



## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Κ. Δάγλα

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης σε συγκεντρώσεις ένα καρκινικό κύτταρο ανά  $10^6$ - $10^7$  λευκοκύτταρα. Η σημασία της ανίχνευσής τους έχει μελετηθεί από αρκετές ομάδες και έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη σε σχέση με το ελεύθερο νόσο διάστημα και την ολική επιβίωση. Επίσης, αποτελούν δείκτες της ανταπόκρισης στη θεραπεία, ενώ ενδεχομένως να αποτελούν και νέο θεραπευτικό στόχο. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκαν στο αίμα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από τον Αυστραλό παθολόγο Tomas Ashworth, το 1869. Από τότε, έχουν περάσει εκατόν σαράντα χρόνια επιτυχούς αντικαρκινικής έρευνας. Οι τεχνικές ανίχνευσης των CTCs μπορούν να διαχωριστούν γενικά σε τεχνικές που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων και σε κυτταρομετρικές που εξετάζουν ολόκληρο το κύτταρο. Το γεγονός ότι τα CTCs αποτελούν σπάνια συμβάντα καθιστά απαραίτητο ένα στάδιο διαχωρισμού από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, το οποίο προηγείται της ανίχνευσης. Ο διαχωρισμός των κυττάρων μπορεί να γίνει βάσει των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους (μέγεθος κυττάρου και πυκνότητα) ή με χρήση δεικτών ειδικών για τον όγκο (ανοσοαπομόνωση). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η βαθμίδωση πυκνότητας και οι τεχνικές που στηρίζονται στη χρήση φίλτρων. Στη δεύτερη κατηγορία τεχνικών γίνεται απομόνωση των κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια. Η επιλογή των κυττάρων μπορεί να είναι αρνητική (μείωση των λευκοκυττάρων) οπότε χρησιμοποιείται το CD45 ή θετική με τη χρήση αντισωμάτων για κάποιο αντιγόνο κοινό για τα κύτταρα όλων των όγκων (EpCAM) ή ειδικό για ένα συγκεκριμένο είδος όγκου (π.χ. HER-2 στον καρκίνο του μαστού). Στις τεχνικές ανίχνευσης των CTCs που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων κυριαρχεί η RT-PCR, ενώ στις κυτταρομετρικές τεχνικές ανήκουν η ανοσοϊστοχημεία, η κυτταρομετρία σάρωσης με laser, το σύστημα CellSearch και η κυτταρομετρία ροής.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες για την ανίχνευση των CTCs με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής κυρίως από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Η ομάδα στην οποία συμμετέχει ο Terstappen έχει δημοσιεύσει ένα άρθρο (1998) στο οποίο ανιχνεύονται CTCs σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και προστάτη και δύο άρθρα (2001, 2004) που αφορούν μόνο ασθενείς με καρκίνο προστάτη. Οι Allan και συνεργάτες έχουν δημοσιεύσει δύο μελέτες (2005, 2009) στις οποίες ανιχνεύονται CTCs από ανθρώπινο καρκίνο μαστού σε μοντέλα ποντικών.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το 1998 η ομάδα του Terstappen δημοσίευσε μελέτη με θέμα την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, αναφέροντας ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι πιο ευαίσθητη από την PCR και στις πιλοτικές μελέτες με κυτταρικές σειρές το όριο ανίχνευσης είναι λιγότερο από 1 επιθηλιακό κύτταρο όταν ο αρχικός όγκος περιφερικού αίματος είναι 1 mL και η ανάκτηση των κυττάρων είναι 70-100%. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος 30 ασθενών με καρκίνο μαστού, 3 με καρκίνο προστάτη και σε 13 υγιή άτομα. Έγινε λήψη 10-20 mL περιφερικού αίματος σε σωληνάρια αιμοληψίας τα οποία περιείχαν EDTA σαν αντιπηκτικό και η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε μέσα σε 24 ώρες. Για την εκτίμηση της ευαισθησίας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού BT474 και SKBr3, ενώ για τον καρκίνο του προστάτη η καρκινική κυτταρική σειρά LNCaP. Έγινε εμπλουτισμός του δείγματος με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια (ferrofluids) επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιθηλιακού μορίου προσκόλλησης EpCAM. Στη συνέχεια έγινε ειδική κατεργασία των κυττάρων (permeabilization) ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης τους και ακολούθησε χρώση με αντίσωμα έναντι της κυτταροκερατίνης συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (anti-CK-PE), με το CD45-PerCP καθώς και με χρωστική ειδική για τα νουκλεϊκά οξέα. Τα δείγματα αναλύθηκαν στους κυτταρομετρητές FACScan και FACSCalibur (Becton Dickinson). Τα κριτήρια για την αναγνώριση ενός κυττάρου ως καρκινικό ήταν το μέγεθος (FS), η κοκκίωση (SS), η θετική χρώση με anti-CK-PE και η αρνητική χρώση με CD45-PerCP.

Έγινε εμβολιασμός κυττάρων SKBr3 (50-4500 κύτταρα) σε 5 mL περιφερικού αίματος υγιών αιμοδοτών και τα καρκινικά κύτταρα ήταν διακριτά από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, ενώ η ανάκτησή τους ήταν 75-100%. Όταν εμβολιάστηκε μικρός αριθμός κυττάρων, π.χ.  $\leq 20$  κύτταρα/2,5 mL η ανάκτηση ήταν 95-100%, υποδεικνύοντας ότι ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι η ποσότητα του περιφερικού αίματος που χρησιμοποιείται. Στη συνέχεια εξετάστηκε το αίμα των ασθενών με καρκίνο μαστού και των υγιών αιμοδοτών για την ύπαρξη επιθηλιακών κυττάρων. Ο αριθμός των κυττάρων που ανιχνεύθηκαν ήταν για τους υγιείς αιμοδοτές 0-5 επιθηλιακά κύτταρα,  $15,9 \pm 17,4$  κύτταρα στο αίμα των ασθενών με εντοπισμένο καρκίνο μαστού, σε εκείνους όπου εμπλέκονταν και οι λεμφαδένες  $47,4 \pm 52,3$  και σε εκείνους με απομακρυσμένη μετάσταση  $122 \pm 140$  κύτταρα.

Η διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού ήταν στατιστικά σημαντική ( $P < 0,001$ ). Η διαφορά ανάμεσα στη ομάδα με εντοπισμένο και σε εκείνη με μεταστατικό καρκίνο ήταν 0,009 (t-test). Ο αριθμός των επιθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο μαστού ήταν πάνω από την τιμή cut-off σε 12 από τους 14

ασθενείς. Επιπλέον, κανείς από τους υγιείς αιμοδότες δεν είχε πάνω από 5 επιθηλιακά κύτταρα στο περιφερικό αίμα. Επίσης, η διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των υγιών αιμοδοτών και εκείνη των ασθενών με καρκίνο του προστάτη ήταν στατιστικά σημαντική ( $t \text{ test} < 0,01$ ).

Σε επόμενη μελέτη (2001) της ίδιας ομάδας έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των CTCs με χρήση κυτταρομετρίας ροής σε ασθενείς με καρκίνο προστάτη. Μελετήθηκαν δέκα ασθενείς με μεταστατικό και δέκα με εντοπισμένο καρκίνο προστάτη καθώς και 22 υγιείς άντρες. Ακόμα έγινε εμβολιασμός κυττάρων από την καρκινική σειρά PC3 σε συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400 και 800 καρκινικών κυττάρων/7 mL αίματος υγιών αιμοδοτών. Για τον εμπλουτισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικά νανοσφαιρίδια συνδεδεμένα με το αντίσωμα ErCAM με τα οποία απομονώθηκαν τα επιθηλιακά κύτταρα από 7mL περιφερικό αίμα. Στη συνέχεια έγινε αύξηση διαπερατότητας των κυττάρων του δείγματος και χρώση με anti-CK-PE, CD45-PerCP και με χρωστική ειδική για τα νουκλεϊκά οξέα. Τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρική FACSCalibur χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CellQuest.

Στους 22 υγιείς άντρες ανιχνεύθηκαν 0-4 επιθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αν ανιχνευθούν >5 κύτταρα/7 mL περιφερικού αίματος μπορούν να θεωρηθούν καρκινικά με 99% εμπιστοσύνη. Στους έξι από τους δέκα ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη ανιχνεύθηκαν >5 επιθηλιακά κύτταρα/7 mL. Η μέση ανάκτηση των εμβολιασμένων PC3 κυττάρων ήταν  $73,7 \pm 8,9\%$ , επίσης υπήρχε ισχυρή γραμμική συσχέτιση ( $R^2 = 0,99$ ). Τέλος, το όριο ανίχνευσης καθορίστηκε περίπου στο 1 κύτταρο σε 7,5 mL περιφερικού αίματος.

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη τους (2004) αναλύθηκαν δείγματα 7,5 mL περιφερικού αίματος από δέκα ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο προστάτη καθώς και από δέκα υγιείς αιμοδότες (άντρες). Η αιμοληψία έγινε στα σωληνάρια CellSave τα οποία έχουν όγκο 10 mL, περιέχουν EDTA και ένα συντηρητικό κυττάρων. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε μέσα σε 72 ώρες από την αιμοληψία. Επίσης εμβολιάστηκαν κύτταρα από την καρκινική κυτταρική σειρά LNCap σε 7,5 mL περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών. Τα δείγματα επώαστηκαν για 24 ώρες και μετά ακολούθησε η ίδια επεξεργασία που έγινε και στα δείγματα των ασθενών. Για τον εμπλουτισμό των επιθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικά νανοσωματίδια συνδεδεμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το ErCAM. Για την αναγνώριση των επιθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της κυτταροκερατίνης επισημασμένα με φυκοερυθρίνη (PE). Το πρώτο αναγνώριζε τις κερατίνες 8 και 18, ενώ το δεύτερο την κερατίνη 19. Το μονοκλωνικό αντίσωμα CD45-APC χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστούν τα επιθηλιακά κύτταρα από τα λευκοκύτταρα. Η χρωστική 4,6-διαμιδινό-2-φαινυλινδόλη (DAPI), ειδική για το δίκλωνο DNA, χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση και τον χαρακτηρισμό του πυρήνα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα M30-FITC. Τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρική LSR ο οποίος είναι εξοπλισμένος με ένα laser αργού-ιόντων στα 488nm, ένα laser ηλίου-νέου στα 633 nm και ένα laser ηλίου-καδμίου στα 325 nm. Η μέτρηση σταμάτησε αφού είχε συλλεχθεί όλο το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου. Τα κριτήρια της ανάλυσης ήταν θετική χρώση για την κυτταροκερατίνη, αρνητική χρώση για το CD45 και ποικίλη χρώση για το DAPI και το αντίσωμα M30.

Στους δέκα υγιείς άντρες ανιχνεύθηκαν μέχρι δύο άθικτα επιθηλιακά κύτταρα και λίγα συμβάντα (events), τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως σπασμένα CTCs. Στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο προστάτη ανιχνεύθηκαν 36-658 CTCs από τα οποία βάσει της χρώσης με DAPI και M30 9-243 θεωρήθηκαν άθικτα, 9-165 κατεστραμμένα και 11-299 θραύσματα CTCs. Τα δείγματα αναλύθηκαν και με μικροσκοπιο φθορισμού. Ο συντελεστής συσχέτισης των δύο μεθόδων ήταν  $R^2 = 0,71$ , υποδεικνύοντας ότι ενώ αναλύθηκαν τα ίδια δείγματα, δεν ανιχνεύθηκε ο ίδιος αριθμός CTCs. Για την ανίχνευση άθικτων CTCs ο συντελεστής συσχέτισης αυξήθηκε στο  $R^2 = 0,95$ . Ο αριθμός των άθικτων CTCs που ανιχνεύθηκαν με την κυτταρομετρία ροής ήταν σημαντικά μεγαλύτερος ( $P = 0,0247$ ), αλλά αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι συμπεριλήφθηκαν και τα CTCs που εκφράζουν το M30.

Οι Allan et al. το 2005 δημοσίευσαν ένα άρθρο στο οποίο περιγράφεται η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των CTCs ανθρώπινου καρκίνου μαστού σε μοντέλα ποντικών χρησιμοποιώντας ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό και πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής. Η μελέτη αφορούσε μεταστατικό καρκίνο μαστού και η ευαισθησία της τεχνικής ήταν 0,01% ή  $10^{-4}$ , ενώ μπορούσε να αυξηθεί στο  $10^{-5}$  αν χρησιμοποιούνταν ανοσομαγνητική μέθοδος για τον αποκλεισμό των CD45 θετικών λευκοκυττάρων των ποντικών πριν την κυτταρομετρική ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDA-MB-231, MCF-7 και 21NT. Έγινε λήψη ολικού αίματος σε ηπαρίνη και EDTA από θηλυκά ποντίκια. Σε κάθε ποντίκι ηλικίας 9 έως 10 εβδομάδων ενέθηκαν  $1 \times 10^6$  κύτταρα από την καρκινική σειρά MDA-MB-468 και οι όγκοι που αναπτύχθηκαν στο σημείο της ένεσης αφέθηκαν να μεγαλώσουν για 8 έως 12 εβδομάδες. Κατά την ώρα θανάτου των ποντικών μετρήθηκε το μέγεθος του όγκου και έγινε λήψη ολικού αίματος.

Χρησιμοποιήθηκαν αντίσωμα ποντικού έναντι του ανθρώπινου HLA συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη και αντίσωμα έναντι του πανλευκοκυττάρικου CD45 των ποντικών συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη. Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων έγινε με χλωριούχο αμμώνιο. Το EasySep PE Selection Kit (StemCell Technologies, Canada) χρησιμοποιήθηκε για τον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό και η κατεργασία των κυττάρων (fixation/permeabilization) έγινε με το IntraPrep Fix/Perm Kit (Beckman Coulter). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και Propidium Iodide (PI) για τη χρώση των πυρήνων.



Έγιναν πειράματα εμβολιασμού καρκινικών κυττάρων σε συγκεντρώσεις 0, 0,1, 1 και 10% σε αίμα ποντικών για να καθορισθεί αν ο ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός αυξάνει την ευαισθησία της ανίχνευσης. Στο ολικό αίμα (500  $\mu$ L) των ποντικών, που είχαν αναπτύξει όγκους έγινε λύση των ερυθρών με χλωριούχο αμμώνιο, χρώση με τα μονοκλωνικά που αναφέρονται παραπάνω και ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός με το EasySer PE Selection kit. Επίσης, 100  $\mu$ L ολικού αίματος ποντικών τα οποία είχαν αναπτύξει όγκο ή αίματος εμβολιασμένου με καρκινικά κύτταρα βάφτηκαν με τα ίδια μονοκλωνικά μετά από λύση με χλωριούχο αμμώνιο και κατεργασία με το IntraPrep kit. Τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή XL-MCL (Bectan Coulter). Το σήμα του HLA-FITC ανιχνεύθηκε στο κανάλι FL1, του CD45-PE στο FL2 και του PI στο FL3.

Το αντίσωμα HLA-FITC βρέθηκε εξαιρετικά ειδικό για τα ανθρώπινα κύτταρα, με λίγη ή καθόλου μη ειδική δέσμευση με τα λευκοκύτταρα του ποντικίου. Παρομοίως, το αντίσωμα έναντι του CD45 των ποντικών ήταν πολύ ειδικό για τα λευκοκύτταρα των ποντικών και δεν έβαψε τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Οι ιδιότητες του πλάγιου φθορισμού και του φθορισμού του PI παρέχουν μικρή αλληλοεπικάλυψη ανάμεσα στα μικρότερα λευκοκύτταρα των ποντικών και τα μεγαλύτερα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Τα λευκοκύτταρα των ποντικών έχουν διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων ίσο με 40, ενώ αντίστοιχα στους ανθρώπους είναι 46. Τα κύτταρα της καρκινικής κυτταρικής σειράς MDA-MB-468 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουν υπερπλοειδία ή ανευπλοειδία, όπως συμβαίνει και με πολλούς όγκους, παρέχοντας μεγαλύτερο διαχωρισμό από τα λευκοκύτταρα των ποντικών.

Για να καθορισθεί η αν η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ελέγχθηκε η ικανότητα να ανιχνευτούν κύτταρα από τις σειρές MDA-MB-435, MDA-MB-231, 21NT και MCF-7. Σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα είχαν παρόμοιες χρώσεις με εκείνα της σειράς MDA-MB-468 και μπορούσαν να διαχωριστούν εύκολα από τα λευκοκύτταρα των ποντικών. Παρατηρήθηκε μια ποικιλία στη χρώση με το HLA-FITC με τα MCF-7 να παρουσιάζουν την ασθενέστερη χρώση. Η ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων έδειξε ότι το κατώτερο όριο ανίχνευσης ήταν 0,01% ή  $10^{-4}$  που αντιστοιχεί σε ένα ανθρώπινο καρκινικό κύτταρο ανά 10.000 λευκοκύτταρα ποντικίου. Κάτω από αυτό το επίπεδο το σήμα του υποβάθρου υπερκάλυπτε το σήμα των καρκινικών κυττάρων. Η γραμμικότητα και η ανάκτηση των κυττάρων ήταν επαναλήψιμες και ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων που ανακτούνταν μπορούσε να συσχετιστεί σαφώς με τον αναμενόμενο αριθμό κυττάρων βάση των διαδοχικών αραιώσεων ( $R^2=0,96$ ).

Η ανάλυση των καρκινικών κυττάρων μετά από εμπλουτισμό έδειξε ότι η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί κατά ένα log σε σχέση με τη μέθοδο χωρίς εμπλουτισμό, επιτρέποντας κατώτερο όριο ανίχνευσης  $10^{-5}$  ή ένα καρκινικό κύτταρο παρουσία 100.000 λευκοκυττάρων ποντικίου. Ο ανοσομαγνητικός εμπλουτισμός αποδείχτηκε πιο αποτελεσματικός σε μικρές συγκεντρώσεις καρκινικών κυττάρων. Τέλος, η ανάλυση των δειγμάτων των ποντικών που είχαν αναπτύξει όγκους έδειξε ότι όταν ο αρχικός όγκος ήταν μέχρι 1  $\text{cm}^3$  ανιχνεύονταν πολύ λίγα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, στα ποντίκια που είχαν όγκους από 1,5  $\text{cm}^3$  και πάνω κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα μπορούσαν να ανιχνευθούν σε εύρος 0,02-2% μετά από ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό. Τα δείγματα αναλύθηκαν και με μικροσκόπιο φθορισμού και η απουσία ή παρουσία καρκινικών κυττάρων ήταν συνεπής με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής.

Το 2009 η ίδια ομάδα δημοσίευσε μια παρόμοια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής και κυτταρομετρία σάρωσης με laser. Χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB-435HAL, η οποία είναι μια παραλλαγή της MDA-MB-435 που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Έγινε συλλογή 300 mL ολικού αίματος, έξι λεμφαδένων και μυελού των οστών από κάθε ποντίκι και εμβολιάστηκαν κύτταρα από την καρκινική κυτταρική σειρά στο αίμα, το ομογενοποίημα των λεμφαδένων και το μυελό των οστών σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,001-10%). Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε μέσα σε δύο ώρες από τη συλλογή τους.

Έγινε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με χλωριούχο αμμώνιο, πλύσιμο με PBS χρώση με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου HLA επισημασμένο με φλουορεσκεΐνη και με αντίσωμα έναντι του CD45 των ποντικών συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη. Τα δείγματα εμπλουτίστηκαν ανοσομαγνητικά με το EasyPrep PE Selection kit και στο μέρος που περιείχε τα καρκινικά κύτταρα έγινε κατεργασία με το IntraPrep Fix/Perm kit και χρώση των πυρήνων με PI. Τα δείγματα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή MCL-XL και συλλέχθηκαν τουλάχιστον 100.000 PI<sup>+</sup> γεγονότα. Τα κύτταρα που ήταν HLA<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> θεωρήθηκαν καρκινικά κύτταρα.

Για την ανάλυση της μετάστασης σε μοντέλα ποντικών έγινε ένεση της κυτταρικής σειράς MDA-MB-435HAL σε ποντίκια και σε διάφορους χρόνους μετά την ένεση θυσιάστηκαν πέντε ποντίκια τη φορά από τα οποία συλλέχθηκε αίμα, λεμφαδένες και μυελός των οστών. Στα δείγματα εφαρμόστηκε η παραπάνω διαδικασία εμπλουτισμού και χρώσης και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Ανιχνεύθηκαν περίπου 0,01% καρκινικά κύτταρα MDA-MB-435HAL σε αίμα, ομογενοποίημα λεμφαδένων και μυελό των οστών των ποντικών. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι ο αριθμός των CTCs αυξήθηκε με τον χρόνο και ότι τα καρκινικά κύτταρα διασπείρονται στιγμιαία στο μυελό των οστών. Ο αριθμός των κυττάρων που ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με εκείνον που προέκυψε από την ανάλυση με κυτταρομετρία σάρωσης με laser.