

„Microbiomul intratumoral și imunitatea locală în cancerul colorectal: medierea răspunsului la terapia specifică”

Codul subprogramului: 100101

Cancerul colorectal (CCR) este al treilea cel mai frecvent cancer și contribuie la aproximativ 10% din cazurile noi de cancer la nivel global. Pacienții cu CCR sunt adesea diagnosticați într-un stadiu avansat. În plus, eficacitatea terapiilor combinate, inclusiv chimioterapia, radioterapia și imunoterapia, prezintă provocări mari. Acumularea de dovezi sugerează un rol important al microbiomului intratumoral în medierea răspunsului la tratamentul chimeo- și/sau radioterapic prin variate mecanisme, inclusiv prin stimularea sau inhibarea imunității locale.

Studierea microbiomului intratumoral prin tehnologia de secvențiere de generație următoare (NGS) oferă posibilitatea evaluării compoziției microorganismelor din interiorul tumorii chiar dacă cantitatea lor este foarte mică. Însă, în același timp apar o serie de provocări, una din ele fiind contaminarea cu microorganisme din mediul ambiant și contaminarea încrucișată. Luând în considerare acest aspect, este primordial să se stabilească un protocol de management al calității și de monitorizare a contaminărilor pentru a putea obține rezultate valide în ceea ce privește compoziția reală a microbiomului intratumoral.

A fost realizată o scanare a tuturor etapelor studiului de la recoltarea probelor (din sala chirurgicală) până la analiza datelor metagenomice (decontaminarea bioinformatică). În baza schemei fluxului probelor biologice sa decis, în primul rând, modul de menținere a unui mediu suficient de steril ca să reducem contaminarea din mediu ambiant cât și separare fizică, prin spații sau boxe de biosiguranță, a diferitor etape de procesare a probelor. În al doilea rând, pentru monitorizarea contaminărilor, sa decis utilizarea mai multor controale negative în dependență de etapă. La etapa de recoltare se utilizează un control blank ce prevede un tub cu mediu de cultură (același ca și în tuburile pentru recoltarea țesutului) care se menține deschis în sala chirurgicală în tipul recoltării țesuturilor. Un al doilea control negativ este cel utilizat la etapa de extracție a ADN-ului metagenomic. La această etapă se recomandă lucrarea concomitentă a mai multor probe pentru a putea depista eficient contaminările. Un al treilea control negativ este utilizat la etapa de amplificare, adică la etapa de preparare a librăriilor metagenomice. Și în acest caz se recomandă lucrarea concomitentă a mai multor probe de ADN.

Controalele negative selectate și respectiv datele acestora obținute după secvențiere ne vor permite să efectuăm o decontaminare bioinformatică corectă care este decisivă pentru obținerea rezultatelor despre compoziția reală a microbiomului intratumoral.

Aceste date vor fi ulterior asociate cu semnaturile imunității locale care este evaluată prin analiza limfocitelor infiltrante tumorale (TIL). La etapa respectivă a fost optimizat protocolul de disociere tisulară, izolarea TIL din țesutul tumoral (TT) și țesutul normal histologic adiacent tumorii (NAT) și achiziționarea datelor prin citometrie în flux. După procesarea a unor probe, se observă o diferență a compoziției TIL între TT și NAT. De asemenea, se observă un raport CD4/CD8 mai mare în cazul TT.

Acțiunile întreprinse în primul an de studii va asigura buna desfășurare a procesului de cercetare și obținerea de rezultate sigure.

The intratumoral microbiome and local immunity in colorectal cancer: mediation of response to the specific therapy”

Subprogram code: 100101

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and contributes to about 10% of new cancer cases globally. Patients with CRC are often diagnosed at an advanced stage. In addition, the effectiveness of combination therapies, including chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy, presents great challenges. Accumulating evidence suggests an important role of the intratumoral microbiome in mediating the response to chemo- and/or radiotherapy treatment through various mechanisms, including by stimulating or inhibiting local immunity.

The study of the intratumoral microbiome by next-generation sequencing (NGS) technology offers the possibility to assess the composition of microorganisms inside the tumor even if their amount is very small. However, at the same time a number of challenges arise, one of them being contamination with environmental microorganisms and cross-contamination. With this in mind, it is of main importance to establish a quality management and contamination monitoring protocol in order to be able to obtain valid results regarding the true composition of the intratumoral microbiome.

Was performed a scan of all stages of the study from sample collection (from the surgical room) to metagenomic data analysis (bioinformatics decontamination). Based on the biological sample flow scheme, it was firstly decided how to maintain a sufficiently sterile environment to reduce environmental contamination, as well as the physical separation, by biosafety chambers or boxes, of the different sample processing steps. Secondly, for contamination monitoring, it was decided to use several negative controls depending on the stage. At the collection stage, a blank control is used which provides a tube with culture medium (the same as in the tissue collection tubes) that is kept open in the surgical room during tissue collection. A second negative control is the one used at the metagenomic DNA extraction stage. At this stage, it is recommended that several samples are processed at the same time in order to detect efficiently contaminations. A third negative control is used at the amplification stage, i.e. at the metagenomic library preparation stage. In this case too, it is recommended to work on several DNA samples at the same time.

The selected negative controls and their respective data obtained after sequencing will allow us to perform a correct bioinformatic decontamination which is decisive for obtaining results about the real composition of the intratumoral microbiome.

These data will be subsequently associated with local immune signatures which is assessed by tumor infiltrating lymphocyte (TIL) analysis. At this stage, was optimized the tissue dissociation protocol, TILs extraction from tumor tissue (TT) and histologically normal tissue adjacent to tumor (NAT) and acquiring data by flow cytometry. After processing some samples, observed a difference in TIL composition between TT and NAT. A higher CD4/CD8 ratio is also observed in TT.

The actions undertaken in the first year of studies will ensure the successful development of the research process and reliable results.