymi chłoniaków.

W cytometrii przepływowej materiał z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej węzła chłonnego, krwi obwodowej lub szpiku zostaje poddany immunofenotypowaniu.

Diagnostyka chłoniaków uwzględnia również badanie cytogenetyczne (hybrydyzacja in situ/FISH) oraz badanie cytologiczne, w którym analizuje się materiał z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej węzła chłonnego, krwi obwodowej lub szpiku, a także diagnostykę obrazową wykorzystującą techniki tomograficzne.

Ze stanu techniki wiadomo o innych próbach dostarczenia skutecznego testu diagnostycznego, który mógłby być wykorzystany w przypadkach chorób przerostowych układu chłonnego.

EP2697256 dostarcza sposób diagnozowania chłoniaków opierający się na wykrywaniu ekspresji białek LY6G6F, VSIG10, TMEM25 i LSR.

US4038145 ujawnia metodę diagnostyczną, w której stosuje się mieszaną reakcję limfocytarną (MLR) w hodowli tkankowej do wykrywania reakcji autoimmunologicznej wywołanej przez nowotwór, charakterystycznej dla nowotworów limfoidalnych. Limfocyty pochodzące z krwi, śledziony i węzłów chłonnych są stosowane w kombinacji. Mieszana reakcja limfocytarna w wyniku dowolnej z trzech możliwych kombinacji wskazuje na obecność nowotworu limfoidalnego.

EP3221467 ujawnia metodę diagnostyczną do wykrywania chłoniaków, obejmującą następujące etapy: określenie poziomu ekspresji hGSTA1 w próbce nowotworu uzyskanej od pacjenta, ii) porównanie poziomu ekspresji określonego w kroku i) z ustaloną z góry wartością odniesienia, ii) stwierdzenie, że pacjent jest chory, gdy poziom ekspresji hGSTA1 jest niższy niż określona z góry wartość odniesienia.

EP3167288 dotyczy sposobów diagnozowania nowotworów krwi. W szczególności, niniejszy wynalazek dotyczy sposobu zawierającego etapy i) wykrywanie obecności komórek CD45RARO NK w próbce otrzymanej od pacjenta, ii) oraz stwierdzenie, że pacjent cierpi na nowotwór krwi, gdy obecność komórek CD45RARO NK wykrywa się w próbce, a obecność co najmniej jednego markera fenotypowego wskazuje na typ nowotworu.

EP2612869 dostarcza przeciwciało mające zdolność wiązania się z izoformą ED-A fibronektyny, przy czym wiązanie się przeciwciała z białkiem wskazuje na obecność komórek nowotworu układu chłonnego.

PK/4935/AR

US2011287948 ujawnia sposób diagnozowania nowotworów, w tym chłoniaków, na podstawie algorytmu uwzględniającego pomiar sił adhezyjnych pomiędzy komórkami patologicznymi w mikroskopie sił atomowych (AMF) lub szczypcach optycznych.

EP2624742 zapewnia metodę diagnostyczną, w której analizuje się mechaniczne właściwości komórek nowotworowych i komórek referencyjnych pod obciążeniem mechanicznym, które prowadzi do liniowego lub nieliniowego odkształcenia obciążonej komórki. Ekspansja komórek, która jest wynikiem zastosowania mechanicznego naprężenia, jest wykorzystana do określania ryzyka przerzutów nowotworowych oraz, w stosownych przypadkach, obecności komórek proliferujących w niekontrolowany sposób, inwazyjnych, lub tkanki pochodzenia nowotworowego. W przypadku nieliniowej deformacji komórki określane jest ryzyko wystąpienia komórek nieprawidłowo proliferujących, na podstawie średniej wartości ekspansji w kierunku naprężania komórek w próbce. Sposób realizowany jest z wykorzystaniem szczypiec optycznych.

Odsetek pacjentów ze zmianami odczynowymi wśród wszystkich diagnozowanych w kierunku choroby rozrostowej pacjentów wynosi około 30%. Proces diagnostyczny wymaga coraz bardziej skomplikowanych metod diagnostycznych, aby odpowiednio zaklasyfikować oraz szybko i skutecznie odróżnić zmiany nowotworowe od niezłośliwych zmian reaktywnych.

Pomimo dostępnych metod diagnostycznych nowotworów układu chłonnego w stanie techniki istnieje potrzeba dostarczenia prostej i wysoce specyficznej metody identyfikacji komórek patologicznych i komórek prawidłowych u pacjentów z podejrzeniem nowotworu.

Celem wynalazku jest dostarczenie skutecznej metody pozwalającej na efektywną identyfikację komórek patologicznych powstających w procesie nowotworzenia i komórek zdrowych u pacjentów z podejrzeniem choroby nowotworowej układu chłonnego.

Cel ten zrealizowano w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób diagnozowania nowotworu układu chłonnego obejmujący etapy, w których:

- a) pobiera się lub izoluje się limfocyty B od pacjenta,
- b) przygotowuje się zawiesinę limfocytów B oraz komórki zrębu szpiku kostnego do procedury pomiarowej,
- c) techniką manipulacji komórkowej komórkę limfocytu B zbliża się do komórki zrębu szpiku kostnego, w ten sposób, że komórka limfocytu B i komórka zrębu szpiku

PK/4935/AR

kostnego pozostają w bezpośrednim kontakcie, aż do utworzenia stabilnego połączenia,

- d) mierzy się czas utworzenia stabilnego połączenia (t) pomiędzy komórką limfocytu B a komórką zrębu szpiku kostnego, przy czym czas utworzenia stabilnego połączenia  $t > 60$  s wskazuje na obecność komórek nowotworowych.

Korzystnie, techniką manipulacji komórkowej w etapie c) i d) są szczypce optyczne.

Korzystnie, przed zbliżeniem limfocytu B do komórki zrębu szpiku kostnego komórkę limfocytu B chwyta się w pułapkę optyczną za pomocą szczypiec optycznych.

Korzystnie, komórka limfocytu B jest chwyтана w pułapkę optyczną o sile 100pN.

Korzystnie, połączenie uważa się za stabilne, gdy komórka limfocytu B nie pozwala się odciągnąć od komórki zrębu szpiku kostnego za pomocą pułapki optycznej generowanej laserem o mocy 200 mW.

Korzystnie, nowotworem układu chłonnego jest chłoniak nieziarniczy z komórek B (NHL).

Korzystnie, nowotworem układu chłonnego jest chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL), chłoniak grudkowym (FL), chłoniak z komórek płaszczka (MCL), chłoniak typu MALT, chłoniak Burkitta (BL) oraz chłoniak z komórek B o wysokim stopniu złośliwości (HGBL).

Korzystnie, komórkę limfocytu B zbliża się do centralnej części komórki zrębu szpiku kostnego.

Korzystnie, komórką zrębu szpiku kostnego jest fibroblast.

Korzystnie, komórki zrębu szpiku kostnego stanowi linia HS-5.

Szczypce optyczne to urządzenie generujące siły optyczne zdolne do manipulowania obiektami o rozmiarach w zakresie od 0,4  $\mu\text{m}$  do 20,0  $\mu\text{m}$  w preparacie mikroskopowym. Odpowiedni kształt wiązki laserowej o długości fali z zakresu podczerwieni lub światła widzialnego umożliwia badanie własności mechanicznych komórek, określenie sprężystości błon komórkowych, oddziaływań międzykomórkowych w kokulturach komórek zdrowych i nowotworowych, materiałów biologicznych, nici DNA. Wygenerowana przez system kształtowania wiązki laserowej pułapka optyczna, pochodząca z mocno zogniskowanej wiązki laserowej, chwyta w płaszczyźnie ogniskowej obiektywu mikroskopowego obiekty znajdujące się w preparacie. Układ pęsety optycznej pozwala na bezpośrednie lub pośrednie (poprzez specjalne dielektryczne nanokulki) pomiary przesunięć, sił oddziałujących na struktury biologiczne, czy też właściwości adhezyjnych schwypanych komórek.

PK/4935/AR

W sposobie według wynalazku możliwe jest zastosowanie innych technik manipulacji komórkowej.

Istota wynalazku polega na identyfikacji prawidłowych oraz patologicznych limfocytów B na podstawie czasu niezbędnego do utworzenia przez komórkę chłoniaka stabilnego połączenia z fibroblastami zrębu szpiku kostnego. Sposób według wynalazku umożliwi skuteczną diagnostykę nowotworu poprzez rozróżnianie komórek prawidłowych od komórek patologicznych stabilnej kokultury pomiędzy fibroblastami a limfocytami B w szczypcach optycznych. Sposób według wynalazku oparty na oddziaływaniach między limfocytami B a fibroblastami zrębu szpiku kostnego pozwala zatem na odróżnienie z wysoką skutecznością prawidłowych limfocytów B od komórek patologicznych. Zatem już na pierwszym etapie procedury diagnostycznej znacznie skraca jej czas oraz koszt.

### **Opis figur**

Fig. 1 przedstawia etapy nasuwania komórki limfocyty B na komórkę fibroblasta linii HS-5.

a) przesuwanie komórki nad podłożem, brak bezpośredniego kontaktu między komórkami b) powstanie miejsca stycznego błony komórkowej limfocyty B z powierzchnią komórki HS-5; komórka limfocytarna pozostaje dokładnie w centrum pułapki optycznej c) przesuwanie limfocyty B do centralnej części komórki HS-5.

Fig. 2 przedstawia a) patologiczny limfocyt B złapany w pułapkę optyczną b) komórkę chłoniaka zbliżoną do komórki zrębu szpiku kostnego HS-5, utrzymany kontakt komórek w pułapce optycznej.

Fig. 3 przedstawia liczbę pacjentów różniących się płcią i stanem zdrowia oraz wyniki testu niezależności.

Fig. 4 przedstawia czas utworzenia silnego połączenia komórek w grupie badanej i kontrolnej oraz wynik testu istotności U Manna Whitneya.

Fig. 5 przedstawia krzywą ROC dla czasu utworzenia stabilnego połączenia między komórkami oraz pole pod krzywą ROC ( $AUC = 0,997$ ).

Fig. 6 przedstawia histogram czasu utworzenia stabilnego połączenia między komórkami patologicznymi i prawidłowymi oraz czułość (Sens.) i swoistość (Spec.) testu dla wartość odcinająca (cut-off)  $t > 60$  s.

Fig. 7 przedstawia wymaganą minimalną liczbę wyizolowanych komórek w funkcji mocy testu.

PK/4935/AR

**Przykład**Materiał kliniczny

Celem Twórców było uzyskanie komórek w stanie jak najbardziej zbliżonym do ich kondycji w warunkach *in vivo*. W sposobie według wynalazku wykorzystano ściśle zdefiniowany materiał kliniczny jakim są prawidłowe oraz nowotworowe limfocyty B pozyskane w celach rutynowej diagnostyki onkologicznej. Materiał kliniczny stanowią komórki nowotworowe uzyskane od pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B (DLBCL), chłoniakiem grudkowym (Follicular Lymphoma, FL), chłoniakiem z komórek płaszczka (Mantle Cell Lymphoma, MCL), chłoniakiem typu MALT, chłoniakiem Burkitta (BL) oraz chłoniakiem typu High Grade B-Cell Lymphoma. Informacje dotyczące pochodzenia oraz rodzaju materiału klinicznego włączonego do badań zostały zebrane w Tabelach 1 i 2, przy czym tabela 2 przedstawia dane kliniczno-patologiczne pacjentów kontrolnych włączonych do badania. Badaniami objęto 47 osób w wieku od 21 do 89 lat (średnia  $M = 59,8$ ; odchylenie standardowe  $SD = 15,8$  lat). Podstawowe statystyki cech charakteryzujących obie grupy zamieszczono w Tabeli 3 (wiek oraz płeć pacjentów w grupie badanej i kontrolnej; wyniki testu istotności U Manna Whitneya). Opracowanie statystyczne wyników wykonano w programie Statistica 11, StatSoft Polska. Obie grupy pacjentów nie różniły się istotnie pod względem wieku (59,2 vs. 61,1 lat;  $p = 0,699$ ) ani struktury płci (udział kobiet: 50,0% vs. 66,7%;  $p = 0,449$ ).

Tabela 1

NR.	PŁEĆ	WIEK	ROZPOZNANIE	MATERIAŁ	LOKALIZACJA	IMMUNOFENOTYP
1	M	50	Extranodal DLBCL, NOS, non GCB	B	węzeł chłonny szyi po stronie prawej, naciek spojenia łonowego	FC: 42% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma: BCL2+/-/BCL6+/MYC-.
2	M	75	Extranodal DLBCL, NOS, non GCB	B	naciek spojenia łonowego	FC: 56% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma: BCL2+ higher/BCL6- /+/MYC-.
3	K	46	Extranodal DLBCL, NOS, GCB.	B	węzeł chłonny okolicy nadobojczykowej lewej	FC: 96% patologicznych limfocytów B, Triple expressor lymphoma: BCL2+ higher/BCL6+/MYC+.
4	K	61	Extranodal DLBCL, NOS, GCB	B	guz uda lewego poniżej wiązadła pachwinowego	FC: 91% patologicznych limfocytów B, Triple expressor lymphoma: BCL2+higher/ BCL6+high/MYC+.
5.	K	54	Nodal DLBCL, NOS, GCB	B	węzeł chłonny podżuchwowy po stronie prawej	FC: 41% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma: BCL2- /BCL6+high/MYC+.
6.	M	62	Nodal	B	węzeł chłonny szyi po	FC: 63% patologicznych limfocytów B, Double

PK/4935/AR

			<b>DLBCL, NOS, GCB</b>		stronie prawej	expressor lymphoma: BCL2+higher/ BCL6+/MYC-/+
7.	K	55	<b>Extranodal DLBCL, NOS, GCB</b>	B	naciekający skórę guz jamy brzusznej	FC: 24% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma: BCL2+/BCL6+/MYC-
8.	M	44	<b>Nodal DLBCL, NOS, GCB</b>	B	węzeł chłonny szyi po stronie lewej	FC: 34% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma BCL2+/BCL6+/MYC-
9.	K	54	<b>Nodal DLBCL, NOS, non-GCB</b>	B	węzeł chłonny szyi po stronie lewej, masy węzłowe w jamie brzusznej	FC: 50% patologicznych limfocytów B, Triple expressor lymphoma BCL2+/BCL6+/MYC+
10.	M	32	<b>Nodal DLBCL, NOS, between GCB and non-GCB</b>	B	węzeł chłonny szyi	FC: 23% patologicznych limfocytów B, One expressor lymphoma: BCL2-/ BCL6+/MYC-
11.	K	61	<b>Nodal DLBCL, NOS, GCB</b>	B	węzeł chłonny w okolicy mięśnia motkowo-sutkowo-obończykowego po stronie prawej	FC: 24% patologicznych limfocytów B, . Double expressor lymphoma: BCL2-/ BCL6+/MYC-/+
12.	K	74	<b>Primary cutaneous DLBCL, GCB with BL</b>	B	zmiany skórne prawego podudzia dolnej części uda z owrzodzeniami	FC: 45% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma: BCL2-/BCL6+/MYC+/-
14.	K	84	<b>HGBL, NOS between GCB and non-GCB</b>	B	guz jamy nosa po stronie prawej	FC: 44% patologicznych limfocytów B, Triple expressor lymphoma: BCL2+higher/BCL6+/MYC+
15.	M	37	<b>HGBL, GCB</b>	B	węzeł chłonny szyi typu bulki strony prawej	FC: 66% patologicznych limfocytów B, Double expressor lymphoma: BCL2+higher/ BCL6+/MYC-
16.	M	60	<b>HGBL, NOS</b>	B	guzy skórne łydki po stronie prawej	FC: 97% patologicznych limfocytów B, Triple expressor lymphoma BCL2+/BCL6+/MYC+
17.	K	70	<b>FL</b>	B	guz jamy brzusznej	FC: 86% patologicznych limfocytów B, WHO classification G2 low grade.
18.	K	79	<b>FL</b>	B	węzły chłonne jamy brzusznej	FC: 65% patologicznych limfocytów B,
19.	K	49	<b>FL</b>	B	węzeł chłonny nadobojczykowy	FC: 24% patologicznych limfocytów B, WHO classification G2 low grade.
20.	K	66	<b>FL</b>	W	węzły chłonne biodrowe	FC: 86% patologicznych limfocytów B, WHO classification G1 low grade.
21.	M	65	<b>FL</b>	W	węzeł chłonny szyi	FC: 53% patologicznych limfocytów B, WHO classification G2 low grade.
22.	M	56	<b>FL</b>	B	węzeł chłonny pachwiny lewej	FC: 42% patologicznych limfocytów B, WHO classification G2 low grade.
23.	M	32	<b>FL</b>	B	Guz jamy brzusznej typu bulki	FC: 95% patologicznych limfocytów B, Acc

PK/4935/AR

						WHO classification G1.
24.	M	70	FL	B	węzeł chłonny szyi po stronie lewej	FC: 19% patologicznych limfocytów B, WHO-brak danych
25.	K	67	FL	W	węzeł chłonny z tkanki nadobojczykowej	FC: 47% patologicznych limfocytów B
26.	K	86	MCL	B	zmiana węzłowa w jamie brzusznej	FC: 96% patologicznych limfocytów B
27.	K	69	MCL	B	węzły chłonne szyi po stronie prawej	FC: 86,2% patologicznych limfocytów B
28.	M	bd	MCL	W	błona śluzowa żołądka i dwunastnicy	FC: 95% patologicznych limfocytów B
29.	M	64	MCL	W	węzeł chłonny okolicy pachwinowej	FC: 94% patologicznych limfocytów B
30.	M	21	BL	B	guz węzłowy pachy prawej	FC: 90% patologicznych limfocytów B, BCL2-/BCL6-/ MYC+.
31.	M	54	BL	B	węzeł szyi po stronie prawej	FC: 65% patologicznych limfocytów B
32.	M	65	MALT	B	guz sutka prawego	FC: 80% patologicznych limfocytów B

F- płeć żeńska, M-płeć męska, B-materiał biopsyjny, W-materiał operacyjny

Tabela 2

NR.	PLEĆ	WIEK	ROZPOZNANIE	LOKALIZACJA
1.	F	82	Cholecystitis acuta	okolica przewodu żółciowego wspólnego
2.	F	76	Cholecystitis acuta	okolica przewodu żółciowego wspólnego
3.	F	65	Cholecystitis acuta	okolica przewodu żółciowego wspólnego
4.	F	80	Cholecystitis acuta	okolica przewodu żółciowego wspólnego
5.	M	65	Colitis chronica	węzeł chłonny krezki jelita cienkiego
6.	F	45	Pancreatitis acuta	węzeł chłonny krezki jelita cienkiego
7.	M	29	Lymphonodulitis reactiva	węzeł chłonny szyi
8.	F	51	Lymphonodulitis reactiva	węzeł okolicy trójkąta udowego lewego
9.	F	58	Lymphonodulitis reactiva	węzeł chłonny szyi
10.	M	43	Lymphonodulitis reactiva	węzeł chłonny szyi
11.	M	74	Lymphonodulitis reactiva	węzeł pachwinowy po stronie prawej
12.	K	44	Lymphonodulitis reactiva	węzeł chłonny tkanki podżuchwowej
13.	K	72	Lymphonodulitis reactiva	węzeł pachowy

PK/4935/AR

14.	M	89	Adenocarcinoma coli, GII	krezka jelita grubego
15.	F	44	Invasive carcinoma of no special type (NST)	węzeł pachowy

F- płeć żeńska, M- płeć męska

Tabela 3

Cecha (zmienna)	Wszyscy pacjenci		Grupa pacjentów				
			Badana (B)		Kontrolna (K)		B vs. K
	N = 47		N = 32		N = 15		p
Wiek (rok życia)							
<i>M</i> ± <i>SD</i>	59,8 ± 15,8		59,2 ± 15,1		61,1 ± 17,8		
<i>Me</i> [ <i>Q</i> <sub>1</sub> ; <i>Q</i> <sub>3</sub> ]	61 [49; 72]		61 [52; 70]		65 [44; 76]		0,699
<i>Min</i> - <i>Max</i>	21 - 89		21 - 86		29 - 89		
Płeć:	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Kobiety			16	50,0	10	66,7%	0,449
Mężczyźni			16	50,0	5	33,3%	

### Protokół pozyskiwania materiału klinicznego

#### Biopsje

Zawiesina komórkowa pobierana jest pod kontrolą USG do roztworu PBS pH=7.4 (Life Technologies, nr kat. 10010-023), a następnie sterylne przenoszona do próbki z EDTA (Becton Dickinson, EDTA 7.2 mg, nr kat. 368861). Po 40 minutach materiał jest głęboko mrożony w 30% płodowej surowicy bydlęcej (Life Technologies, FBS, nr kat. 10270-098) i 10% DMSO (BioShop, nr. kat. DMS555). Komórki przechowywane są w ciekłym azocie.

#### Materiał operacyjny

Po śródoperacyjnym pobraniu węzła materiał trafia do sterylnego roztworu PBS z 2% antybiotykiem i antymykotykiem (Life Technologies, nr. kat. 15240062). Limfocyty B izolowane są z węzła chłonnego do 4 godzin od pobrania. Komórki naciągane są igłą biopsyjną do strzykawki z antykoagulantem i sterylnym roztworem PBS. Po 40 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej materiał jest mrożony w 30% FBS i 10% DMSO. Komórki przechowywane są w ciekłym azocie.

### Przygotowanie próbek klinicznych do pomiarów w szczypcach optycznych

PK/4935/AR

Układ holograficzny szczypiec wykorzystany w przedmiotowym sposobie posiada następujące parametry: lasery pułapkujące: 1064 nm 4W, 980 nm 900mW; obiektyw mikroskopowy 100x NA 1.3; holograficzna generacja pułapek optycznych z wykorzystaniem modulatora LCoS Hamamatsu o rozdzielczości 800x600; sterowanie wiązką laserową z wykorzystaniem galvano-zwierciadeł; tor optyczny do analizy spektroskopowej; kamera video: CMOS max frame rate 10000 fps (frames per second).

Próbkę rozmraża się, dwukrotnie wiruje się w pożywce RPMI (1800 x g przez 7 min). Określa się liczbę i przeżywalność komórek, a następnie inkubuje się 24 h w temp 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

W przypadkach, w których odsetek patologicznych limfocytów B w badaniu immunofenotypowym (cytometria przepływowa) był mniejszy niż 90% wykonywano deplecję limfocytów T oraz komórek NK za pomocą kulek magnetycznych powleczonych przeciwciałem anti-CD3 (CD3+ Manual MACS® Cell Separation, Miltenyi Biotech). Procedurze tej każdorazowo poddaje się próbki kontrolne. Próbki pacjentów nr. 7, 11, 24 w związku z dużym odsetkiem prawidłowych limfocytów B poddano dodatkowej izolacji magnetycznej z wykorzystaniem kulek powleczonych przeciwciałami CD5+ oraz CD10+. Efektywność izolacji magnetycznej potwierdzono w cytometrii przepływowej. Bezpośrednio przed pomiarami w szczypcach optycznych komórki odwirowuje się i przyrządza się zawiesinę o gęstości  $5 \times 10^5$ /mL.

#### Hodowla komórek zrębu szpiku kostnego

W celu uzyskania optymalnych i powtarzalnych warunków eksperymentalnych opracowano protokół określający sposób zakładania hodowli komórek zrębu szpiku kostnego HS-5. Do hodowli komórek linii HS-5 (ATCC, nr. kat. ATCC® CRL-11882™) rekomenduje się pożywkę DMEM (ATCC, Dulbecco's modified Eagle's medium, nr kat. ATCC® 30-2002™). Pożywkę dodatkowo wzbogacono płodową surowicą bydlęcą (ATCC, FBS, nr. kat. ATCC® 30-2020™). Hodowlę komórek prowadzono w wilgotnej atmosferze w obecności 5% CO<sub>2</sub>.

Komórki HS-5 po osiągnięciu konfluencji 80% w butelce hodowlanej pasażowano, określono ich ilość oraz żywotność z wykorzystaniem błękitu trypanu (Invitrogen, The Countess™ automated cell counter). Następnie komórki w dobranej eksperymentalnie ilości (25 000 komórek w 200 ul pożywki DMEM) wysiewano na sterylną szalkę Petriego ze szklanym dnem (Greiner bio-one, nr. kat 627960). Po upływie 24h od założenia hodowli, do komórek

PK/4935/AR

dolewano 1 ml pożywki hodowlanej. Po upływie 72h od założenia hodowli konfluencja dojrzałych morfologicznie komórek na szalkach wynosiła około 60%. Bezpośrednio przed pomiarami w szczypcach optycznych odpłukano nieprzyklejone do podłoża komórki.

#### Procedura pomiarowa

Szalkę pomiarową z fibroblastami HS-5 umieszczono na stoliku manipulatora optycznego. Bezpośrednio na szalkę nanoszono 100  $\mu$ l zawiesiny limfocytów B. Czas opadania komórek na dno szalki wynosił około 5 minut. Następnie limfocyt B chwymano w pułapkę optyczną o sile 100 pN i zbliżano do centralnej części komórki zrębu w ten sposób, że komórki pozostawały w bezpośrednim kontakcie aż do utworzenia stabilnej kokultury (Fig. 1).

Wyznaczone eksperymentalnie przedziały czasowe pułapkowania komórki wynosiły odpowiednio: 5, 10, 15, 20, 40, 60 i 90s dla komórek prawidłowych oraz 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 420 i 480s dla komórek patologicznych.

Jako stabilna kokultura przyjęto stan, w którym limfocyt B nie pozwala się odciągnąć od komórki zrębu HS-5 za pomocą pułapki optycznej generowanej laserem o mocy 200 mW.

Szalkę z podłożem komórkowym wymieniano co 20 minut manipulacji jednocześnie niedopuszczając do spadku temperatury pożywki hodowlanej poniżej 33°C. Eksperyment powtórzono co najmniej dwukrotnie dla każdego z przypadków.

W tabelach 4 i 5 zamieszczono wyniki pomiarów czasu potrzebnego do utworzenia kokultur w szczypcach optycznych, odpowiednio dla komórek patologicznych oraz prawidłowych. Tabela 4 przedstawia czas potrzebny do utworzenia stabilnego połączenia między patologicznymi limfocytami B a komórkami zrębu HS-5 z wykorzystaniem szczypiec optycznych. Tabela 5 przedstawia czas potrzebny do utworzenia stabilnego połączenia między prawidłowymi limfocytami B a komórkami zrębu HS-5 z wykorzystaniem szczypiec optycznych.

Tabela 4

NR.	LB POMIARÓW	ŚREDNIA [s]	OS	ZAKRES [s]	NR.	LB POMIARÓW	ŚREDNIA [s]	OS	ZAKRES [s]
1	73	131,5	49,4	60-210	17	62	202,2	64,0	120-360
2	73	162,2	59,2	90-270	18	54	120,5	46,0	60-240
3	80	157,9	57,3	90-300	19	56	304,8	59,4	210-420

PK/4935/AR

<b>4</b>	76	<b>168,9</b>	55,8	90-270	<b>20</b>	65	<b>180,0</b>	50,3	90-270
<b>5</b>	54	<b>160,5</b>	48,4	90-300	<b>21</b>	72	<b>109,2</b>	32,4	60-180
<b>6</b>	60	<b>339,5</b>	65,4	210-480	<b>22</b>	55	<b>317,4</b>	86,1	120-420
<b>7</b>	59	<b>163,2</b>	44,7	90-300	<b>23</b>	53	<b>110,9</b>	28,9	60-150
<b>8</b>	53	<b>162,4</b>	43,0	120-360	<b>24</b>	57	<b>201,6</b>	69,4	120-360
<b>9</b>	52	<b>264,2</b>	52,1	120-360	<b>25</b>	68	<b>157,1</b>	60,9	60-300
<b>10</b>	65	<b>167,1</b>	49,7	90-300	<b>26</b>	62	<b>119,0</b>	44,8	60-210
<b>11</b>	52	<b>209,4</b>	54,3	120-300	<b>27</b>	51	<b>120,0</b>	32,3	60-180
<b>12</b>	64	<b>257,8</b>	68,2	120-360	<b>28</b>	50	<b>115,2</b>	41,7	60-210
<b>13</b>	47	<b>324,2</b>	59,2	210-420	<b>29</b>	58	<b>124,1</b>	33,6	60-180
<b>14</b>	58	<b>300,5</b>	61,4	180-420	<b>30</b>	72	<b>268,7</b>	62,9	180-420
<b>15</b>	54	<b>336,7</b>	85,2	180-480	<b>31</b>	58	<b>315,0</b>	73,9	180-420
<b>16</b>	67	<b>265,1</b>	94,8	120-420	<b>32</b>	42	<b>350,7</b>	53,8	270-420

Tabela 5

<b>NR.</b>	<b>LB POMIARÓW</b>	<b>ŚREDNIA [s]</b>	<b>OS</b>	<b>ZAKRES [s]</b>	<b>NR.</b>	<b>LB POMIARÓW</b>	<b>ŚREDNIA [s]</b>	<b>OS</b>	<b>ZAKRES</b>
<b>1</b>	93	<b>17,1</b>	8,9	5-30	<b>9</b>	98	<b>16,7</b>	8,3	5-40
<b>2</b>	74	<b>18,5</b>	8,1	5-40	<b>10</b>	54	<b>37,1</b>	21,4	10-90
<b>3</b>	67	<b>29,6</b>	12,1	10-60	<b>11</b>	78	<b>36,2</b>	20	15-90
<b>4</b>	48	<b>41,2</b>	24,4	10-90	<b>12</b>	68	<b>23,8</b>	11,7	5-60
<b>5</b>	55	<b>33,4</b>	13,9	10-60	<b>13</b>	51	<b>42,3</b>	11,1	30-60
<b>6</b>	57	<b>49,8</b>	17	20-90	<b>14</b>	70	<b>21,8</b>	7,2	10-40
<b>7</b>	98	<b>18,4</b>	9,9	5-60	<b>15</b>	66	<b>20,4</b>	10,3	5-40
<b>8</b>	110	<b>22,4</b>	13,1	5-60					



PK/4935/AR

<b>60</b>	12,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>90</b>	24,7	20,3	18,8	11,8	11,1	0	3,4	11,3	0	4,6	0	0	0	0	0	0	0
<b>120</b>	20,5	25,0	27,5	26,3	24,1	0	30,5	22,6	1,9	32,3	13,5	6,3	0	0	0	0	4,5
<b>150</b>	12,3	6,3	13,8	13,2	24,1	0	23,7	5,7	0	13,8	9,6	0	0	0	0	0	11,9
<b>180</b>	15,1	21,9	15,0	13,2	13,0	0	15,3	41,5	5,8	18,5	11,5	15,6	0,0	5,2	1,9	16,4	
<b>210</b>	15,1	0	7,5	13,2	18,5	5,1	18,6	11,3	19,2	18,5	26,9	9,4	6,4	1,7	5,6	9,0	
<b>240</b>	0	21,9	11,3	15,8	7,4	0	6,8	7,5	15,4	9,2	17,3	15,6	0	17,2	11,1	14,9	
<b>270</b>	0	4,7	3,8	6,6	0	15,3	0	0	13,5	0	11,5	15,6	17,0	24,1	16,7	0	
<b>300</b>	0	0	2,5	0	1,9	30,5	1,7	0	32,7	3,1	9,6	20,3	34,0	20,7	18,5	6,0	
<b>330</b>	0	0	0	0	0	1,7	0	0	5,8	0	0	0	6,4	0	0	0	
<b>360</b>	0	0	0	0	0	18,6	0	0	5,8	0	0	17,2	17,0	20,7	9,3	28,4	
<b>390</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>420</b>	0	0	0	0	0	28,8	0	0	0	0	0	0	19,1	10,3	27,8	9,0	
<b>480</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,3	0	

<b>PACJENCI</b>																	
<b>[s]</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	
<b>[%]</b>																	
<b>30</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>60</b>	0	20,4	0	0	16,7	0	13,2	0	7,4	18,0	5,9	14,0	5,2	0	0	0	0
<b>90</b>	0	11,1	0	3,1	27,8	0	26,4	0	11,8	27,9	29,4	34,0	25,9	0	0	0	0
<b>120</b>	19,4	46,3	0	24,6	34,7	5,5	37,7	22,8	23,5	21,3	31,4	26,0	34,5	0	0	0	0
<b>150</b>	11,3	1,9	0	12,3	16,7	0	22,6	8,8	8,8	8,2	23,5	16,0	19,0	0	0	0	0
<b>180</b>	19,4	9,3	0	16,9	4,2	7,3	0	22,8	30,9	21,3	9,8	0	15,5	8,3	0	0	0
<b>210</b>	11,3	11,1	1,8	21,5	0	5,5	0	8,8	5,9	3,3	0	10,0	0	13,9	10,3	0	0

PK/4935/AR

<b>240</b>	24,2	0	23,2	15,4	0	5,5	0	22,8	2,9	0	0	0	0	29,2	6,9	0
<b>270</b>	3,2	0	21,4	6,2	0	3,6	0	1,8	2,9	0	0	0	0	16,7	5,2	7,1
<b>300</b>	6,5	0	19,6	0	0	16,4	0	3,5	5,9	0	0	0	0	13,9	3,4	35,7
<b>330</b>	0	0	0	0	0	5,5	0	0	0	0	0	0	0	6,9	24,1	0
<b>360</b>	4,8	0	23,2	0	0	29,1	0	8,8	0	0	0	0	0	2,8	8,6	26,2
<b>390</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24,1	0
<b>420</b>	0	0	10,7	0	0	21,8	0	0	0	0	0	0	0	8,3	0	31,0
<b>480</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17,2	0

Tabela 8

<b>KONTROLE</b>																
<b>[s]</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	
	<b>[%]</b>															
<b>5</b>	8,6	2,7	0	0	0	0	8,2	5,5	9,2	1,9	0	8,8	0	0	10,6	
<b>10</b>	25,8	25,7	3,9	12,5	9,1	0	22,4	20,9	34,7	1,9	9,0	13,2	0	7,1	19,7	
<b>15</b>	28,0	16,2	10,4	0	0	0	19,4	9,1	5,1	0	15,4	0	0	18,6	6,1	
<b>20</b>	19,4	36,5	23,9	22,9	14,5	10,5	28,6	31,8	34,7	33,3	0	30,9	0	44,3	30,3	
<b>30</b>	12,9	14,9	35,8	14,6	38,2	33,3	18,4	19,1	14,3	27,8	33,3	35,3	27,5	25,7	24,2	
<b>40</b>	5,4	4,1	19,4	10,4	23,6	50,9	1,0	8,2	2,0	7,4	19,2	8,8	47,1	4,3	9,1	
<b>60</b>	0,	0	7,5	29,2	14,5	5,3	2,0	5,5	0	20,4	17,9	2,9	25,5	0	0	
<b>90</b>	0,	0	0	10,4	0	0	0	0	0	7,4	5,1	0	0	0	0	

Celem oszacowania wartości odcinającej (*cut-off*) dla testu rozróżniającego komórki patologiczne od prawidłowych przeprowadzono analizę krzywych ROC (Fig. 6).

Dla wartości odcinającej  $t > 60$  s czułość testu wynosi  $Sens. = 96,4\%$  a swoistość  $Spec. = 98,5\%$  (Fig. 7).

PK/4935/AR

Czas utworzenia stabilnego połączenia między komórkami patologicznymi i prawidłowymi jest istotnie różny bez względu na płeć pacjenta i jego wiek. Przy zaobserwowanych w badaniu wartościach średnich ( $M$ ) i odchyleniach standardowych ( $SD$ ) czasu stabilnego połączenia komórek, minimalna liczba wyizolowanych komórek powinna wynosić  $N = 15$ . Dla tej liczby komórek przy poziomie istotności  $p = 0,001$  moc testu wynosi  $\beta = 0,92$  (Fig. 7).

Zgłaszający: Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Pełnomocnik: 

**mgr inż. Anna Rożkiewicz**  
Rzecznik Patentowy