

## Raport științific final (2020 - 2022)

<b>Competiția:</b>	<b>Proiect experimental demonstrativ - PED 2019</b>
Nr. contract:	388PED
Cod proiect:	PN-III-P2-2.1-PED-2019-2308
Domeniul de cercetare:	1.3 - Biotehnologii
Titlul :	Dezvoltarea de soluții alternative fotocromice la testarea dublă prin hibridizare in situ - imunohistochimie pentru evaluarea neoplasmelor sânului și ale țesutului limfoid
Acronim:	DeAlPhISHIC
Data începere proiect:	01/11/2020
Data finalizare proiect:	31/10/2022
Durata (luni):	24
Buget total:	600.000,00
Sursa 1 Bugetul de stat	600.000,00
Sursa 2 Alte surse atrase (cofinanțare):	0
Pagina web proiect:	<a href="http://nwcanportal.iocn.ro/PhISHIC/">http://nwcanportal.iocn.ro/PhISHIC/</a>
Instituția coordonatoare:	INSTITUTUL ONCOLOGIC PROF.DR.I.CHIRICUTA CLUJ-NAPOCA
Director de proiect:	Bogdan FETICA, MD, PhD
Partener 1 proiect (P1):	-
Partener n proiect (Pn):	-

**1. Prezentare generală a realizării obiectivelor proiectului, cu punerea în evidență a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor. Prezentarea trebuie să includă explicații care să justifice diferențele (dacă există) dintre activitățile preconizate și cele realizate.**

Scopul acestui proiect este de a dezvolta o metodă alternativă la imunohistochimia duală - teste de hibridizare in situ aplicate în neoplazia mamară și hematopoietică, prin încorporarea utilizării coloranților fotocromici, care pot crea o amprentă negativă a testelor IHC pe lame, care, de asemenea, reprezintă modelul demonstrativ al proiectului nostru. Am avut în vedere următoarele obiective pentru atingerea scopului proiectului:

**Obiectiv 1.** Investigația tehnicii FICTION (imunofenotiparea fluorescenței și citogenetica interfazică ca instrument al investigației neoplasmelor) pentru evaluarea stării HER2 în carcinoamele invazive ale sânului prin compararea cu standardul aur actual (testarea secvențială HER2 prin imunohistochimie (IHC) și hibridizare in situ (ISH)).

Tehnica FICTION a fost publicată pentru prima dată de Weber-Matthiesen et al. cu scopul de a permite determinarea caracteristicilor morfologice, imunofenotipice și genetice ale celulelor individuale. Protocolul utilizat în acest studiu s-a bazat pe lucrarea publicată de

Maciej Giefing și Reiner Siebert. Am făcut modificări semnificative protocolului în ceea ce privește timpii de recuperare a antigenului și reactivii, ordinea pașilor IF și FISH (protocolul actual realizează primul ISH și IF) și am făcut modificări majore la procedurile de spălare post IF și FISH. Nu am putut conserva expresia IF membranoasă a proteinei HER2 urmând protocolul original. Analiza pas cu pas ne-a permis să identificăm etapa de denaturare la temperatură înaltă la 75°C ca momentul în care s-a pierdut colorarea membranoasă. Ne-am propus să investigăm în acest studiu impactul asupra numărului de copii HER2 și numărului de copii CEP 17 în testele FISH atunci când adăugăm o colorație IF la protocol. Principala noastră preocupare a fost reprezentată de faptul că, în testele standard FISH, tratamentul cu protează digeră de obicei cea mai mare parte a membranei și citoplasmei celulelor. Din acest motiv, protocoalele FICTION publicate nu folosesc tratamente cu protează. Cu toate acestea, există o nevoie evidentă pentru o etapă de permeabilizare care să permită sondelor FISH să hibridizeze cu ADN-ul celulelor. Am demonstrat păstrarea colorării membranoase pentru HER2 după etapa de permeabilizare care a folosit procedura comună pentru extragerea antigenului în IHC/IF.

Din cele mai bune cunoștințe, acesta este singurul studiu care a evaluat impactul FICTION asupra numărului de copii HER2 și CEP17 comparându-l cu procedura standard FISH.

Studiul desfășurat în cadrul proiectului a arătat o corelație foarte mare între cele două tehnici și justifică extinderea grupurilor de studiu și includerea tehnicii în studiile clinice.

**Obiectiv 2.** Dezvoltarea unui protocol alternativ la testele duale IHC-ISH care încorporează utilizarea coloranților fotocromici pentru evaluarea neoplaziei mamare și limfoide.

În urma analizei protocoalelor de lucru pentru IHC și DDISH am identificat substanțele la care coloranții fotocromici vor fi expuși în timpul protocoalelor de colorare pentru cele două tehnici. De asemenea, am detaliat și etapele în care regimurile termice la care reacțiile chimice și biologice se produc ce pot avea un impact asupra stabilității coloranților utilizați.

Datele din literatură sunt foarte limitate în ceea ce privește expunerea la aceste substanțe. Din punct de vedere al regimului termic protocoalele de lucru utilizează temperaturi care variază între temperatura ambientală (aprox. 20°C) și 100 °C.

Ne-am axat pentru acest proiect pe utilizarea clasei de coloranți fotocromi din clasa diariletanelor. Pe lângă proprietățile identificate și detaliate la A.2.4 un factor important a fost reprezentat de disponibilitatea unui număr mai mare de reactivi și stabilitatea termică la temperaturi ce depășesc 100 °C. Astfel am identificat compușii disponibili comercial pentru a dezvolta metoda de laborator propusă.

**Obiectivul 3.** Validarea protocolului coloranților fotocromici pentru evaluarea neoplaziei limfoide și mamare, prin compararea acestora cu standardul actual (testarea secvențială prin IHC și ISH în HER2), cu dublarea colorațiilor IHC automatizate și cu tehnica validată FICTION.

Am efectuat testarea carcinomului invaziv al sânului prin utilizarea protocolului de coloranți fotocromici pentru evaluarea statusului HER2 în cele 50 de cazuri de carcinom invaziv al sânului folosind FICTION. Am selectat 3 compuși cu stabilitate termică excelentă, toți 3 având puncte de topire peste 100 °C. Toți compușii au fost recepționați sub formă de pulbere și anume: 1,2-Bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentenă (purificat prin sublimare); (2,3-Bis(2,4,5-trimethyl-3-thienyl)maleimidă) (purificat prin sublimare); (1,2-Bis[2-methylbenzo[b]thiophen-3-yl]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentenă). Colorația IHC a fost realizată folosind protocolul standard și utilizând aparatul Ventana Benchmark Ultra. Am utilizat clona CAL -27 (Abcam) pentru anticorpul primar pentru a avea o mai bună suprapunere cu protocolul FICTION. am utilizat titrarea manuală a clonei și protocolul de lucru a fost oprit la pasul de contracolorare cu hematoxilină. În etapa II am adus îmbunătățiri peliculei de vopsea astfel încât nu a mai fost necesară utilizarea unui strat suplimentar de protecție. În etapa a III-a am utilizat o peliculă diferită în sensul că, pentru a obține o suprafață plană și pentru a permite o cât mai bună silanare, am utilizat o lamelă de sticlă pe care am aplicat-o în momentul etalării peliculei de vopsea fotocromică amestecată cu rășină epoxidică. Pentru etapa II am reușit să evaluăm comparativ rezultatele testării IHC din cele 2 examinări. Am găsit un nivel de concordanță de 32,5 %. Cu toate acestea trebuie să luăm în considerare faptul că majoritatea elementelor discordante au fost datorate absenței complete a marcajului imunohistochimic. Pentru a depăși acest inconvenient, în etapa a III-a am utilizat o peliculă identică pe care am suplimentat-o cu lamelă de sticlă pe care silanarea s-a putut realiza mult mai bine probabil și care a conferit o suprafață perfect plană. Rata de eșec pentru etapa a III-a a fost mult mai mică astfel analiza comparativă arătat o concordanță de aproape 92% după eliminarea cazurilor cu rezultat 0 considerat eșec al tehnicii.

Pentru evaluarea protocolului coloranților fotocromici în cazul neoplaziei limfoide am efectuat colorațiile imunohistochimice duble pe 27 de blocuri de parafină. S-a reușit compararea a 19 de cazuri. Pentru celelalte cazuri lame IHC utilizate pentru diagnostic fie nu au fost disponibile fie nu au fost necesare, fie colorația a eșuat. În continuare am realizat aplicarea protocolului de colorație fotocromică pentru neoplaziile limfoide. Acesta a cuprins următoarele etape:

1. Realizarea peliculei de vopsea fotocromică
2. Silanarea lamelor utilizate pentru protocol
3. Realizarea colorației automate pentru CD20
4. Activarea peliculei fotocromice
5. Decolorarea lamelor pentru eliminarea cromogenului utilizat pentru CD20
6. Realizarea colorației automate pentru PAX-5

În prima etapă am analizat un număr total de 17 cazuri de limfoame. În această etapă am utilizat o peliculă de tip fotocromic în care mediul de diluție a avut la bază compuși micști din lac acrilic. Din cele 17 cazuri analizate, pentru 5 dintre ele colorația dublă CD20-PAX5 nu a fost posibilă fie din cauză că pelicula de vopsea fotocronică s-a desprins, fie datorită faptului că preparatul nu s-a colorat, fie preparatul s-a detașat complet de pe lamă. Din cele 12 cazuri rămase colorația pentru PAX-5 a reușit în 10 cazuri dintre acestea după analiza comparativă cu colorațiile duble prin metoda standard pentru 7 cazuri concordanța a apreciată ca fiind peste 90 % valorile sub 90 % fiind considerate colorații reușite de focal. În a doua etapă am analizat un număr total de 13 cazuri de limfoame. În această etapă am utilizat o peliculă cu un singur strat care a avut la bază rășina epoxidică. Diluarea colorantului fotocromic a fost realizată folosind tetrahidrofuran.

Analiza comparativă a rezultatelor din cele 2 etape arată faptul că pentru cea de a 2-a etapă rata de succes a fost mai mare, stabilitatea peliculei a fost și ea mai mare, rata de rezultate negative pentru colorațiile IHC a fost inferioară în etapa a 2-a comparativ cu rata din prima etapă.

Cu toate că am obținut aceste rezultate încurajatoare, tehnica este încă la un nivel care nu permite momentan o examinare uzuală microscopică în special datorită unui contrast insuficient între fondul de vopsea activată și ariile de dimensiuni foarte mici în care vopseaua are 1 grad mai redus de activare.

Din acest motiv evaluarea comparativă procentuală a colorațiilor standard și a celor realizate pe lame cu pelicule fotocromice nu a fost posibilă. Rezultatele de față sunt încurajatoare în ceea ce privește dezvoltarea mai departe a conceptului și îmbunătățirea calității și contrastului peliculei fotocromice.

## **2. Prezentarea și argumentarea nivelului de maturitate tehnologică (TRL) la finalul proiectului.**

Proiectul folosește tehnici de bază IHC și ISH, care în diferite combinații reprezintă un punct de plecare TRL 3, conform descrierii furnizate în pachetul informativ, și evoluează către TRL 4 prin validarea într-un mediu de laborator a conceptului propus, și anume o metodă care încorporează coloranți fotocromici în protocoalele actuale IHC/ISH și funcționează ca un surogat pentru tehnica IHC în teste duale.

### **3. Gradul de atingere a rezultatelor estimate (prezentarea produsului/tehnologiei sau a serviciului rezultat al proiectului).**

Atingerea obiectivului 1 s-a tradus prin furnizarea unei metode alternative la testarea secvențială HER2 prin IHC și ISH, metoda FICTION, care permite evaluarea simultană a expresiei proteinei și a stării genelor, cu capacități superioare în identificarea zonelor de interes pe lame, care păstrează țesutul din probele de biopsie, prin reducerea nevoii de secțiuni suplimentare de țesut.

Prin dezvoltarea protocolului coloranților fotocromici (obiectivul 2) am reușit să oferim o metodă validată de laborator (obiectivul 3) care poate fi utilizată în diferite combinații cu IHC și ISH, pentru evaluări in situ concomitente.

#### **PROTOCOLUL FICTION OPTIMIZAT**

1. Din blocurile de parafina efectuați secțiuni la 4  $\mu\text{m}$  și se întind pe lame silanate
2. După secționare, lamele se incubează minim 2 ore la 56°C sau peste noapte la temperatura de 37°C pentru învechire
3. Imersați lamele în 3 băi consecutive de xilen, câte 5 minute în fiecare baie
4. Treceți apoi în două băi de alcool etilic absolut, câte un minut în fiecare baie
5. Spălarea lamelor în apa curentă.
6. Așezați un suport de oțel sau borcan Coplin ce conține soluție tampon citrat pH=6, 0.01 M în oala cu presiune.
7. Încălziți oala sub presiune până ajunge la fierbere, se pune capacul și lăsați-o să fiarbă 20 minute la temperatura de 100 gr C.
8. Răciți oala sub presiune sub apă rece de la robinet și eliberați treptat aburul.
9. Deschideți capacul.
10. Puneți suportul de lame într-un borcan Coplin cu apă distilată.
11. Uscați lamele la aer timp de 10 de minute.
12. Fixați lamele timp de 10 min în acetona.
13. Spălați lamele în 100 ml de soluție tampon PN
14. Deshidratați lamele în 70; 85%; etanol abs. fiecare timp de 2 minute la temperatura camerei.
15. Uscați lamele la aer timp de 5 minute la temperatura camerei.
16. Aplicați 10  $\mu\text{l}$  sondă pentru hibridizare (PathVysion LSI HER-2/neu SpectrumOrange/ CEP 17 SpectrumGreen Probes). Pipetați sonda pe regiunea marcată anterior cu stiloul cu diamant (evitați expunerea la lumină).
17. Acoperiți regiunea de hibridizare cu sticlă de acoperire de  $\varnothing$  10 mm). Evitați formarea bulelor de aer.
18. Acoperiți întreaga regiune de hibridizare cu cauciuc Fixogum ciment.

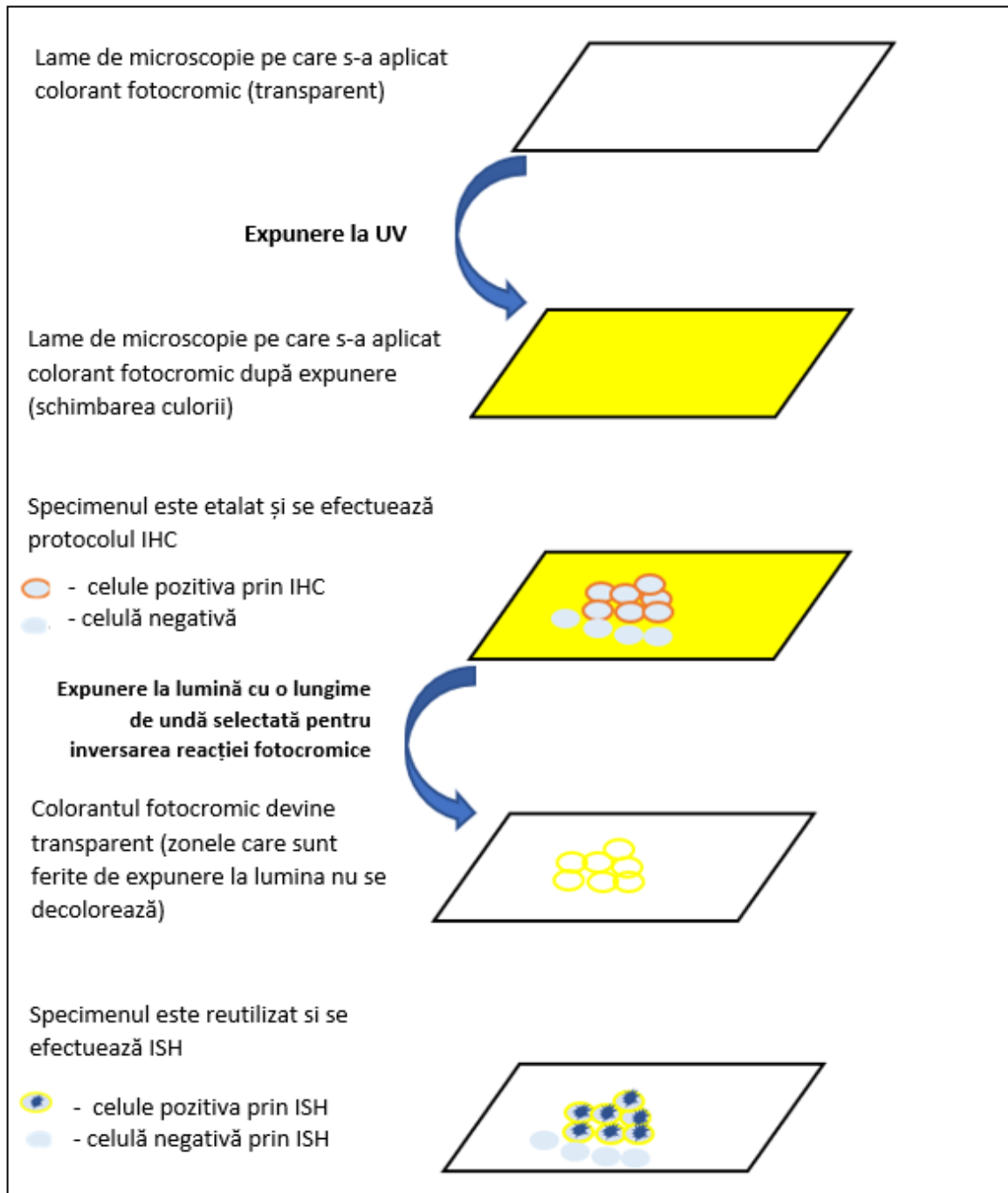
19. Transferați lamele de sticlă într-o cutie metalică de hibridizare cu capac și denaturați 7 min la 75°C într-o baie de apă.
20. Se hibridizează timp de 16 ore (peste noapte) la 37°C într-un cuptor de hibridizare.
21. Puneți un borcan Coplin cu tampon de spălare 1 într-o baie de apă la 72°C și unul la temperatura camerei.
22. Folosind o pincetă îndepărtați cu atenție cimentul de cauciuc Fixogum și lamela de sticlă, se introduc în soluția tampon de la temperatura camerei apoi se spală excesul de sonda la temperatura de 72 gr C timp de 2 minute și 15 secunde. Se transvazează lamele din nou în soluția tampon aflată la temperatura camerei.
23. Se spală lamele cu 100 ml de tampon PN.
24. Incubați lamele cu 100 μl de soluția de anticorp primar pentru colorarea imunohistochimică a secțiunii și se incubează timp de 30 de minute ferit de lumina.( Recombinant Anti-ErbB2 / HER2 antibody [clona CAL27] (ab237715), Rabbit monoclonal, diluție 1:50)
25. Se spală lamele cu 100 ml de tampon PN.
26. După ce se spală, se adaugă 100 μl de soluția de anticorp secundar și se incubează timp de 30 min(Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (ab6717), diluție 1:10); acoperiți suportul cu capacul atașat pentru a proteja de lumina.
27. Spălați lamele de sticlă într-un borcan Coplin cu 2× SSC, temperatura camerei, pentru 1–10 min în 2 bai consecutive.
28. Se usucă lamele
29. Se aplica DAPI pe secțiune la întuneric
30. Se montează lamela.

Coloranții fotocromici de tip P utilizează expunerea la lumină pentru a declanșa comutarea moleculară și au avantajul că reacția nu este în general reversibilă prin utilizarea metodelor termice. Punctul final este obținerea unui negativ al modelului de colorare IHC pe lamela de sticlă acoperită cu colorantul de tip P. Acest lucru se realizează prin inversarea reacției fotocromice după ce tehnica IHC a fost efectuată prin utilizarea unei lumini de lungime de undă specifice colorantului, care poate inversa reacția. Zonele marcate (pozitive) din IHC vor proteja colorantul de lumina utilizată pentru a inversa reacția fotocromă. În zonele ecranate reacția fotocromă inversă nu va avea loc și vom obține, pe lama de sticlă, negativul tehnicii IHC. După efectuarea protocolului de colorare fotocromică, lamela este reutilizată pentru tehnicile ISH (aceiași specimen poate fi utilizat atât pentru IHC, cât și pentru ISH).

În timpul protocolului ISH, cromogenul utilizat în timpul tehnicii IHC este îndepărtat din eșantion, dar este conservat pe lamela de sticlă ca amprență negativă. În lamele care nu au fost acoperite cu un colorant de tip P care inversează colorarea IHC are ca rezultat un specimen mai colorat sau mai transparent în funcție de momentul activării lamei. Deoarece coloranții fotocromici de tip P sunt mai puțin influențați de variațiile termice

necesare pentru realizarea protocolului ISH, amprenta va fi păstrată, iar examinatorul va putea vedea un negativ al colorării IHC pe diapozitivul final ISH.

### PROTOCOLUL DE COLORARE FOTOCROMICĂ



Pentru implementarea protocolului am dezvoltat pelicule active fotocromic capabile să reziste tuturor proceselor chimice și termice la care este supus un preparat în timpul realizării testărilor IHC și ISH.

#### **4. Impactul rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.**

Am aplicat Protocolul FICTION optimizat cu succes pe specimene recoltate de la nivelul glandei mamare, de la nivelul limfoganglionilor limfatici locoregionali ce conțin metastaze și pe secțiuni de la nivelul tegumentului infiltrat tumoral. De asemenea, am aplicat protocolul de mai sus pe secțiuni prelevate prin puncție biopsie sau pe specimene de excizie cu și fără terapie neoadjuvantă. Rezultatele obținute au fost comparabile cu tehnica standard de evaluare secvențială IHC-ISH.

Coloranții fotocromici au câștigat atenție în domeniul științelor vieții datorită unei cereri în creștere pentru comutatoare moleculare controlabile și în alte domenii industriale, cum ar fi circuitele optice (comutatoare și porți logice), tehnologia informației și nanotehnologia.

Dezvoltarea și validarea unui protocol de colorare fotocromatică are ca rezultat o metodă care creează o amprentă negativă a modelului de colorare IHC pe lamele de sticlă acoperite cu coloranți fotocromici. Din cele mai bune cunoștințe, aplicarea coloranților fotocromici pentru îmbunătățirea microscopiei cu filiere strălucitoare nu a fost niciodată încercată. Rezultatele obținute ne-au permis să obținem o testare în laborator a conceptului.

#### **5. Detalii privind exploatarea și diseminarea rezultatelor proiectului.**

Utilizarea unui singur specimen atât pentru tehnicile IHC, cât și pentru cele ISH se traduce printr-o utilizare mai bună a materialului disponibil, limitat, biopsie și într-o scădere a șanselor de a pierde zone de interes pe specimene.

Fluxul de lucru de mai sus poate funcționa, de asemenea, ca o alternativă la tehnica dublă IHC.

Obiectivul nostru principal realizat prin desfășurarea activităților din cadrul acestui proiect este implementarea tehnicii în evaluările în câmp luminos.

Protocolul optimizat pentru utilizarea tehnicii FICTION a fost diseminat într-un articol submis pentru publicare în revista cotate ISI ***Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology***.

De asemenea rezultatele preliminare validării protocolului FICTION, au fost prezentate la o conferință și publicate în abstract **Medicine and Pharmacy Reports**, revistă BDI.



6. Prezentarea livrabilelor/indicatorilor obținuți la finalul proiectului comparativ cu cei propuși.

Nr. crt.	Livrabile/indicatori planificați	Nr.	Livrabile/indicatori realizați	Nr.
1.	Protocolul FICTION optimizat	1	Protocolul FICTION optimizat	1
2.	Raport privind utilizarea tehnicii FICTION pentru evaluarea statusului Her2 în carcinoamele invazive ale sânilor	1	Raport privind utilizarea tehnicii FICTION pentru evaluarea statusului Her2 în carcinoamele invazive ale sânilor	1
3.	Raport privind coloranții candidați identificați pentru protocolul coloranților fotocromici;	1	Raport privind coloranții candidați identificați pentru protocolul coloranților fotocromici;	1
4.	Lucrare prezentată la o conferință științifică	1	"Application of FISH and FICTION for the assessment of the HER2 status in breast invasive carcinomas - a pilot study" (Aplicarea FISH și FICTION pentru evaluarea statutului HER2 în carcinoamele mamare invazive - un studiu pilot) E-poster prezentat la Conferința Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, 6-10 decembrie 2021.	1
5.	Furnizarea unei metode validate de laborator	1	Protocolul De Colorare Fotocromică	1
6.	Articol publicat într-o revistă de specialitate cotate ISI	1	"FICTION technique - a candidate for the assessment of the HER2 status in breast invasive carcinomas" în Revista <i>Applied Immunohistochemistry &amp; Molecular Morphology</i> (în evaluare)	1

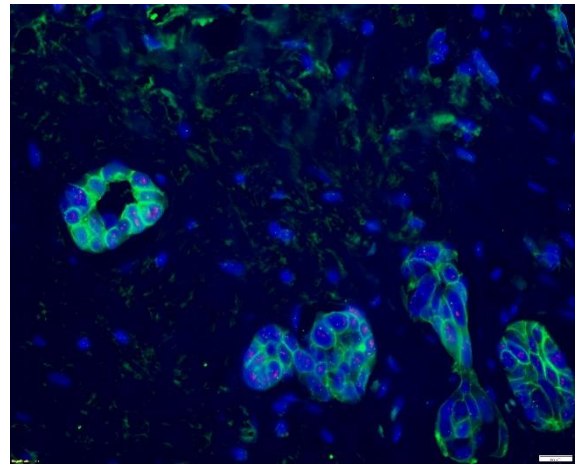
Director de proiect  
Dr. Bogdan FETICA

Data: 31.10.2022

## **Rezultatele obținute în cadrul proiectului**

*În cadrul proiectului de față ne-am axat pe combinarea unor tehnici utilizate în practica medicală de zi cu zi (imunohistochimia și hibridizarea in situ) pentru stabilirea diagnosticului, prognosticului și pentru a prezice răspunsul la tratament pentru diferite tipuri de neoplazii. Nevoia implementării acestui proiect a reieșit mai ales din experiența acumulată în practica diagnostică și din problemele pe care le-am întâmpinat în momentul aplicării acestor tehnici.*

*Am identificat în tehnica FICTION o metodă care să răspundă acestor probleme prin combinarea tehnicilor care evaluează expresia anumitor gene precum proteina membranaară Her2 (țintă terapeutică în anumite cancere ale glandei mamare) și factor de prognostic cu evaluarea statusului genei care o codifică. Am reușit să adaptăm și să validăm pe lotul de cazuri studiat un protocol FICTION pentru testarea cancerelor sânelui. Utilizarea unui astfel de protocol permite, de asemenea, economisirea materialului tisular recoltat de la pacient, un deziderat care a câștigat amploare în ultimii ani, mai ales în contextul implementării unei abordări multidisciplinare personalizate a pacientului oncologic.*



*Pornind de la această necesitate am încercat cu ajutorul coloranților fotocromici să implementăm o metodă prin care să putem să stocăm pe lama de sticlă utilizată în timpul examinării imunohistochimice a unor informații referitoare la expresia unor markeri și să reutilizăm același țesut pentru a face determinări de hibridizare in situ pentru a îmbunătăți acuratețea rezultatelor testărilor predictive și prognostice. Am reușit să dezvoltăm această tehnică unică și am reușit să obținem primele rezultate care pot să valideze conceptul propus.*

*În numele întregii echipe de cercetare,*

*Dr. Fetica Bogdan*

*Medic primar anatomopatolog,*

*Doctor în științe medicale*

