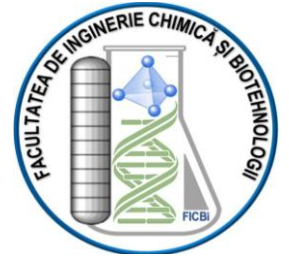




UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI  
Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii



# Studiul fizico-chimic al probelor de țesut și impactul variabilelor pre- analitice în Anatomia Patologică

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

*Conducător științific:*

**Prof. Dr. Ing. Raluca STAN**

*Doctorand:*

**Daniela GOLOGAN  
(MARINESCU)**

**București**

**2024**

## Cuprins

MULȚUMIRI.....	1
LISTĂ ABREVIERI .....	6
INTRODUCERE .....	8
OBIECTIVELE LUCRĂRII .....	12
PARTEA ÎNTÂI - STUDIUL DE LITERATURĂ .....	13
CAPITOLUL 1. VARIABILELE PRE-ANALITICE ÎN ANATOMIA PATOLOGICĂ .....	13
1.1. Etapele protocoalelor histologice și condițiile de realizare .....	16
1.1.1. Fixare .....	18
1.1.2. Deshidratare .....	22
1.1.3. Clarificare .....	25
1.1.4. Infiltrare și includere .....	28
1.2. Metode de procesare histologică .....	30
1.3. Artefacte ale preparatelor histologice .....	35
CAPITOLUL 2. BUREȚII HISTOLOGICI .....	38
CAPITOLUL 3. INFLUENȚA VARIABILELOR PRE-ANALITICE ÎN RETENȚIA SECȚIUNILOR PE LAMA DE MICROSCOP ÎN TIMPUL COLORAȚIILOR IMUNOHISTOCHIMICE .....	41
CAPITOLUL 4. TISSUE MICROARRAY (MATRICE DE ȚESUT).....	45
PARTEA A DOUA - STUDIUL EXPERIMENTAL .....	50
CAPITOLUL 5. DETERMINAREA CANTITĂȚII DE APĂ REZIDUALĂ DIN SOLUȚIILE DE PROCESARE ȘI DIN PROBELE DE ȚESUT PROCESATE .....	50
5.1. Materiale și metode .....	52
5.1.1. Probele de țesut .....	52
5.1.2. Solvenți .....	53
5.1.3. Protocoale de procesare a țesuturilor recoltate .....	54
5.1.4. Pregătirea probelor pentru determinarea cantității de apă din soluțiile de procesare și din probele de țesut .....	56
5.1.5. Determinarea cantității de apă din soluțiile de procesare .....	57
5.1.6. Determinarea cantității de apă fluctuantă în probele de țesut parafinat .....	58
5.1.7. Determinarea cantității de apă în probele de țesut prin termogravimetrie .....	59
5.1.8. Analiza statistică a apei extrase din țesut în diferite etape de procesare .....	59
5.1.9. Obținerea de matrici de țesut (tissue microarrays) din probele parafinate .....	60
5.1.10. Colorații topografice cu hematoxilină – eozină .....	62
5.1.11. Colorare imunohistochimică .....	64
5.2. Rezultate .....	65
5.2.1 Determinarea cantității de apă din soluțiile de procesare .....	65
5.2.2 Determinarea cantității de apă fluctuantă în probele de țesut parafinat .....	67
5.2.3. Determinarea prin termogravimetrie a cantității de apă în probele de țesut .....	68
5.2.4 Analiza statistică a extracției apei din țesut în diferite etape de procesare .....	70

5.2.5	Colorații topografice hematoxilină – eozină .....	74
5.2.6	Colorații imunohistochimice .....	75
5.3.	Concluzii .....	77
<b>CAPITOLUL 6. INFLUENȚA BUREȚILOR HISTOLOGICI ÎN PROCESAREA PROBELOR DE ȚESUT .....</b>		<b>80</b>
6.1.	Materiale și Metode .....	83
6.1.1.	Probele de țesut .....	83
6.1.2.	Matrice sectionabilă - BxChip™ .....	84
6.1.3.	Bureții histologici .....	84
6.1.4.	Protocol de procesare .....	86
6.1.5.	Determinarea capacității de absorbție și contaminarea reziduală a bureților histologici folosiți .....	86
6.1.6.	Determinarea gradului de strângere a matricilor secționabile (BxChip™) prin măsurarea acestora .....	87
6.1.7.	Determinarea concentrației de alcool în soluțiile de procesare prin cântărire .....	87
6.1.8.	Determinarea concentrației de alcool din tancurile de procesare prin titrarea volumetrică Karl Fischer .....	87
6.1.9.	Colorații topografice hematoxilină – eozină .....	88
6.1.10.	Colorare imunohistochimică .....	88
6.2.	Rezultate .....	89
6.2.1.	Capacitatea de absorbție și contaminare reziduală (“carry-over”) a bureților histologi.....	89
6.2.2.	Procentajul de strângere a matricilor secționabile după protocolul de procesare .....	90
6.2.3.	Titrare alcool etilic .....	93
6.2.4.	Determinarea concentrației de alcool în soluțiile de procesare prin cântărire .....	95
6.2.5.	Determinarea concentrației de alcool în soluțiile de procesare prin analiza volumetrică Karl Fischer .....	99
6.2.6	Colorații topografice hematoxilină–eozină .....	100
6.2.7	Colorații imunohistochimice .....	103
6.3.	Concluzii .....	106
<b>CAPITOLUL 7. INFLUENȚA VARIABILELOR PRE-ANALITICE ÎN RETENȚIA SECȚIUNILOR PE LAMA DE MICROSCOP ÎN TIMPUL COLORAȚIILOR IMUNOHISTOCHIMICE .....</b>		<b>107</b>
7.1.	Materiale și metode .....	108
7.1.1.	Probele de țesut .....	108
7.1.2.	Protocolul de procesare .....	108
7.1.3.	Soluții .....	109
7.1.4.	Tissue Microarrays .....	109
7.1.5.	Colorare imunohistochimică .....	112
7.1.6.	Colorare topografică cu hematoxilină – eozină .....	113
7.2.	Rezultate .....	113
7.3.	Concluzii .....	123

CAPITOLUL 8. ANALIZA DE COST ÎN LABORATORUL DE HISTOLOGIE: TMA VS METODA CLASICĂ .....	125
8.1. Materiale și metode .....	126
8.1.1. Obținerea matricei de țesut .....	126
8.1.2. Analiza de cost .....	127
8.2. Rezultate .....	127
8.3. Concluzii .....	137
PARTEA A TREIA – APLICAȚII .....	138
CAPITOLUL 9. IMPLEMENTAREA PROTOCOLULUI DE PROCESARE CU n-BUTANOL ÎN TESTE PRECLINICE CE NECESITĂ EXAMEN MORFOPATOLOGIC .....	138
9.1. Materiale și metode .....	140
9.1.1. Animale .....	140
9.1.2. Substanțe .....	141
9.1.3. Protocol experimental .....	142
9.2. Rezultate .....	146
9.3. Concluzii .....	151
CONCLUZII GENERALE .....	154
CONTRIBUȚII ORIGINALE .....	158
BIBLIOGRAFIE .....	159
DISEMINAREA REZULTATELOR .....	168

**Cuvinte cheie:** variabile pre-analitice în patologie, protocol de procesare, deshidratare, fixare, clarificare, apă reziduală, artefacte tisulare, bureți histologici, detașare secțiuni, matrici de țesut, analiză de cost

**Notă:** Notățiile capitolelor, subcapitolelor și respectiv ale figurilor, tabelor și graficelor din acest document sunt aceleași cu cele existente în teza de doctorat.

## INTRODUCERE

Monitorizarea calității în unitatea de histopatologie este clasificată în trei faze, pre-analitică, analitică și post-analitică, pentru a acoperi diferite etape în întregul ciclu de testare. Revizuirea literaturii privind studiile de evaluare a calității referitoare la histopatologie a evidențiat faptul că rapoartele anterioare s-au concentrat în principal asupra aspectelor analitice, cu studii limitate privind evaluarea fazei pre-analitice. Faza pre-analitică cuprinde mai multe etape de procesare și manipulare a probelor, permițând astfel o cantitate suficientă de erori. Datorită naturii sale critice și a studiilor limitate în trecut pentru a evalua calitatea în faza pre-analitică, merită o atenție sporită.

Scopul acestui studiu a fost de a analiza influența diferitelor variabile preanalitice (protocolul de fixare, protocolul de procesare, soluțiile folosite la protocolul de procesare, tipul de țesut) asupra calității probelor de țesut din laboratorul de Anatomia Patologică.

Pentru a ne îndeplini scopul propus am dezvoltat și am realizat o serie de experimente în care am testat mai mulți factori care pot influența calitatea preparatului histologic final (lama de microscop pe care sunt etalate secțiuni colorate histologic, gata de a fi interpretată de specialist). În prima parte a experimentelor am testat influența a patru protocoale de procesare pe biopsii de diferite tipuri de țesut de iepure (două protocoale folosite frecvent în laboratoarele de histologie care folosesc xilen ca agent de clarificare și două protocoale dezvoltate în cadrul laboratorului Themis Pathology, care folosesc *n*-butanol ca agent de clarificare). Al doilea experiment a constatat în studiul impactului pe care îl au bureții histologici (folosiți în laboratoare pentru a menține integritatea și orientarea biopsiilor și pentru a elimina riscul de a pierde biopsiile mici) asupra soluțiilor de deshidratare și implicit asupra calității preparatelor microscopice rezultate pentru asigurarea unui diagnostic precis.

Experimentele au continuat cu studii care au urmărit influența protocolului de fixare, a protocolului de procesare și influența tipului de țesut procesat asupra detașării accidentale a secțiunilor de pe lama de microscop în timpul colorației imunohistochemice, din cauza protocoalelor dure care se folosesc pentru acest tip de colorații. Ultima parte de experimente s-a axat pe implementarea unei metode personalizate de multiplexare a probelor de țesut în laboratorul de histologie (matrice de țesut/tissue microarray) și analiza de cost odată ce această tehnică este introdusă în laborator.

Toate aceste studii de laborator dezvoltate pentru a ne atinge obiectivul ne-au ajutat să dezvoltăm un protocol optim de procesare a biopsiilor de țesut care mai departe a fost implementat în două studii preclinice.

Lucrarea este structurată în trei părți și cuprinde 9 capitole. Partea bibliografică (4 capitole), Partea experimentală – contribuții originale (4 capitole), și partea de aplicații (studii preclinice) (1 capitol). În prima parte este prezentat un studiu de literatură cu privire la tema de cercetare, a doua parte reprezintă partea experimentală originală, iar în a treia parte sunt prezentate rezultatele din două studii preclinice în urma implementării protocolului optim de procesare a probelor de țesut dezvoltat la partea experimentală.

Prima parte reprezintă studiul de literatură care este structurat mai departe în patru capitole și prezintă datele de literatură cu privire la stadiul actual al informațiilor din domeniul histologiei. În **capitolul 1** (VARIABLE PRE-ANALITICE ÎN ANATOMIA PATOLOGICĂ) este prezentat studiul de literatură de specialitate care descrie diferiți factori pre-analitici care sunt asociați cu protocolul histologic (etapele de deshidratare, clarificare, impregnare și încorporare în mediu suport), metoda de procesare, cât și efectul acestor factori

asupra rezultatelor finale. **Capitolul 2** intitulat BUREȚII HISTOLOGICI cuprinde câteva generalități cu privire la influența acestor factori pre-analitici mai puțin studiați în laboratoarele de cercetare asupra probelor de țesut **Capitolul 3** (VARIABLE PRE-ANALITICE CARE POT INFLUENȚA RETENȚIA SECȚIUNILOR PE LAMA DE MICROSCOP ÎN TIMPUL COLORAȚIILOR IMUNOHISTOCHIMICE) este prezentat studiul de literatură ce face referire la factorii pre-analitici care influențează retenția pe lama de sticlă în timpul colorării imunohistochimice. În **capitolul 4** (TISSUE MICROARRAY - MATRICE DE ȚESUT) sunt relatate diferite metode de multiplexare a blocurilor de parafină (colectarea de biopsii de la mai multe blocuri “donor” la un singur bloc “receptor”). Această tehnică a câștigat popularitate în ultimii 20-30 de ani în laboratoarele de cercetare, dar abia recent a fost introdusă în domeniul clinic. În acest capitol sunt prezentate principiile de obținere a matricilor de țesut, avantajele și potențialul acestor tehnologii.

Partea a doua a tezei (capitolele 5-8) prezintă partea experimentală și contribuțiile originale aduse. În fiecare capitol se studiază factorii pre-analitici diferiți și influența acestora în histologie. În **capitolul 5** (DETERMINAREA CANTITĂȚII DE APĂ REZIDUALĂ DIN SOLUȚIILE DE PROCESARE ȘI DIN PROBELE DE ȚESUT PROCESATE) sunt efectuate mai multe studii de cercetare pentru a examina influența a patru protocoale de procesare (două protocoale folosite frecvent în laboratoarele de histologie care folosesc xilen ca agent de clarificare și două protocoale dezvoltate în cadrul laboratorului Themis Pathology, care folosesc *n*-butanol ca agent de clarificare) pe biopsii de țesut de iepure (ficat, rinichi, splină, jejun, mușchi scheletic, testicule, ureche de iepure). Impactul pe care îl are protocolul de procesare a fost evaluat prin cuantificarea cantității de apă extrasă din proba de țesut de către soluțiile de deshidratare (titrare coulometrică Karl Fisher) și prin cantitatea de apă reziduală din piesă (prin expunerea probelor la cicluri de umiditate – uscare și prin termogravimetrie). Totodată, calitatea protocoalelor de procesare este evaluată și prin examinarea atentă a blocurilor de parafină și a colorațiilor histologice obținute. Rezultatele ne-au demonstrat că protocoalele care utilizează *n*-butanol ca agent de clarificare oferă cele mai bune rezultate în ceea ce privește cantitatea minimă de apă reziduală din piesă, colorații morfologice și imunohistochimice superioare. Capitolul 5 este împărțit mai departe în subcapitole în care sunt prezentate materialele și metodele folosite, rezultatele obținute în urma determinărilor și concluziile studiului. **Capitolul 6** (INFLUENȚA BUREȚILOR HISTOLOGICI ÎN PROTOCOALELE DE PROCESARE A PROBELOR DE ȚESUT) prezintă studiul cu privire la influența bureților histologici (de diferite porozități și grade de reticulare) asupra contaminării/degradării soluțiilor folosite în protocoalele de procesare a biopsiilor, cât și influența acestora asupra calității colorațiilor topografice și imunohistochimice a secțiunilor rezultate. Acest capitol este structurat în subcapitolele: materialele și metodele, rezultate și concluzii. În **capitolul 7** (INFLUENȚA VARIABLELOR PRE-ANALITICE ÎN RETENȚIA SECȚIUNILOR PE LAMA DE MICROSCOP ÎN TIMPUL COLORAȚIILOR IMUNOHISTOCHIMICE) sunt studiați factorii pre-analitici care pot determina detașarea secțiunilor de pe lama de microscop în timpul colorației imunohistochimice, din cauza tratamentelor dure folosite la recuperarea antigenului. Parametrii variați și testați sunt: fixarea, protocoalele de procesare, dimensiunea biopsiei și tipul de țesut. Constatările principale sunt: dacă este folosit un protocol de procesare nepotrivit secțiunile se detașează de pe lama de sticlă, după cum urmează: în proporție de 29% (biopsii de 5 mm), 24% (biopsii de 3 mm) și 48% (biopsii de 1 mm), iar biopsiile la care s-a întârziat fixarea acestora (biopsiile au fost

lăstate 12h la temperatura camerei fără fixare și doar apoi au fost fixate la temperatura camerei pentru 252h în 10% NBF) se detașează de pe lama de sticlă cu până la 41% (biopsii de 1 mm), iar cele mai afectate biopsii sunt cele de stomac și limbă. Acest capitol este împărțit mai departe în subcapitole în care se prezintă materialele și metodele folosite, rezultatele obținute în urma determinărilor și concluziile studiului. **Capitolul 8** intitulat ANALIZA DE COST ÎN LABORATORUL DE HISTOLOGIE: TMA VS METODA CLASICĂ reprezintă analiza de cost în laboratorul de histologie dacă se folosesc matrici de țesut (TMA) în locul metodei clasice. În funcție de modelul folosit, costul total al serviciilor histologice poate fi redus cu până la 91%. Capitolul 8 este împărțit în subcapitolele: materialele și metodele, rezultate, concluzii.

Partea a treia – APLICAȚII, reprezintă **capitolul 9** și prezintă rezultatele obținute în urma implementării în doua studii preclinice a protocolului de procesare a țesutului care a oferit cele mai bune rezultate în partea experimentală a acestei lucrari (protocolul care a folosește *n*-butanol ca agent de clarificare). În primul studiu s-au testat trei medicamente anti-inflamatoare într-un model experimental de psoriazis, iar în al doilea studiu s-a testat efectul imunologic al produselor din gama Imunoinstant (Oul hiperimun, Imunoinstant G, Imunoinstant multiplu). Protocolul de procesare folosit permite obținerea de blocuri de parafină și lame de microscop de calitate foarte bună, facilitând o măsurătoare ușoară și precisă a stratului granular, măsurătoare necesară pentru determinarea gradului de ortokeratoză în studiul 1 și o evaluare preciză din punct de vedere histologic a secțiunilor colorate cu hematoxină-eozină în cazul studiului 2.

În finalul tezei sunt prezentate contribuțiile originale și concluziile generale ale lucrării de doctorat. Teza se încheie cu un capitol de Bibliografie conținând 120 de referințe bibliografice și cu lista lucrărilor științifice originale publicate.

## OBIECTIVELE LUCRĂRII

Obiectivul general al acestei teze de doctorat a fost studiul fizico-chimic al probelor de țesut și impactul variabilelor pre-analitice în Anatomia Patologică.

Realizarea acestui obiectiv s-a concretizat în următoarele etape:

1. Determinarea conținutului de apă din proba de țesut în diferite etape ale procesării, prin echilibrarea probelor cu solvenți universali și determinarea cantității de apă din solventul folosit;
2. Determinarea conținutului de apă fluctuantă în țesutul parafinat prin expunerea acestuia la cicluri de umiditate – uscare și cântărirea probelor cu o balanță analitică de mare precizie;
3. Determinarea conținutului de apă din țesuturile parafinate prin termogravimetrie;
4. Cuantificarea extracției apei din țesut în diferite etape de procesare;
5. Evaluarea influenței pe care o au bureții histologici asupra soluțiilor de procesare și implicit asupra probelor de țesut;
6. Analiza influenței pe care o au diferiți parametri din etapele pre-analitice (tipul de țesut și dimensiunea biopsiei, protocoalele de fixare și procesare, soluțiile de recuperare a antigenului) asupra detașării accidentale a secțiunilor de pe lama de microscop în timpul colorației imunohistochemice.
7. Generarea de matrici sectionabile personalizate (tissue microarray-uri) din probele parafinate;

8. Folosirea de matrici secționabile pentru prelucrarea probelor în laboratorul de histologie și analiza de cost versus metoda conventionala.

## PARTEA A DOUA - STUDIUL EXPERIMENTAL

### **CAPITOLUL 5. DETERMINAREA CANTITĂȚII DE APĂ REZIDUALĂ DIN SOLUȚIILE DE PROCESARE ȘI DIN PROBELE DE ȚESUT PROCESATE**

Principalul factor răspunzător de apariția artefactelor în urma procesului de deshidratare, clarificare și infiltrare/incorporare la parafină a preparatelor biologice pentru analiza histologică este apa reziduală din piesă și/sau expunerea la oxigenul atmosferic. Toate studiile din literatură confirmă faptul că indiferent de protocolul de procesare folosit, o cantitate minimă de apă reziduală rămâne în țesutul parafinat. De aceea scopul fiecărui protocol de procesare este de a extrage cât mai multă apă din piesă indiferent de solvenții sau metodele folosite.

Scopul studiului de față este de a găsi un protocol optim de deshidratare care să nu afecteze negativ chimia, morfologia, antigenicitatea, arhitectura, ARN-ul și ADN-ul țesutului.

În cadrul laboratorului de cercetare Themis Pathology (Voluntari, Ilfov) am dezvoltat un protocol de procesare de trei zile, la temperatura camerei care folosește ca agent de deshidratare/clarificare *n*-butanolul. *n*-butanolul este un solvent universal parțial miscibil cu apa cât și un bun intermediar între alcool și parafină. Pentru a accelera difuzia solvenților în țesut (și pentru a scurta timpul total al protocolului de procesare), am testat un al doilea protocol cu *n*-butanol, realizat la 37 °C, timp de doar 10 ore și 30 minute. Protocoale alternative sunt cele doua protocoale cu xilen testate în cadrul experimentului, realizate la temperatura camerei versus la temperatura de 37 °C.

Testarea celor patru protocoale de procesare a fost realizată pe biopsii de diferite tipuri de țesut de iepure din rasa New Zealand, iar alegerea acestora s-a făcut în funcție de compoziția și structura țesutului. Pentru prelevarea de biopsii, am ales organe cu conținut diferit de apă (conținut ridicat de apă – testicul, conținut scăzut de apă – ureche, jejun), organe omogene (splină, ficat, mușchi) dar și heterogene (rinichi). În funcție de structura țesutului, rata de difuzie a solvenților este diferită astfel că țesuturile alese pentru testare au fost țesuturi cu difuzie rapidă (rinichi, jejun) cât și cu difuzie lentă (testicul, ficat, ureche, mușchi, splină) [54, 58].

Pentru a evalua calitatea preparatelor histologice obținute în urma celor patru protocoale de procesare, cât și influența morfologiei și compoziției inițiale a țesutului asupra performanței celor patru protocoale, mai multe determinări au fost realizate, astfel încât capitolul 5 este structurat astfel:

- Determinarea conținutului de apă din soluțiile de deshidratare / clarificare folosind patru protocoale diferite de procesare histologică (prin titrarea coulometrică Karl Fischer)
- Determinarea conținutului de apă fluctuantă în țesutul parafinat (prin expunerea acestuia la cicluri de umiditate – uscare) prin cântărire cu o balanță analitică de mare precizie
- Determinarea conținutului de apă din țesuturile parafinate prin termogravimetrie



- Determinarea conținutului de apă din proba de țesut în diferite etape ale procesării (după echilibrarea probelor cu solvenți universali se determină apa din solventul folosit)
- Cuantificarea extracției apei din țesut în diferite etape de procesare.

Pentru analizele ulterioare (colorații topografice și imunohistochimice) ale probelor de țesut procesate cu cele patru protocoale de procesare am folosit metoda de multiplexare, fiind mai puțin costisitoare și mai rapidă. Aceasta constă în utilizarea unor matrici secționabile care încorporează mai multe biopsii într-un singur bloc de parafină. Această etapă a fost realizată după obținerea blocurilor “donor” (196 blocuri donor).

### 5.2.1 Determinarea cantității de apă din soluțiile de procesare

Rolul pe care îl are protocolul de procesare poate fi observat în determinările apei transferate de la o soluție la alta în soluțiile de procesare (Tabelul 5.3).

În timpul etapei de deshidratare, alcoolul etilic are rolul de a extrage apa din țesut. Se poate observa că până la etapa 5 [etanol 100 % (1)] este extrasă din țesut aproximativ aceeași cantitate de apă pentru toate cele patru protocoale. Pentru protocoalele I și II deshidratarea se continuă cu încă un schimb de etanol 100 %, iar pentru protocoalele III și IV deshidratarea se continuă cu primul schimb de *n*-butanol (etapa 6), întrucât acest alcool este miscibil cu apa.

Cantitatea de apă extrasă din țesut de cele două soluții este diferită, alcoolul etilic absolut ajută la o deshidratare mai eficientă/rapidă a țesutului decât *n*-butanolul.

Pe de altă parte, după ultimul schimb de alcool absolut (Protocol I și Protocol II), în țesut va rămâne o cantitate mică de apă ce nu va mai putea fi extrasă în timpul etapei de clarificare, xilenul fiind practic nemiscibil cu apa.

Pentru Protocol III și Protocol IV, deshidratarea va continua în timpul etapei de clarificare deoarece *n*-butanolul va continua să extragă lent apa rămasă în țesut.

După ultima etapă de clarificare, se poate observa prezența unei concentrații mai mari de apă reziduală în agentul de clarificare din protocoalele care folosesc *n*-butanol.

Este bine știut faptul că solvenții universali (butanol, dioxan, tetrahidrofuran, etc.) facilitează obținerea celor mai bune preparate histologice în cazul țesuturilor fragile (creier, cefalopode, plante), deoarece deshidratarea este lentă, delicată și în același timp completă [23].

Tabel 5.3. Concentrația de apă din soluțiile de procesare din cele patru protocoale testate. Cantitatea de apă extrasă a fost determinată prin metoda coulometrică Karl Fischer. Etapele de la 1 la 8 reprezintă soluțiile de procesare corespunzătoare protocoalelor descrise la secțiunea 5.1.3. Soluțiile din etapele 1-5 reprezintă soluțiile de deshidratare, iar soluțiile din etapele 7-8 reprezintă soluțiile de clarificare.

Etapa de procesare	Concentrația de apă din soluțiile de procesare			
	Protocol I	Protocol II	Protocol III	Protocol IV
1	35.37	34.17	34.61	35.91
2	21.64	22.67	21.85	12.44
3	7.576	5.717	6.561	6.466
4	6.561	6.775	6.346	-
5	0.403	0.392	0.399	0.579
6	0.156	0.148	0.152	-
7	0.031	0.035	0.149	0.326
8	0.029	0.012	0.155	0.137

### 5.2.2 Determinarea cantității de apă fluctuantă în probele de țesut parafinat

Cantitatea de apă fluctuantă în țesuturile procesate cu cele patru protocoale testate a fost determinată inițial prin expunerea probelor la cicluri de umiditate crescută și cicluri de umiditate scăzută (uscarea). Pentru obținerea saturației, probele au fost lăsate să se echilibreze în incinta climatică timp de 4 zile pentru fiecare ciclu. Diferența valorilor obținute la cântăririle de la umiditate ridicată și cântăririle de la umiditate scăzută (uscarea), reprezintă apa fluctuantă din țesut

Rezultatele (Tabelul 5.4) au arătat că diferențele statistice între cele patru protocoale depind de tipul de organ examinat, astfel încât, acestea sunt semnificative pentru ficat și mușchi ( $p < 0.05$ ) și ne semnificative pentru intestin, rinichi, ureche și testicul ( $p > 0.05$ ).

În medie, cantitatea de apă care este absorbită și apoi eliminată din țesut în timpul ciclurilor de umiditate/uscarea, indiferent de tipul de organ, fiind mai mică la organele procesate cu protocoalele III și IV.

Tabel 5.4. Cantitatea de apă fluctuantă (în grame) în țesut (ficat, intestin, mușchi, rinichi, ureche, testicul). Valorile reprezintă media a șapte determinări. SEM reprezintă eroarea standard a mediei. Diferențele au fost considerate semnificative dacă  $p < 0.05$  (Test ANOVA)

Organ		Grame apă fluctuantă în țesut				Test ANOVA
		Protocol I	Protocol II	Protocol III	Protocol IV	Valoare p
Ficat	Medie	0.025	0.038	0.025	0.021	$p < 0.05$
	SEM	0.002	0.003	0.002	0.002	
Intestin	Medie	0.010	0.011	0.011	0.010	$p > 0.05$
	SEM	0.001	0.002	0.002	0.001	
Mușchi	Medie	0.015	0.016	0.015	0.010	$p < 0.05$
	SEM	0.001	0.001	0.002	0.002	
Rinichi	Medie	0.013	0.017	0.013	0.013	$p > 0.05$
	SEM	0.001	0.001	0.001	0.001	
Ureche	Medie	0.025	0.026	0.026	0.024	$p > 0.05$
	SEM	0.003	0.002	0.005	0.003	
Testicul	Medie	0.014	0.038	0.015	0.023	$p > 0.05$
	SEM	0.002	0.005	0.002	0.004	

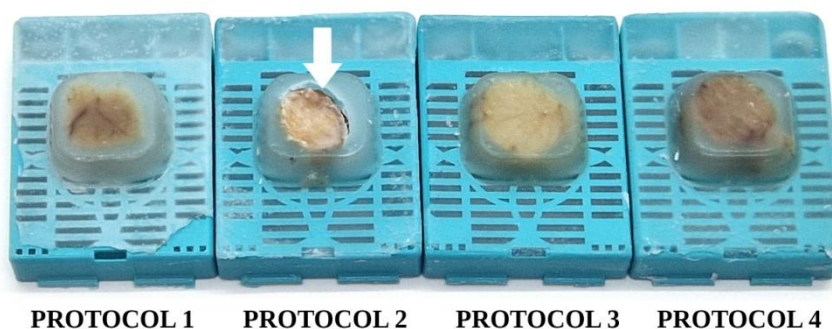


Figura 5.8. Blocuri de parafină care conțin biopsii de testicule: Protocolul 1–Protocolul 4. Săgeata albă indică o depresiune a probelor de țesut în blocul de parafină, semn clar de apă reziduală excesivă/procesare insuficientă a țesuturilor

Rezultatele obținute în urma expunerii probelor de țesut la cicluri de umiditate-uscare au fost corelate cu rezultatele de la examinarea vizuală a blocurilor de parafină; la câteva zile de la realizarea blocurilor de parafină am observat că blocurile care conțineau biopsiile de testicule aveau pe suprafața acestora o adâncitură/depresiune, ceea ce indică o infiltrare insuficientă a parafinei în probele de țesut, indicativ pentru procesare incompletă/defectuoasă. Acest lucru a fost observat doar la țesuturile procesate cu Protocolul 2 (Figura 5.8). Infiltrarea incompletă urmată de micșorarea probelor de țesut a fost mai evidentă la probele de testicule, dar s-a observat ocazional și la celelalte tipuri de organe, fiind mai puțin marcantă pentru ureche și mușchiul scheletic, în timp ce celelalte organe (ficat, rinichi, splină, jejun) păreau a fi mai bine procesate.

### 5.2.3. Determinarea prin termogravimetrie a cantității de apă în probele de țesut

După determinarea cantității de apă fluctuantă din țesuturi prin expunerea acestora la cicluri de umiditate – uscare și cântarire, un total de 14 probe de testicul au fost folosite pentru o determinare secundară prin analiza termogravimetrică (TGA).

Ca și în cazul valorilor obținute în urma expunerii probelor de țesut la cicluri de umiditate/uscare, rezultatele obținute în urma termogravimetriei (Tabelul 5.5) confirmă că probele care folosesc ca agent de clarificare *n*-butanolul, conțin cele mai mici cantități de apă reziduală:  $0.011 \pm 0.001\%$  vs  $0.04 \pm 0.004\%$ , în cazul valorilor obținute la clarificarea cu xilen ( $p < 0.05$ , valorile sunt semnificative).

Tabel 5.5. Rezultate termogravimetrie pentru probe de testicul procesate cu xilen și cu *n*-butanol. Rezultatele sunt exprimate în procente și reprezintă pierderile de masă în intervalul de temperatură 100 – 120 °C și reziduurile anorganice după temperatura de 700 °C

Proba	% pierderi de masă		% reziduuri anorganice	
	xilen	<i>n</i> -butanol	xilen	<i>n</i> -butanol
1	0.02	0.02	5.5	3.4
2	0.05	0.01	4.7	2.9
3	0.03	0.01	7.5	3.2
4	0.05	0.01	1.7	5.6
5	0.05	0.01	1.3	4.8
6	0.04	0.01	2.6	1.2
7	0.04	0.01	4.5	4.4
Medie	0.04	0.011	3.97	3.64
SEM	0.004	0.001	0.84	0.55

### 5.2.4 Analiza statistică a extracției apei din țesut în diferite etape de procesare

Rezultatele testului ANOVA sunt specificate în Tabelul 5.6, unde  $X_{m0} = X_{m,FF}$  și  $X_{m,fin}$  sunt cantitățile inițiale și finale ale raportului masei de apă ( $X$ ), iar  $W$  (%) reprezintă procentul de apă extrasă definit de ecuația (5.1).

$$W = 100 \frac{(X_{m0} - X_{m,fin})}{X_{m0}} \quad (5.1)$$

Rezultatele sumarizate în Tabelul 5.6 evidentiază faptul că, pentru toate țesuturile, protocolul patru de procesare este cel mai convenabil, adică:

(i) pentru ficat,  $X_{m,fin,4} = X_{m,butanol(2)} = 0.04$  a fost semnificativ mai mic (de 3-7 ori) decât  $X_{m,fin,i}$  ( $i=1,2,3$ ) corespunzătoare celorlalte trei protocoale de procesare (0.12-0.26), în timp ce  $W_4 = 99.0\%$  a fost ușor mai mare (1-5%) decât  $W_i = 93.9-98.3\%$ ;

(ii) pentru intestin,  $X_{m,fin,4} = X_{m,butanol(2)} = 0.19$  a fost semnificativ mai mic (aproape de 3 ori) decât  $X_{m,fin,i} = 0.47-0.49$  și  $W_4 = 98.0\%$  a fost mai mare (3-10%) decât  $W_i = 89.1-95.2\%$ ;

(iii) pentru mușchi,  $X_{m,fin,4} = X_{m,butanol(2)} = 0.09$  a fost semnificativ mai mic (de 3-5 ori) decât  $X_{m,fin,i} = 0.23-0.45$  și  $W_4 = 98.4\%$  a fost mai mare (3-6%) decât  $W_i = 92.6-96.0\%$ ;

(iv) pentru rinichi,  $X_{m,fin,4} = X_{m,butanol(2)} = 0.11$  a fost semnificativ mai mic (de 2-5 ori) decât  $X_{m,fin,i} = 0.26-0.54$  și  $W_4 = 98.3\%$  a fost mai mare (2-7%) decât  $W_i = 91.5-96.6\%$ ;

(v) pentru ureche,  $X_{m,fin,4} = X_{m,butanol(2)} = 0.08$  a fost semnificativ mai mic (de 3-12 ori) decât  $X_{m,fin,i} = 0.23-0.93$  și  $W_4 = 97.9\%$  a fost mai mare (4-25%) decât  $W_i = 78.5-94.5\%$ .

Mai mult, pentru protocolul 1 de procesare extracția apei cu soluție de alcool etilic 100% poate fi omisă, deoarece nu există diferențe semnificative statistic între  $X_{m,A95(2)}$ ,  $X_{m,A100(1)}$ , și  $X_{m,A100(2)}$ .

Similar, pentru protocolul 2 de procesare, extracția apei cu soluție de alcool etilic 95% se poate realiza într-un singură etapă, deoarece nu au fost diferențe semnificativ statistice între  $X_{m,A95(1)}$  and  $X_{m,A95(2)}$ .

Tabel 5.6. Mediile inițiale ( $X_{m0} = X_{m,FF}$ ) și finale ( $X_{m,fin}$ ) a raportului de masă ( $X$ ) în diferite țesuturi și protocoale de procesare și comparații între mediile  $X$  ( $X_m$ ) după extracția apei cu diferite tipuri/concentrații de solvenți și etapele de extracție [(1), (2) și (3)]

Țesut	Protocol de procesare	$X_{m0}$	$X_{m,fin}$	$W$ (%)	Observații
Ficat	1	4.05	0.12	97	Nu există diferențe semnificative statistic între $X_{m,A95(2)}$ , $X_{m,A100(1)}$ , $X_{m,A100(2)}$ și $X_{m,xylene(1)}$
	2	4.28	0.26	93.9	Nu există diferențe semnificative statistic între $X_{m,A95(1)}$ și $X_{m,A95(2)}$ și $X_{m,A100(2)}$ și $X_{m,xylene(1)}$
	3	6.96	0.12	98.3	Nu există diferențe semnificative statistic între $X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(2)}$ și $X_{m,butanol(2)}$ și $X_{m,butanol(3)}$
	4	3.88	0.04	99	Toate $X_m$ corespunzătoare extracției cu diferite tipuri/concentrații de solvent și etape de extracție sunt semnificativ diferite
Intestin	1	9.89	0.47	95.2	Nu există diferențe semnificative statistic între $X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$
	2	9.84	0.48	95.1	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$ sunt semnificativ diferite
	3	4.48	0.49	89.1	Nu există diferențe semnificative statistic între $X_{m,A100(1)}$ and $X_{m,butanol(3)}$
	4	9.43	0.19	98	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(2)}$ sunt semnificativ diferite
Mușchi	1	5.7	0.23	96	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$ sunt semnificativ diferite
	2	6.09	0.45	92.6	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$ sunt semnificativ diferite
	3	6.1	0.26	95.7	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(3)}$ sunt semnificativ diferite
	4	5.59	0.09	98.4	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(2)}$ sunt semnificativ diferite
Rinichi	1	7.08	0.4	94.4	Nu există diferențe semnificative statistic $X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$
	2	6.37	0.54	91.5	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$ sunt semnificativ diferite
	3	7.65	0.26	96.6	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(3)}$ sunt semnificativ diferite
	4	6.35	0.11	98.3	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(2)}$ sunt semnificativ diferite
Ureche	1	4.19	0.23	94.5	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$ sunt semnificativ diferite
	2	4.32	0.93	78.5	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,xylene(2)}$ sunt semnificativ diferite
	3	5.02	0.32	93.6	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(3)}$ sunt semnificativ diferite
	4	3.76	0.08	97.9	$X_{m,A100(1)}$ și $X_{m,butanol(2)}$ sunt semnificativ diferite



### 5.2.5 Colorații topografice hematoxilină – eozină

Secțiunile obținute din blocurile care conțineau matrici de țesut și colorate topografic cu hematoxilină – eozină au arătat diferențe vizibile între cele patru protocoale de procesare (Figura 5.11). În funcție de organul procesat, se pot observa artefacte care apar în timpul colorării, mai ales pentru ureche, mușchi și testicul. Artefacte ca plierea sau chiar detașarea completă a secțiunilor de țesut de pe lamă sunt evidente aproape întotdeauna pentru Protocolul II și Protocolul I de procesare (ambele folosind xilen ca agent de clarificare). Pentru Protocolul III și Protocolul IV se observă semnificativ mai puține artefacte, mai ales plieri și cute ce apar în timpul etalării pe lamă a secțiunii.

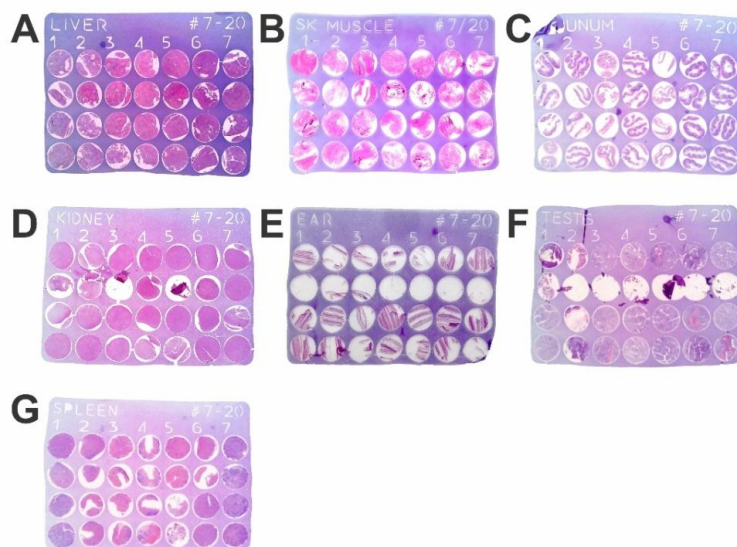


Figura 5.11. Colorare topografică hematoxilină – eozină. Matrice de țesut cu următoarele organe: (A) ficat, (B) mușchi, (C) intestin, (D) rinichi, (E) ureche, (F) testicul, (G) splină. ). Liniile 1 - 4 corespund Protocoloalelor I – IV

### 5.2.6 Colorații imunohistochemice

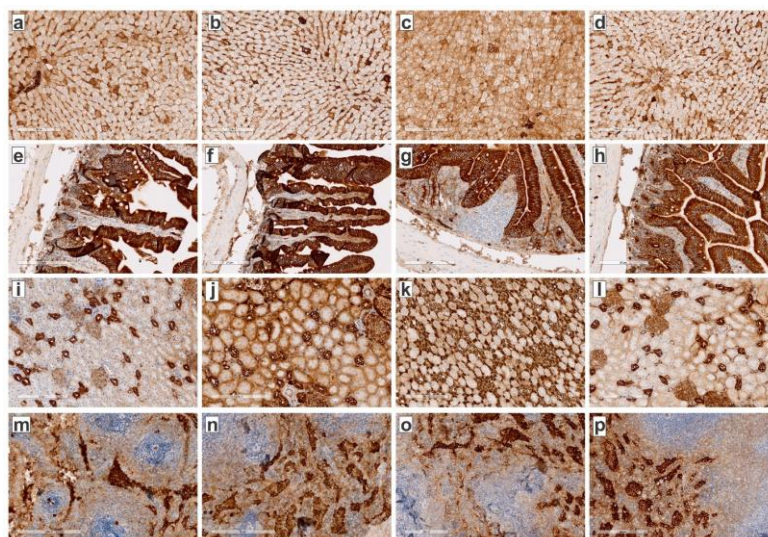


Figura 5.12 Colorație imunohistochimică cu anti-citokeratinele AE1/AE3 conjugate cu peroxidază de hrean: a) ficat - procesare I; b) ficat - procesare II; c) ficat - procesare III; d) ficat - procesare IV; e) intestin - procesare I; f) intestin - procesare II; g) intestin - procesare III; h) intestin - procesare IV; i) rinichi - procesare I; j) rinichi - procesare II; k) rinichi - procesare III; l) rinichi - procesare IV; m) splină - procesare I; n) splină - procesare II; o) splină - procesare III; p) splină - procesare IV. Scanare cu obiectiv 20x (Ocus 20, Grundium Oy, Tampere, Finlanda)

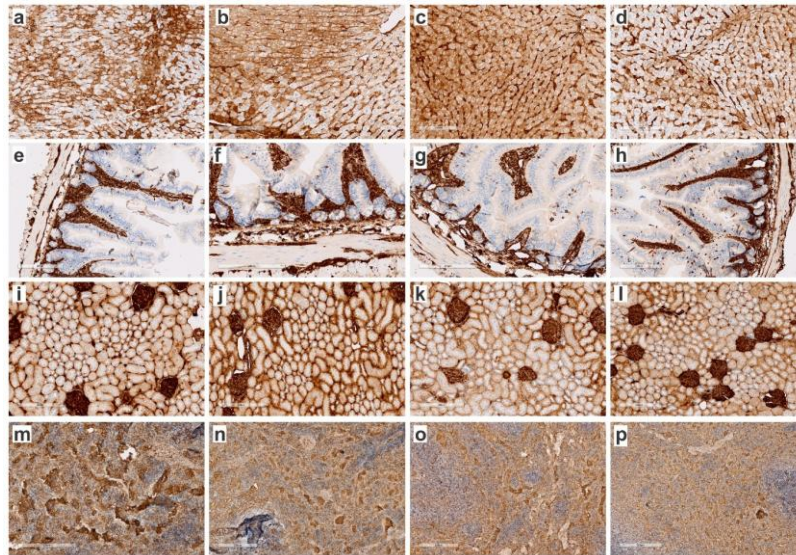


Figura 5.13. Colorație imunohistochimică cu anticorpi anti-vimentină conjugată cu peroxidază de hrean: a) ficat - procesare I; b) ficat - procesare II; c) ficat - procesare III; d) ficat - procesare IV; e) intestin - procesare I; f) intestin - procesare II; g) intestin - procesare III; h) intestin - procesare IV; i) rinichi - procesare I; j) rinichi - procesare II; k) rinichi - procesare III; l) rinichi - procesare IV; m) splină - procesare I; n) splină - procesare II; o) splină - procesare III; p) splină - procesare IV. Scanare cu obiectiv 20x (Ocus 20, Grundium Oy, Tampere, Finlanda)

În Figurile 5.12 și 5.13 se poate observa că probele de țesut s-au colorat specific cu anticorpii anti-vimentină și anti-citokeratină AE1/AE3, indiferent de protocolul de procesare. Pe de altă parte, în ce privește colorația nespecifică, de fond (“Background”), pot fi observate diferențe semnificative între protocoalele de procesare testate: imagini cu mai puțină colorație nespecifică și implicit un contrast optic superior s-a observat la protocolul cu *n*-butanol, la temperatura camerei. Deși o cuantificare a contrastului optic este oarecum subiectivă, ordinea clarității optice (de la bună spre inferioară) pare a fi: butanol la RT, butanol la cald, xilen la RT, xilen la cald.

## CAPITOLUL 6. INFLUENȚA BUREȚILOR HISTOLOGICI ÎN PROCESAREA PROBELOR DE ȚESUT

În laboratoarele de histologie, bureții histologici sunt folosiți pentru a preveni pierderea pieselor mici de țesut în timpul protocoalelor de procesare și totodată pentru menținerea orientării biopsiei.

Porozitatea bureților și capacitatea de transport a fluidelor în timpul procesării histologice este un aspect neglijat până în prezent și este extrem de variabil, în funcție de producător. Din cauza structurii și capacității de absorbție a materialelor din care sunt făcuți bureții, aceștia pot reține apă și o pot transporta de la o soluție la alta, determinând schimbarea protocolului de procesare prin diluarea soluțiilor de deshidratare. Folosirea de soluții „contaminate”/diluante, poate face ca protocolul de procesare să devină ineficient, iar în țesut să rămână apă. Includerea la parafină a țesutului care încă are urme de apă și depozitarea necorespunzătoare (umiditate ridicată, temperatură fluctuantă, etc.) a blocurilor de parafină obținute afectează calitatea secțiunilor colorate, favorizând hidroliza biomarkerilor proteici și a acizilor nucleici rezultând pierderea antigenității [5, 52, 53].



Deoarece sunt foarte puține studii care au cercetat influența bureților histologici asupra biopsiei, acestea vorbind doar despre artefactele de compresie care apar pe suprafața biopsiei la utilizarea bureților ne-am propus ca în capitolul următor să studiem în detaliu efectul bureților histologici asupra soluțiilor de deshidratare și implicit impactul acestora asupra integrității țesuturilor procesate.

Studiul a presupus determinarea capacității de absorbție/retenție (“carry-over”) a trei tipuri de bureți folosiți în curent în laboratoarele de histologie; determinarea procentului de strângere/contractie a matricilor secționabile care conțin biopsii liniare de țesut, în urma a diferite protocoale de procesare; măsurarea concentrației de etanol din rezervoarele cu soluțiile folosite în procesarea histologică. Calitatea protocolului de procesare a fost evaluat prin colorații topografice hematoxilină - eozină și imunohistochimice ale țesuturilor procesate cu bureții histologici testați.

Pentru acest studiu a fost folosit țesut proaspăt de porc (rinichi) de la care au fost colectate multiple biopsii cu ajutorul unui pistol de biopsie (Bard Max-Core, Bard Biopsy Systems, Tempe, SUA) folosind un ac tru-cut Gauge 16 (diametrul biopsies rezultate este de aproximativ 1.2mm) și aranjate în matrici secționabile *BxChip*<sup>TM</sup> cu 6 cavități (Figura 6.5).

Au fost testate trei tipuri de bureți folosiți frecvent în laboratoarele de histologie (Tabel 6.1): burete histologic A (Themis Pathology SRL/ LUMEA Inc., USA), burete histologic B (BioPad Biopsy Pads, CellPath Ltd., UK), burete histologic C (Biopsy Foam Pads, Simport® Scientific, Canada). Ca și probe control au fost folosite casete histologice fără bureți (Figura 6.5).

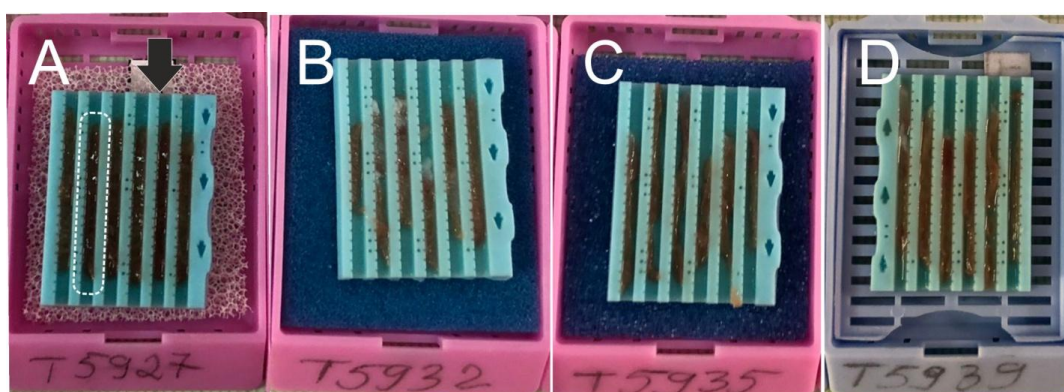


Figura 6.5. Casete cu bureți histologici: A: burete Themis Pathology SRL/ LUMEA Inc., USA, B: burete CellPath Ltd., C: burete Simport® Scientific, D: casete histologice fără bureți. În chenarul alb, punctat, se poate observa o biopsie de Gauge 16, iar cu săgeata neagră este evidențiată matricea secționabilă (*BxChip*<sup>TM</sup>)

Tabel 6.1. Proprietățile fizice ale bureților histologici testați

Burete	Culoare	Compoziție	Mărime (mm) (lungime×lățime×grosime)	Greutate (grame)	Porozitate (Pores per Linear Inches/ppi)
A	Alb	Poliester poliuretan	3 × 2,5 × 3.3	1.5	40 - 50
B	Albastru	Poliuretan	3 × 2.5 × 2.8	1.2	70 - 100
C	Albastru	Poliester uretan	3 × 2.5 × 2.2	0.9	55 - 65

### 6.2.1. Capacitatea de absorbție și contaminare reziduală (“carry-over”) a bureților histologici

Capacitatea celor trei tipuri de bureți testați de a absorbi și a reține apa este diferită.. După prima etapă de eliminare a apei din porii bureților, după lăsarea acestora la scurs pe o sită, buretele B conține până la 35% apă, în timp ce buretele A și buretele C au aproximativ 25%. După o centrifugare lentă a bureților (150 rpm, timp de 1 minut), buretele B a reținut 30% apă, buretele C 20%, iar buretele A 5%.

### 6.2.2. Procentajul de strângere a matricilor secționabile după protocolul de procesare

Matricile secționabile *BxChip*<sup>TM</sup> au fost măsurate (lungime și lățime) după fiecare procesare (Figura 6.8 și Figura 6.9). Valorile înregistrate reprezintă media măsurărilor a patru matrici secționabile.

Rezultatele arată că cel mai mult s-au strâns matricile care nu au fost procesate cu burete histologic. Plecând de la dimensiunea inițială de 23 x 14 mm, ajunge procesare să aibă 16.6 x 12.6 mm, spre deosebire de matricile procesate cu burete histologic B (care reține cea mai mare cantitate de apă) care se strâng 17.5 x 13.3 mm.

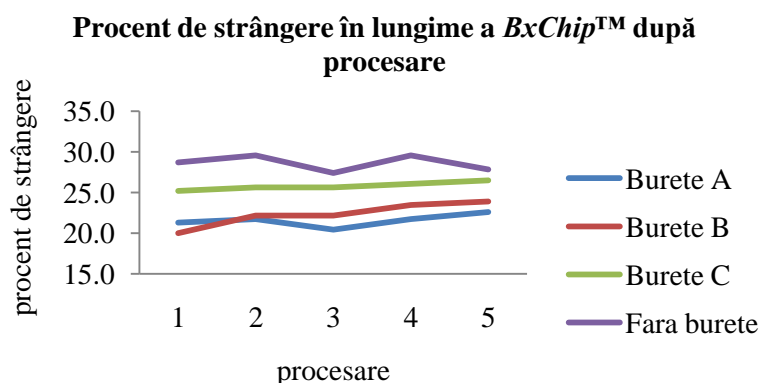


Figura 6.8. Graficul evidențiază procentul de strângere a *BxChip*<sup>TM</sup> în lungime după fiecare procesare. Valorile reprezintă media celor patru determinări

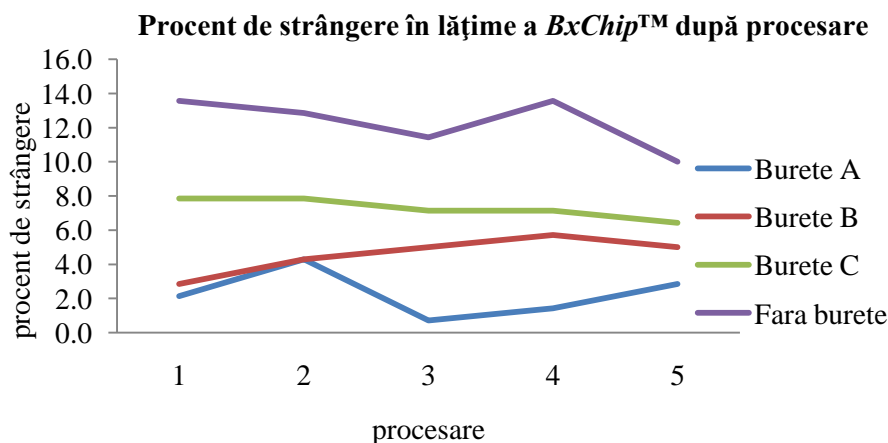


Figura 6.9. Graficul evidențiază procentul de strângere a *BxChip*<sup>TM</sup> în lățime după fiecare procesare. Valorile reprezintă media celor patru determinări



#### 6.2.4. Determinarea concentrației de alcool în soluțiile de procesare prin cântărire

Tabelul 6.4. Concentrația de etanol a fost determinată cu ajutorul calculatorului online ([www.handymath.com](http://www.handymath.com)) “Manualul inginerilor chimici al lui Perry” (Robert H. Perry, Don Green, ediția a șaptea). Temperatura alcoolului în momentul cântăririi a fost de 20 °C, iar valorile reprezintă media a trei determinări. Burete histologic: A – Themis Pathology SRL/ LUMEA Inc, B – BioPad Biopsy Pads, C – Biopsy Foam Pads, D – fără burete histologic

Burete histologic	Etapa de deshidratare	Concentrația de etanol					
		inițială	după prima procesare	după a doua procesare	după a treia procesare	după a patra procesare	după a cincea procesare
A	1	64.5	54.59	45.13	38.35	32.34	27.23
	2	95	92.56	87.34	82.89	78.16	73.32
	3	95	95.64	94.56	93.58	92.10	90.13
	4	95	96.46	95.40	95.53	94.49	94.23
	5	100	100.00	100.00	100.00	99.57	99.07
	6	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	7	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
B	1	64.5	51.64	39.27	31.54	21.63	15.05
	2	95	88.47	79.76	71.21	64.48	55.53
	3	95	95.12	92.66	89.07	84.54	79.43
	4	95	95.78	94.95	93.90	92.64	91.01
	5	100	100.00	99.54	98.46	97.65	96.50
	6	100	100.00	100.00	100.00	100.00	99.29
	7	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
C	1	64.5	54.70	47.19	40.35	33.64	28.61
	2	95	90.47	83.97	78.03	71.27	65.39
	3	95	95.28	93.16	90.92	87.78	84.43
	4	95	95.87	94.93	94.16	93.19	92.22
	5	100	100.00	100.00	99.30	98.29	97.37
	6	100	100.00	100.00	100.00	100.00	99.82
	7	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
D	1	64.5	59.42	54.59	50.55	46.92	43.94
	2	95	93.59	90.99	88.41	85.57	83.10
	3	95	95.74	95.10	94.41	93.51	92.51
	4	95	95.98	95.38	95.16	94.49	94.01
	5	100	100.00	100.00	100.00	100.00	99.72
	6	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	7	100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Analiza în detaliu a primului schimb de etanol (Tabelul 6.4) arată că după 5 cicluri de procesări fără a-l reînnoi (o practică comună în laboratoarele de histologie) cu o concentrație inițială de 64.5%, acesta ajunge să se degradeze la 15% dacă este folosit pentru procesarea biopsiilor buretele histologic tip B și 27% dacă se folosește buretele histologic A sau C.

Această tendință se păstrează și pentru următoarele concentrații de alcool. Un „echilibru” se observă abia la ultimul alcool, unde concentrația devine cea dorită.

Cu toate acestea, pentru protocoalele unde s-a folosit burete A, concentrația de etanol este aceeași cu protocoalele de procesare fără burete. Datorită porozității mai mari (40 – 50 ppi) acest tip de burete permite trecerea solvenților mult mai ușor și contaminează cel mai puțin soluțiile folosite în etapele de procesare următoare. Rezultatele din Tabelul 6.4 confirmă testul nostru inițial unde am testat capacitatea de absorbție și remanența bureților: buretele A

și buretele C rețin mai puțină apă și implicit solvent, ceea ce face ca drenarea lichidelor din porii acestora să se facă mai rapid.

### 6.2.6 Colorații topografice hematoxină–eozină

La examinarea la microscop a secțiunilor de țesut etalate pe lamă (Figura 6.16) se pot observa diferențe în ceea ce privește intensitatea și contrastul colorației de-a lungul celor 5 protoale succesive de procesare. Intensitatea colorației hematoxină – eozină scade pe măsură ce crește cantitatea de apă din soluțiile de procesare. De exemplu, după procesarea 1 (concentrație de 59% în primul alcool) colorația este mai intensă (Figura 6.16a) decât după ultima procesare (concentrație de 44% în primul alcool) unde este neuniformă și mai puțin intensă (Figura 6.16e).

Când s-a folosit burete A, s-a observat fragmentarea cilindrului biopsic indiferent de protocolul de procesare (Figura 6.16f-j) Acest lucru se datorează structurii și presiunii exercitate asupra biopsiei de către buretele oarecum mai gros decât celelate tipuri.

Cea mai evidentă degradare a colorabilității se poate observa la țesuturile procesate cu buretele B unde intensitatea colorației scade dramatic, biopsia se fragmentează, apar goluri și plieri ale biopsiei (Figura 6.16p-t). Aceste aspecte se corelează cu concentrația scăzută de etanol din soluțiile de procesare: după 5 procesări consecutive primul etanol ajunge la 15% (de la 65% inițial) în timp ce al doilea scade la 55.5% (de la 95% cât era inițial).

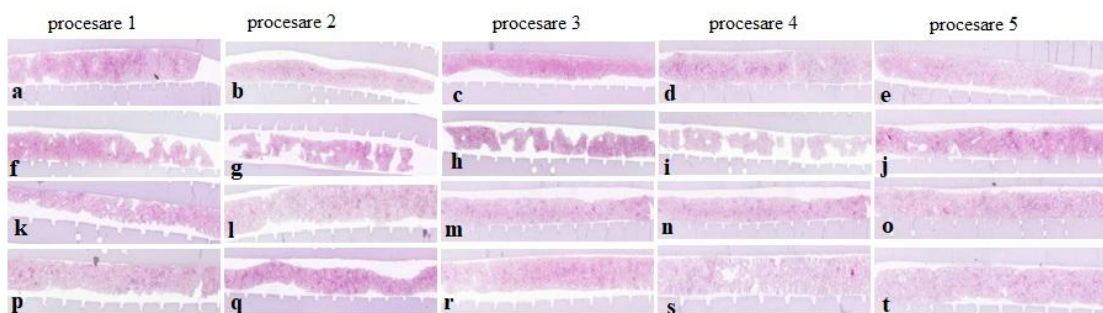


Figura 6.16. Impactul buretelui histologic asupra biopsiei și a intensității colorației hematoxină – eozină. . a-e: fără burete histologic, f-j: burete A, k-o: burete C, p-t: burete B. Scanare cu obiectiv 20x (Ocus 20, Grundium Oy, Tampere, Finlanda)

### 6.2.7 Colorații imunohistochimice

Concluzia generală este că modificările progresive ale protocolului de procesare generate de deteriorarea soluțiilor de deshidratare (ca urmare a folosirii de bureți histologici) influențează semnificativ intensitatea/calitatea și mai puțin specificitatea imunocolorării, cu consecințe potențial grave asupra acurateții diagnosticului anatomopatologic. Când se compară toate condițiile de testare (3 tipuri de bureți histologici, 4 protoale de procesare), expresia imunohistochimică a colagenului IV scade în intensitate (în special în ceea ce privește membranele bazale tubulare) paralel cu nivelul de degradare al soluțiilor. Această situație este mai pronunțată pentru secțiunile generate din probe de țesut prelucrate cu burete B unde intensitatea colorării specifice este minimă. În aceleași probe se poate observa o creștere progresivă a colorației de fond nespecifice, care, cuplată cu scăderea generală a intensității colorării structurilor identificate pozitiv, poate duce la dificultatea (până la imposibilitatea) diagnosticului microscopic precis. Pe de altă parte, nu se observă diferențe de intensitate în ceea ce privește expresia vimentinei între probele de țesut testate, indiferent de tipul de burete folosit. Ar fi interesant să examinăm acest comportament artefactual al imunoreactivității ca o

funcție a buretelui histologic utilizat în timpul procesării țesuturilor pentru o selecție mai mare de antigene, deoarece se pare că unii epitopi sunt mai sensibili decât alții.

## **CAPITOLUL 7. INFLUENȚA VARIABILELOR PRE-ANALITICE ÎN RETENȚIA SECȚIUNILOR PE LAMA DE MICROSCOP ÎN TIMPUL COLORAȚIILOR IMUNOHISTOCHIMICE**

Influența variabilelor pre-analitice și analitice în analizele imunohistochimie sunt în strânsă legătură, ceea ce înseamnă că un țesut bine fixat și procesat va rezulta în colorații bune, de calitate și specifice. Detașarea secțiunilor în timpul acestor tipuri de colorații (de obicei mai agresive decât colorațiile topografice uzuale) este un accident nedorit, uneori cu consecințe catastrofale (pierderea ireversibilă a unor preparate unice și absolut necesare diagnosticului de precizie) și poate semnală defecte ale etapelor pre-analitice și/sau neglijența operatorului.

În studiul de față ne-am propus să analizăm influența diferiților parametri din etapele pre-analitice asupra detașării accidentale a secțiunilor de parafină de pe lama de microscop în timpul colorației imunohistochimice. Parametrii studiați au fost: tipul de țesut și dimensiunea biopsiei, protocoalele de fixare și procesare, soluțiile de recuperare a antigenului, folosite pentru demascarea imunoreactivității.

Protocoalele de fixare și procesare testate în acest studiu sunt aceleași protocoale care au fost testate în capitolul 5; capitolul de față (capitolul 7) reprezentând o extensie a experimentului inițial unde am testat influența protocoalelor de fixare și procesare asupra cantității de apă reziduală din țesut și asupra calității colorațiilor imunohistochimice. În acest capitol vom studia în amănunt dacă protocoalele de fixare și procesare defectuoase au un rol semnificativ în detașarea secțiunilor de pe lama de microscop în timpul colorațiilor imunohistochimice.

Pentru acest studiu a fost folosit țesut proaspăt de porc. Țesuturile testate au fost de rinichi, ficat, splină, limbă, pancreas, inimă și stomac, de la care au fost prelevate biopsii de 5 mm și supuse protocoalelor de procesare. Pentru a evita variabilitatea interexperimentală toate organele au fost recoltate de la un singur animal.

Pentru reducerea costurilor acestui studiu am folosit matrici de țesut pentru a încorpora mai multe biopsii într-un singur bloc de parafină (tissue microarrays - TMA). Comparativ au fost testate 4 matrici cu cavități de 1 mm și 42 de matrici cu cavități de 3 mm (Figura 7.3).

Toate probele au fost procesate manual, conform cu trei protocoale de fixare: *fixarea A*: 264h la temperatura camerei în 10% NBF; *fixarea B*: 2h la 4 °C și 262h la temperatura camerei în 10% NBF; *fixarea C*: 12h la temperatura camerei fără fixare și 252h la temperatura camerei în 10% NBF urmate de 4 protocoale diferite de procesare (testate la capitolul 5). După procesarea probelor, secționare blocurilor de parafină și etalarea secțiunilor pe lama de microscop, s-au efectuat protocoalele de colorare imunohistochimică și colorare topografică cu hematoxilină – eozină.

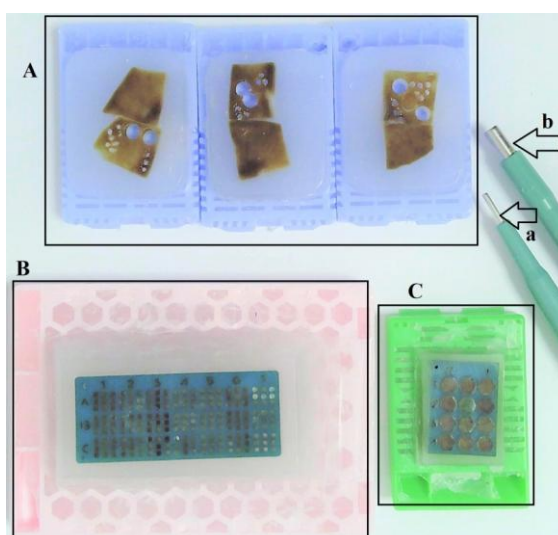


Figura 7.3. (A) Bloc de parafină “donor” cu biopsii de rinichi, (B) bloc de parafină “receptor” cu TMA care are încorporate biopsii de rinichi cu diametrul de 1 mm, (C) bloc de parafină “receptor” cu TMA care are încorporate biopsii de rinichi cu diametrul de 3 mm, (a) producea dermatologică cu diametrul de 1 mm, (b) producea dermatologică cu diametrul de 3 mm

## 7.2. Rezultate

În funcție de dimensiunea biopsiei procentul de detașare sau pliere al secțiunilor de pe lama de sticlă este diferit.

După cum se observă în Tabelul 7.1 secțiunile cu biopsiile de 1 mm diametru s-au detașat și pliat cel mai mult (37% dintr-un număr total de 756 de biopsii) de pe suprafața lamei de sticlă, indiferent de tipul de țesut, de protocolul de fixare sau de protocolul de procesare.

Tabelul 7.1. Procentul de detașare/pliere al secțiunilor în funcție de dimensiunea biopsiei.

Dimensiune biopsie (mm)	Procent total	Procent de pliere / detașare a secțiunii													
		Organ							Fixare			Procesare			
		inimă	rinichi	ficat	pancreas	splină	stomac	limbă	A	B	C	I	II	III	IV
1	37	38	3	22	33	4	57	100	37	32	41	24	48	42	32
3	12	11	1	4	11	0	28	32	9	12	16	14	24	7	6
5	16	8	0	0	17	8	75	0	11	14	21	14	29	14	5

Fixarea țesutului trebuie efectuată cât mai curând posibil, pentru a preveni degradarea țesutului din cauza timpului care se scurge între prelevarea țesutului și fixarea acestuia (ischemia la rece). Rezultatele studiului, ne arată că, indiferent de mărimea biopsiei recoltate, biopsiile la care s-a întârziat fixarea acestora (biopsiile au fost lăsate 12h la temperatura camerei fără fixare și doar apoi au fost fixate la temperatura camerei pentru 252h în 10% NBF) se detașează de pe lama de sticlă, după cum urmează (Tabelul 7.1): în proporție de 21% (biopsii de 5 mm), 16% (biopsii de 3 mm) și 41% (biopsii de 1 mm).

Protocolul de procesare (Tabelul 7.1) influențează de asemenea procentul de secțiuni ce prezintă plieri ale secțiunilor: 48% din secțiuni sunt procesate cu Protocolul II de procesare (5h30minute la RT, soluție clarificare: xilen). Cele mai puține secțiuni pliate (5%) sunt observate la protocolul de Procesare IV (3 zile de fixare la RT, soluție clarificare: *n*-butanol).

La testarea celor trei tipuri de soluții folosite la recuperarea antigenului (tampon Tris-EDTA (pH=9); tampon citrat (pH=6), tampon EDTA (pH=8), am observat că cele mai multe biopsii se pierd (12%) dacă se folosește Tris-EDTA (pH=9) pentru antigen retrieval, iar în ceea ce privește tipul de țesut, cele mai instabile sunt limba (32%) și stomacul (28%).

## CAPITOLUL 8. ANALIZA DE COST ÎN LABORATORUL DE HISTOLOGIE: TMA VS METODA CLASICĂ

Dispozitivele medicale de diagnostic in vitro dezvoltate în laboratorul de cercetare Themis Pathology (Voluntari, Ilfov, România) se bazează pe o serie de tehnologii brevetate de microarray de țesuturi și au ca scop multiplexarea probelor de țesut pentru obținerea de rezultate rapide și economice.

În studiul de față, a fost dezvoltată o matrice suport secționabilă, personalizată în funcție de numărul de probe de analizat, sub forma a trei modele diferite pentru a permite încorporarea, fuziunea și multiplexarea probelor de țesut utilizate în experimente. În acest capitol este descrisă metoda de obținere a matricilor secționabile, urmată de o analiză a costurilor implementării acestei tehnologii în laboratorul de histologie. Material biomimetic a fost achiziționat de la firma producătoare Themis Pathology S.R.L (Voluntari, Ilfov, România) și a fost utilizat pentru generarea de matrici de țesut parafinat personalizate. Proprietățile acestui material a permis fixarea în 10% NBF, deshidratarea în concentrații crescătoare de etanol, clarificarea cu un solvent de tranziție și infiltrarea cu parafină.

Materialul rezultat a fost gravat cu un laser Speedy 300 (Trotec Laser GmbH, Austria) în forma dorită:

- Modelul 1: suport (50 mm lungime × 37 mm lățime × 2 mm grosime) cu 28 de cavități rotunde cu diametrul de 6 mm create prin gravare cu laser (în care vor fi introduse țesuturile). Matricile rezultate au fost folosite în studiul din capitolul 5.
- Modelul 2 : suport cu dimensiunea de 22 × 15 × 2 mm și 12 cavități hexagonale cu diametrul de 3 mm. Matricile rezultate au fost folosite în studiul din capitolul 7.
- Modelul 3 de matrice (41 × 18 × 2 mm) cu 189 de cavități rotunde cu diametrul de 1 mm. Matricile rezultate au fost folosite în studiul din capitolul 7.

Pentru analiza de cost s-au luat în calcul manopera și consumabilele utilizate după procesarea probelor, pentru obținerea blocurilor convenționale față de obținerea blocurilor “receptor” care conțin matricile de țesut. Studiul include costurile care apar după pregătirea blocurilor “donor”: costul matricei personalizate, toate consumabilele folosite pentru obținerea lamelor din blocul “donor” și “receptor” și timpul necesar histotehnologului să obțină lamele colorate cu hematoxilină - eozină.

Costul matricei este costul total și include materialul biomimetic, soluțiile folosite pentru procesare și gravarea cu laserul.

Costul include, de asemenea, cheltuielile de laborator (pe baza prețurilor medii de piață a consumabilelor din 2022 și a salariilor din 2022) dar nu include timpul pe care patologul îl petrece pentru analiza lamelor. În funcție de organ și patologie, citirea lamelor poate dura de la câteva secunde atunci când patologul caută prezența unui marker, sau câteva minute când caută anomalii discrete ale celulelor.



Tabel 8.8. Costul total al serviciilor histopatologice: convențional versus multiplexare

Etapă	Model 1 de matrice		Model 2 de matrice		Model 3 de matrice	
	Convențional 196 blocuri	7 TMA x 28 de cavități	Convențional 504 blocuri	42 TMA x 12 cavități	Convențional 756 blocuri	4 TMA x 189 cavități
COST TOTAL CONSUMABILE	380.6	135.21	1646.48	764.44	2419.92	84.85
COST TOTAL MANOPERĂ	356.39	82.15	916	354	1375	267
COST TOTAL (RON)	736.99	217.37	2562.90	1118.51	3794.55	352.20
Scădere procentuală	71		56		91	

Metoda de multiplexare accelerează semnificativ prepararea și examinarea preparatelor histologice, la un cost mai mic, deoarece permite analiza simultană a mai multor probe pe o singură lamă. Reducerea costurilor în laboratorul de histologie atunci când sunt folosite matrici secționabile de țesut este considerabilă. În funcție de modelul folosit, costul total al serviciilor histologice poate fi redus cu până la 91% (Tabel 8.8).

Chiar dacă transferul biopsiilor din blocurile “donor” în blocurile “receptor” este o etapă care necesită foarte mare atenție și o foarte bună trasabilitate a probelor, blocul de parafină receptor cu matrice de țesut cu un design predefinit asigură o trasabilitate superioară, iar blocurile pot fi stocate perioade lungi pentru validări ulterioare.

Nu în ultimul rând, un aspect foarte important este faptul că folosirea de TMA în laboratoarele de diagnostic face posibilă reducerea spațiului de depozitare a blocurilor de parafină și a lamelor histologice, o reală problemă în momentul de față în toate laboratoarele și țările lumii, deoarece legislația prevede păstrarea lor în siguranță între 20 și 30 de ani.

## PARTEA A TREIA – APLICAȚII

### CAPITOLUL 9. IMPLEMENTAREA PROTOCOLULUI DE PROCESARE CU *n*-BUTANOL ÎN TESTE PRECLINICE CE NECESITĂ EXAMEN MORFOPATOLOGIC

Componenta preclinică a lucrării prezintă rezultatele obținute în două studii preclinice în care a fost implementat protocolul de procesare care a oferit cele mai bune rezultate (protocolul cu *n*-butanol, timp de 3 zile la temperatura camerei) și a matricilor de țesut (TMA).

Procolul IV de procesare este realizat la temperatura camerei, timp de 61 h, utilizează *n*-butanol ca agent de clarificare și oferă cele mai bune rezultate în ceea ce privește cantitatea de apă reziduală din probele de țesut parafinate și implicit colorații topografice și imunohistochimice mai bune. Primul studiu a fost efectuat pentru testarea a două medicamente antiinflamatoare nesteroidiene (NSAIDs) iar al doilea studiu pentru testarea produselor din gama Imunoinstant (Compania Romvac, Voluntari, România), o sursă de anticorpi pentru imunoterapie.

Pentru ambele studii au fost folosite matrici de țesut pentru multiplexarea probelor cu scopul de a asigura indexarea și trasabilitatea probelor. Totodată, folosirea de matrici de țesut ajută la reducerea consturilor în laboratorul de histologie, la reducerea timpului de citire al lamelor și scade variabilitatea interexperimentală în ceea ce privește colorarea imunohistologică.

Primul studiu (testarea medicamentelor anti-inflamatoare într-un model experimental de psoriazis) s-a făcut pe șoareci, aplicând o cremă cu aceste medicamente pe suprafața cozii timp de două săptămâni.

Psoriazisul este o boală caracterizată prin diminuarea sau dispariția stratului granular al pielii în urma diferențierii aberante a keratinocitelor. Medicamentele nesteroidiene cu efect antiinflamator sunt folosite în dermatologie datorită efectului inhibitor asupra enzimei cyclooxygenaza-2 cu rol în stimularea proliferării aberante a keratinocitelor [115, 116].

Medicamentele nesteroidiene folosite în acest studiu sunt diclofenac (acid 2-[2-(2,6-dicloranilino)fenil] acetic) și celecoxib (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluormetil)pirazol-1]benzensulfonamidă) în diferite concentrații, pentru a vedea dacă o inhibare mai mare a cyclooxygenazei-2 ar însemna o creștere a stratului granular epidermic [115, 116, 117, 118].

Testele au fost realizate în colaborare cu Departamentul de Farmacologie și Farmacoterapie, din cadrul Facultății de Medicină “Carol Davila” din București.

Al doilea studiu a constatat în investigații imunohistologice la șoareci C57BL/6, cărora li s-a administrat oral emulsie de ou hiperimun și complexe de imunoglobuline Y. Aceste produse provin de la găini tratate cu un amestec de antigene special preparate și conțin imunoglobuline Y, lizozim, ovotransferină etc. [119, 120].

Produsele dezvoltate și comercializate de Romvac Company S.A sub brand-ul IMUNOINSTANT testate în acest studiu: Oul hiperimun, Imunoinstant G, Imunoinstant multiplu (soluție apoasă).

## 9.2. Rezultate

### Studiul 1:

În Tabelul 9.2 se poate observa o diferență semnificativă a gradului de ortokeratoză între grupul control negativ (șoareci netratați) și grupurile tratate cu celecoxib, diclofenac și tretinoină (control pozitiv). Concentrațiile diferite de celecoxib duc la o creștere a gradului de ortokeratoză în relație directă cu concentrația medicamentului.

Tabel 9.2. Efectul substanțelor testate este exprimat ca grad de ortokeratoză (procente), grosimea medie a epidermei ( $\mu\text{m}$ ) și activitatea procentuală a medicamentului

Lot de șoareci	Grad de ortokeratoză (%)	Grosime medie a epidermei ( $\mu\text{m}$ )	Activitate medicament (%)
Șoareci netratați	17.7 $\pm$ 1.81	24.77 $\pm$ 1.81	-
Șoareci tratați doar cu parafină	19.64 $\pm$ 3.2	29.76 $\pm$ 2.02	0
Tretinoină 0.05%	48.72 $\pm$ 6.09	33.22 $\pm$ 2.1	36.19
Diclofenac 1%	42.24 $\pm$ 13.73	28.42 $\pm$ 2.62	28.12
Diclofenac 2%	41.42 $\pm$ 8.17	27.38 $\pm$ 2.75	27.1
Celecoxib 1%	42.15 $\pm$ 7.28	28.07 $\pm$ 2.37	28.01
Celecoxib 2%	56.48 $\pm$ 11.33	32.28 $\pm$ 6.18	45.84
Celecoxib 4%	71.64 $\pm$ 3.43	31.66 $\pm$ 3.58	66.56
Celecoxib 8%	75.06 $\pm$ 3.37	33.43 $\pm$ 3.69	70.59

Inducerea diferențierii epidermice, ca marker al gradului de ortokeratoză, a fost în următoarea ordine: celecoxib 8% > celecoxib 4% > celecoxib 2% > tretinoin 0,05% >

diclofenac 1% > celecoxib 1% > diclofenac 2% > parafină moale albă > șoareci netratați. Efectul celecoxib 8% asupra gradului de ortokeratoză este superior efectului tretinoinului. Activitatea procentuală a medicamentului a fost cea mai mare pentru celecoxib 8% (70.59%) (vezi Tabel 9.2).

Protocolul IV (care folosește *n*-butanol ca agent de clarificare) ajută la obținerea de blocuri histologice de calitate superioară, stabile în timp (nu se formează depresiuni pe suprafața blocului, țesutul este complet fuzionat cu parafina, secționarea este fără probleme, obținându-se cu ușurință panglici la sectionare, rată mare de retenție a secțiunilor pe lama de sticlă indiferent de colorația histologică realizată, etc.). Acest protocol de procesare a fost selectat pentru a facilita o măsurătoare ușoară și precisă a stratului granular (adică gradul de ortokeratoză).

### **Studiul 2:**

Rezultatele studiului au aratat ca produsele din gama Imunoinstant care conțin imunoglobulina Y sunt eficiente și induc un răspuns imun în funcție de tipul de produs, doză și timpul de administrare. Analizele efectuate la timpi diferiți de recoltare a probelor de ser (T1 – 30 de zile, T2 – 60 de zile, T3 – 90 de zile) au arătat o creștere semnificativă a interleukinelor, ce au rolul principal de a activa celulele efectoare în timpul răspunsurilor inflamatorii și imune.

După 30 de zile de administrare a suplimentelor se observă o creștere a următoarelor interleukine:

**Lotul A:** IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17A, GM-CFS, IFN-G, TNF $\alpha$ .

**Lotul B:** IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, G-CFS, GM-CFS, TNF $\alpha$ , Eotaxin, IFN-G, MIP-1a, IL-33.

**Lotul C:** IL-10, Eotaxin, IL-23, IL-33.

**Lotul D:** IL-2, IL-3, IL-10, IL-12, IL-17A, Eotaxin, IL-17F, IL-25, IL-27, IL-31, IL-23, IL-33.

După 60 de zile de administrare a suplimentelor se observă o creștere a următoarelor interleukine:

**Lotul A:** TNF $\alpha$ .

**Lotul B:** IL-2, MIP-1a, Rantes, IL-22, IL-31.

**Lotul C:** IL-17A, GM – CFS, IFN-G, MIP-1a, Rantes, IL-22, IL-31.

**Lotul D:** Rantes.

După 90 de zile de administrare a suplimentelor se observă o creștere a următoarelor interleukine:

**Lotul A:** IL-17A, Eotaxin, GM-CFS, IFN-G, IL-22. L.

**Lotul B:** IL-2, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, G-CFS, GM-CFS, TNF $\alpha$ , IFN-G, IL-25, IL-27.

**Lotul C:** IL-2, IL-3, IL-4, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, G-CFS, GM-CFS, TNF $\alpha$ , IFN-G, IL-25, IL-22, IL-27.

**Lotul D:** IL-10, IL-22, IL-17F, IL-27, IL-31, MIP-3a.

Protocolul IV de procesare (care folosește *n*-butanol ca agent de clarificare) ajută la obținerea de blocuri histologice bune, care de-a lungul timpului își păstrează calitățile. Chiar și



după câteva luni de la secționarea acestora și expunerea la mediul ambiant din laborator ( $22 \pm 2$  °C, umiditate relativă de 50 – 70 %) nu se observă depresiuni pe suprafața blocului.

Țesutul a fuzionat foarte bine cu parafina și secționarea la microtom este lipsită de dificultate, obținându-se rapid panglici de secțiuni, care permit etalarea imediată a acestora pe lama de sticlă, iar după colorarea cu hematoxină-eozină toate țesuturile rămân pe lamă fără a se desprinde sau fără a se plia.

Folosirea de matrici sectionabile și personalizarea acestora pentru studiul de față a reprezentat un real ajutor în multiplexarea multitudinilor de probe deoarece a redus cheltuielile cu consumabilele folosite și totodată a redus timpul necesar de pregătire a materialelor și a colorațiilor histologice și a eliminat practic variabilitatea interexperimentală făcând posibilă imunocolorarea unui număr foarte mare de probe individuale într-un singur lot.

## CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat și-a propus atât investigarea unor variabile pre-analitice (tipul de țesut, protocolul de fixare, protocolul de procesare, bureții histologici) asupra calității probelor de țesut pentru Anatomia Patologică cât și dezvoltarea unui protocol optim de procesare a țesuturilor care să păstreze optim structura și compoziția moleculară a organului/structurii din care face parte. În acest scop au fost urmărite patru mari direcții de cercetare:

### *1. Determinarea apei reziduale din preparatele histologice (din probele de țesut și din soluțiile de procesare folosite)*

Studiile realizate în cadrul acestei direcții de cercetare au condus la următoarele concluzii:

- Cantitatea de apă reziduală din probele de țesut poate fi redusă semnificativ prin utilizarea în protocolul de procesare a unui agent de clarificare care este miscibil atât cu apa cât și cu parafina (solvenții universali, cum este *n*-butanolul);
- S-au obținut blocurile de parafină de calitate mai bună folosind un protocol mai lung cu *n*-butanol pentru a completa deshidratarea țesutului;
- Protocolul cu *n*-butanol poate fi folosit chiar și pentru procesarea țesuturilor “capricioase” (țesut testicular);
- Protocolul care utilizează *n*-butanol ca agent de clarificare oferă cele mai bune rezultate în ceea ce privește cantitatea minimă de apă reziduală din țesut, ceea ce permite obținerea de colorații morfologice și imunohistochimice mai bune;
- Rezultatele obținute în urma analizei termogravimetrice ne-au arătat că probele care folosesc ca agent de clarificare *n*-butanolul, conțin cele mai mici cantități de apă reziduală:  $0.011 \pm 0.001\%$  vs  $0.04 \pm 0.004\%$ , în cazul valorilor obținute la clarificarea cu xilen ( $p < 0.05$ , valorile sunt semnificative).
- Analizele statistice confirmă că Protocolul IV de procesare (cu *n*-butanol) oferă cele mai bune rezultate când vine vorba de extracția apei din țesut, ceea ce înseamnă că protocolul de procesare și parametrii de extracție a apei din țesut (tipul solventului/concentrația și numărul etapei de extracție) au avut un efect semnificativ ( $p < 0,05$ ) asupra raportului de masă a apei;
- O infiltrare necorespunzătoare a parafinei în țesut pentru probele procesate cu protocoalele I și II (cu xilen) a fost confirmată și de artefactele care au apărut în

timpul colorației hematoxilină – eozină: țesutul s-a desprins de pe lama de microscop sau s-a pliat în timpul protocolului de colorare;

- Studiul de față demonstrează că *n*-butanolul poate fi folosit ca agent de clarificare în locul xilenului, deoarece acesta continuă să extragă ultimele urme de apă din țesut pe toată durata etapei de clarificare.

## 2. *Influența bureților histologici în timpul protocoalelor de procesare a probelor de țesut*

În cadrul acestei direcții de cercetare au fost studiate comparativ trei tipuri de bureți histologici care se folosesc în mod uzual în laboratoarele de histologie. Studiile realizate au condus la următoarele concluzii:

- Buretele histologic folosit în timpul protocoalelor de fixare și procesare a biopsiilor a avut o influență majoră asupra degradării/contaminării soluțiilor folosite cât și asupra biopsiilor;
- Proprietatea bureților histologici de a absorbi și a reține apă este determinată de porozitatea și structura acestora (gradul de reticulare). Bureții histologici cu porozitate mare și implicit pori mai mici (70 – 100 ppi) au creat cele mai multe probleme, transportând apa din soluția de fixare și țesut de la un recipient la altul al procesatorului;
- Buretele A (40 – 50 ppi) și buretele C (55 – 65 ppi) rețin mai puțină apă (5 %, respectiv 20 %) și implicit solvent, ceea ce face ca drenarea lichidelor din porii acestora să se facă mai rapid, spre deosebire de buretele B (70 – 100 ppi) care reține până la 30 % apă;
- Folosirea acelorași soluții de-a lungul mai multor protocoale de procesare determină o schimbare semnificativă a concentrației din cauza aportului de apă adus de țesut și de bureții histologici, ceea ce provoacă efectiv o schimbare a protocolului inițial. Dacă inițial concentrația primului alcool era de 64.5%, după 5 zile de procesare cu același alcool, aceasta a scăzut la 15%, atunci când se folosește burete histologic B. În aceste circumstanțe, de fapt, fiecare rundă de procesare a țesuturilor va folosi în realitate un protocol diferit, care se depărtează din ce în ce mai mult de procedura prevăzută, generând rezultate din ce în ce mai rele în ceea ce privește colorarea și morfologia țesuturilor procesate;
- Pe măsură ce soluțiile de procesare se degradează secțiunile devin tot mai palide și se pierd detaliile nucleare;
- Intensitatea colorației hematoxilină – eozină scade pe măsură ce crește cantitatea de apă din soluțiile de procesare. De exemplu, după prima procesare (concentrație de 59% în primul alcool) colorația este puțin mai intensă decât după ultima procesare (concentrație de 44% în primul alcool) unde este neuniformă și mai puțin intensă, în cazul biopsiilor procesate fără burete histologic. Totuși, această degradare a afinității tinctoriale (intensitate mai mică, dar și inegalitate a colorației) este mai pronunțată și apare încă din a doua rundă de procesare a țesuturilor, când biopsiile au fost procesate cu burete histologic.
- Schimbarea protocolului de procesare influențează semnificativ calitatea și specificitatea colorațiilor imunohistochemice, cu consecințe potențial grave asupra acurateții diagnosticului anatomopatologic.

### *3. Retenția secțiunilor pe lama de microscop*

În studiul de față ne-am propus să analizăm influența diferiților variabile pre-analitice asupra detașării accidentale a secțiunilor de pe lama de microscop în timpul colorației imunohistochimice. Parametrii studiați au fost: tipul de țesut și dimensiunea biopsiei, protocoalele de fixare și procesare, soluțiile de recuperare a antigenului. Studiile realizate au condus la următoarele concluzii:

- Protocoalele de fixare și procesare trebuie adaptate la tipul de țesut. Secțiunile de stomac și limbă s-au detașat în proporția cea mai mare indiferent de dimensiunea biopsiei;
- Fixarea țesutului trebuie efectuată cât mai curând posibil, pentru a preveni degradarea țesutului din cauza timpului care se scurge între prelevarea țesutului și fixarea acestuia. Rezultatele studiului, ne arată că, indiferent de mărimea biopsiei recoltate, biopsiile la care s-a întârziat fixarea acestora (biopsiile au fost lăsate 12h la temperatura camerei fără fixare și doar apoi au fost fixate la temperatura camerei pentru 252h în 10% NBF) se detașează de pe lama de sticlă, după cum urmează: în proporție de 21% (biopsii de 5 mm), 16% (biopsii de 3 mm) și 41% (biopsii de 1 mm);
- Rezultatele nesatisfăcătoare obținute în cazul probelor procesate cu protocolul II (protocol de 5 ore și 30 de minute, la temperatura camerei și care folosește ca agent de clarificare xilenul) sugerează că țesutul nu este deshidratat corespunzător, ceea ce determină ca secțiunile să se detașeze de pe lama de sticlă atunci când sunt aplicate tratamente imunohistochimice mai dure de anatomie patologică. Folosirea de *n*-butanol în loc de xilen (Protocoalele III și IV) facilitează continuarea/completarea deshidratării și în timpul etapei de clarificare și rezultă în blocuri de parafină de calitate mai bună și o aderență și reziliență superioară a secțiunilor de parafină pe lama de microscop;
- Datele experimentale prezentate în acest capitol sugerează că protocoalele de procesare nepotrivite sunt cauza principală a desprinderii secțiunii de pe lama de sticlă, după cum urmează: 29% (biopsii de 5 mm), 24% (biopsii de 3 mm) și 48% (biopsii de 1 mm).

### *4. Analiza de cost în laboratorul de histologie: TMA vs metoda clasică*

În studiul de față a fost dezvoltată o matrice secționabilă suport care a permis înglobarea, fuzionarea și multiplexarea probelor de țesut. Matricea a fost personalizată în funcție de numărul de probe de analizat și a fost utilizată în experimentele din această teză. Pentru a analiza eficiența implementării acestei metode în laboratoarele de histologie s-a făcut o analiză de cost, iar studiul a condus la următoarele concluzii:

- Metoda de multiplexare accelerează semnificativ prepararea și examinarea preparatelor histologice, la un cost mai mic, deoarece permite analiza simultană a mai multor probe pe o singură lamă;
- Reducerea costurilor în laboratorul de histologie atunci când sunt folosite matrici secționabile de țesut este considerabilă. În funcție de modelul folosit, costul total al serviciilor histologice poate fi redus cu până la 91%;

- Matricea de țesut receptor cu un design predefinit asigură o trasabilitate superioară, iar blocurile pot fi stocate perioade lungi pentru validări ulterioare;
- Folosirea de TMA în laboratoarele de diagnostic face posibilă reducerea semnificativă a spațiului de depozitare a blocurilor de parafină și a lamelor histologice.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE

Obiectivul general al tezei de doctorat a fost studiul fizico-chimic al probelor de țesut și impactul variabilelor pre-analitice în Anatomia Patologică. În continuare sunt prezentate o serie de elemente de originalitate din cadrul acestei teze de doctorat:

1. Determinarea conținutului de apă din proba de țesut în diferite etape ale procesării, prin echilibrarea probelor cu solvenți universali și determinarea cantității de apă din solvent;
2. Determinarea conținutului de apă fluctuantă în țesutul parafinat prin expunerea acestuia la cicluri de umiditate – uscare și cântărirea cu o balanță analitică de mare precizie;
3. Determinarea conținutului de apă din țesuturile parafinate prin termogravimetrie;
4. Cuantificarea extracției apei din țesut în diferite etape de procesare;
5. Evidențierea faptului că agentul de clarificare folosit în protocolul de procesare are cel mai pronunțat efect asupra cantității de apă remanentă în proba de țesut, în acest caz *n*-butanolul care este miscibil atât cu apa cât și cu parafina completează etapa de deshidratare și în același timp pregătește țesutul pentru infiltrarea cu parafină oferind cele mai bune rezultate;
6. Demonstrarea în premieră a influenței negative a bureților histologici asupra soluțiilor de procesare și implicit asupra probelor de țesut, prin transportul de apă de la o soluție la alta;
7. Inconsecvența în protocoalele de procesare are ca și consecință rezultate diferite în ceea ce privește colorațiile topografice sau imunohistochimice;
8. Demonstrarea faptului că atunci când sunt folosite protocoale de fixare și de procesare nepotrivite secțiunile se detașează de pe lama de sticlă;
9. Propunerea de matrici sectionabile de țesut personalizate din probele parafinate ca instrumente de diagnostic;
10. Analiza costurilor în laboratorul de histologie atunci când sunt folosite matrici sectionabile personalizate de țesut. În funcție de modelul folosit, costul total al serviciilor histologice poate fi redus cu până la 91%.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [5] *Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM.*, A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen?. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138 (11), 1520-30.
- [23] *Gabe M.*, *Histological techniques*. Springer-Verlag, New York, 1976, 70-127.
- [52] *Xie R., Chung J.Y., Ylaya K., Williams R.L., Guerrero N., Nakatsuka N., Badie C., Hewitt S.M.*, Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59(4), 356-365.
- [53] *Grillo F., Bruzzone M., Pigozzi S., Prosapio S., Migliora P., Fiocca R., Mastracci L.*, Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date?. *J Clin Pathol*, 2017, 70(11), 988-993.

- [54] *Lerch M.L., Bauer D.R., Chafin D., Theiss A., Otter M., Baird G.S.*, Precision Medicine Starts with Preanalytics: Real-Time Assessment of Tissue Fixation Quality by Ultrasound Time-of-Flight Analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2017, 25(3), 160-167
- [58] *Reinoso R.F., Telfer B.A., Rowland M.*, Tissue water content in rats measured by desiccation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. Oct 1997, 38(2):87-92. doi: 10.1016/s1056-8719(97)00053-1. PMID: 9403779.
- [115] *Nițescu D.A., Păunescu H., Ștefan A.E., Coman L., Georgescu C.C., Stoian A.C., Gologan D., Fulga I., Coman O.A.*, Anti-Psoriasis Effect of Diclofenac and Celecoxib Using the Tail Model for Psoriasis. *Pharmaceutics*. Apr. 2022, 14(4):885. doi: 10.3390/pharmaceutics14040885. PMID: 35456720; PMCID: PMC9025614.
- [116] *Nitescu D.A., Paunescu H., Gologan D., Mihai A., Stoian A.C., Coman O.A.*, The Effect of Topical Celecoxib as an Anti-Psoriasis Agent. *Maedica (Bucur)*. Dec. 2022, 17(4):805-811. doi: 10.26574/maedica.2022.17.4.805. PMID: 36818260; PMCID: PMC9923066.
- [117] *Paichamnan S., Ovatlarnporn C., Klinpituksa P.*, Method for quantitative determination of diclofenac in chitosan microspheres and chitosan films by HPLC–UV and UV spectroscopic methods. *Der Pharma Chemica*, 2014, 6(6):279-284.
- [118] *Reddy V.B.A., Venugopal N., Madhavi G.*, A selective and sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of twopotential genotoxic impurities in celecoxib. *J Anal Sci Technol*. 2014, 5, 18. <https://doi.org/10.1186/s40543-014-0018-1>.
- [119] *Chiurciu C.* Imunoglobulina Y – valențe biologice și utilizări terapeutice. PhD Thesis, Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București, 2019.
- [120] Imunoinstant. Disponibil online: <https://imunoinstant.imunoinstant.ro/#> (accesat pe data 30.08.2023).

## DISEMINAREA REZULTATELOR

Rezultatele tezei de doctorat au fost diseminate prin prezentarea la o conferință internațională, publicarea a 8 articole în reviste cotate ISI și 2 articole indexate și un articol trimis în vederea publicării.

### Publicații

1. Ștefan A. E., **Gologan D.**, Leavitt M. O., Mușat S., Pleșea I. E., Stan R., Pleșea R. M., Militaru M. **2020**. *Tissue MicroArrays, brief history, techniques and clinical future*. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 61(4), 1077–1083. [**FI**<sub>2020</sub> = **1.033**]
2. Ștefan A. E., **Gologan D.**, Mușat S., Stan R., Sanda C. A., Militaru M. **2021**. *Biomimetic matrices for histological processing*. *Revista Română de Medicină Veterinară*, 31(3), 12–16. [**FI** = **0**]
3. **Gologan D.**, Ștefan A. E., Stan R., Militaru M., Mușat S. **2021**. *Factors influencing the quality of formaldehyde fixed paraffin embedded tissue samples – Review*. *Revista Română de Medicină Veterinară*, 31(4), 87–92. [**FI** = **0**]
4. Nițescu D. A., Păunescu H., Ștefan A. E., Coman L., Georgescu C., Stoian A. C., **Gologan D.**, Fulga I., Coman O. A. **2022**. *Anti-Psoriasis Effect of Diclofenac and Celecoxib Using the Tail Model for Psoriasis*. *Pharmaceutics*, 14(4), 885-895 [**FI**<sub>2022</sub> = **5.4**]
5. Nitescu D.A., Paunescu H., **Gologan D.**, Mihai A., Stoian A.C., Coman O.A. **2022**. *The Effect of Topical Celecoxib as an Anti-Psoriasis Agent*. *Maedica (Bucur)*, 17(4):805-811. [**FI** = **0**]

6. Ștefan A. E., **Gologan D.**, Nițescu D. A., Mușat S., Stan R., Sanda C. A., Arjan S., Militaru M. **2023**. *Pre-processed TMA biomimetic material – applications and benefits*. Revista Română de Medicină Veterinară, 33(1), 26 – 32. [FI = 0.2]
7. **Gologan D.**, Ștefan A. E., Militaru M., Sanda C. A., Arjan S., Mușat S., Leavitt M. O., Stan R. **2023**. *Quality Assurance and Cost Reduction in Histopathology Laboratories Using Tissue Microarrays*. Veterinary Sciences, 10, 280 [FI<sub>2023</sub> = 2.518]
8. **Gologan D.**, Ștefan A. E., Militaru M., Sanda C. A., Arjan S., Stoleriu Ș., Mușat S., Stan R. **2023**. *The influence of clarifying agents on residual water content in paraffin embedded tissue samples*. UPB Sci. Bull. Series B, Vol. 85, Iss.3. [FI<sub>2023</sub> = 0.5]
9. Ștefan A. E., **Gologan D.**, Mușat S., Leavitt M. O., Stan R., Militaru M. **2023**. *Cost analysis of tissue microarrays for clinical diagnostic*. Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. Vol. LXIX (2), 162-168. [FI = 0]
10. Ștefan A. E., Mușat S., **Gologan D.**, Sanda C. A., Stan R., Rizac R., Militaru M. **2023**. *Educational tissue arrays for veterinary medicine*. Revista Română de Medicină Veterinară, 33(3), 36-40. [FI = 0.2]
11. Nastasă V., Minea B., Pasca S. A., Bostanaru-Iliescu A. C., Ștefan A. E., **Gologan D.**, Chiurciu V., Foia L. G., Mareș M. *Long-term oral administration of egg-based food supplements containing IgY induces local and systemic immune responses in C57BL/6 mice*. **Trimis la revistă pentru review.**

#### Comunicări

1. Ștefan A. E., **Gologan D.**, Mușat S., Leavitt M. O., Stan R., Militaru M. **2023**. *Cost analysis of tissue microarrays for clinical diagnostic*. International Conference „Agriculture for Life, Life for Agriculture” Bucharest, Romania; 08 – 09 June (2023).