

REZUMAT

EVALUAREA ȘI STANDARDIZAREA METODELOR FOLOSITE PENTRU CREAREA PREPARATELOR HISTOLOGICE MULTIPLEX TISSUE MICROARRAY

Doctorand: ȘTEFAN Alina Elena

Conducător științific: *Prof. univ.Dr. MILITARU Manuella*

CUVINTE CHEIE: BxChip™, BxFrame™, diagnostic clinic, histologie, material biomimetic, matrici sectionabile, tissue microarray

Tehnica de multiplexare a mai multor blocuri de parafină "donor" într-un singur bloc de parafină "receptor" poartă denumirea de "tissue microarray" (TMA). Scopul ce a stat la baza utilizării acestei tehnici de multiplexare a fost compararea mai multor țesuturi diferite pe o singură lamă histologică într-un mod rentabil, economisind forța de muncă și reducând consumabilele, asigurând avantajele condițiilor de colorare în mod egal tuturor specimenelor inserate și posibilitatea de a urmări cu ușurință identitatea fiecărui specimen. Numărul specimenelor ce pot fi multiplexate într-un singur bloc de parafină receptor pot să varieze între 2 și 10000, iar mărimea acestora între 0.1 mm și 5 mm. Specimene ce pot fi multiplexate într-un TMA sunt: celule (din efuzii), linii celulare și țesuturi (biopsii cilindrice din ace de biopsie sau specimene de rezecție).

Secțiunile histologice rezultate din blocurile de parafină TMA sunt utilizate în multe categorii de analize (imunohistochimie, hibridizare in situ, histochimie etc.) și au dovedit în multiple teste că aceste matrici sunt reprezentative pentru țesuturile din blocurile donor chiar dacă sunt de dimensiuni mici. Tehnica este baza de temelie pentru experimente din diferite domenii de cercetare deoarece rezultatele obținute pot fi transmise către aplicațiile clinice.

Metodele internaționale curente de obținere a blocurilor de parafină TMA utilizează exclusiv blocuri de parafină donor colectate din spitale sau centre de cercetare, iar zonele de interes sunt adesea fragmente cilindrice parafinate. Tehnica de obținere a blocurilor de parafină TMA este dificilă, lentă și adesea blocurile de parafină donor sunt compromise. Pentru fuzionarea fragmentelor cilindrice cu parafina din blocul receptor, ansamblul creat trebuie încălzit și răcit în mod repetat, iar acest proces poate degrada ținutele moleculare de interes. Întrucât blocurile donor utilizate la obținerea preparatelor TMA au o variabilitate foarte mare a metodelor pre-analitice, eficacitatea diagnosticelor rezultate este foarte scăzută. De aceea optim ar fi ca țesuturile de interes să fie multiplexate înainte de procesele histologice.

PRIMA PARTE A TEZEI este reprezentată de **STUDIUL BIBLIOGRAFIC**, redactată în aproximativ 40 de pagini și cuprinde următoarele subiecte țință: generalități și aplicații ale tehnicii TMA (**CAPITOLUL I**), tehnici de obținere a blocurilor TMA (**CAPITOLUL II**) și imunohistochimie aplicată pe TMA (**CAPITOLUL III**).

Capitolul I descrie metoda convențională unde probele de țesut sunt extrase din blocuri de parafină "donor" arhivate (până la 1000 de blocuri diferite) fiind apoi introduse într-un bloc de parafină "recipient". Tot în acest capitol este descris și modelul matricial în care sunt aranjate fragmentele tisulare ce a permis trasabilitatea datelor clinice către piesele individuale de țesut, sunt clasificate tipurile de TMA (TMA din țesuturi normale, TMA din țesuturi experimentale, TMA progresive etc), sunt detaliate aspectele calitative ce stau la baza unui TMA (calitatea țesutului, a diagnosticului patologic, calitatea procedurii experimentale, calitatea datelor clinice) precum și caracterul reprezentativ al tehnicii (mărimea piesei scoasă din blocul donor,

numărul de fragmente de țesut necesare în construirea unui TMA, diametrul optim pentru un fragment de țesut recoltat dintr-un bloc donor etc).

Capitolul II relatează în detaliu cele mai importante și diferite metode pentru construcția de TMA în ordine cronologică. În anul 2014 Ulrich Vogel a centralizat toate aceste metode, începând cu prima descriere a unui TMA din anul 1965 și finalizând cu menționarea a cinci tehnici diferite de obținere a unui TMA din anul 2013. Tehnica TMA la care se face referire cel mai des în istoria obținerii TMA-urilor este cea folosită de H. Battifora, în anul 1986, care a obținut un bloc de țesuturi multitemorale pentru testarea de noi anticorpi pentru imunohistochimie. La încheierea capitolului este descrisă o tehnică nouă de obținere a TMA-urilor, însă pentru prima dată în istoria tehnicii, aceasta are aplicabilitate exclusivă în obținerea de diagnostice clinice. Această tehnică are la bază o matrice secționabilă (BxChip™) compusă dintr-un material biomimetic cu proprietăți reglabile special concepută pentru multiplexarea biopsiilor de diametre mici cilindrice (20G, 18G, 16G, 14G, 12G etc.) împiedicând fragmentarea sau pierderea lor pe parcursul procesului histologic.

Capitolul III expune metodologia standard a tehnicii de imunohistochimie și dezvoltă pe larg potențialii factori ce pot compromite calitatea colorărilor: factori de țesut (fixare, procesare), factori dependenți de solvenți și reactivi (temperatura, soluții tampon și diluanți), factori de procedură (condițiile de păstrare a blocurilor de parafină și a lamelor histologice).

A DOUA PARTE A TEZEI este reprezentată de **CERCETĂRI PROPRII** și începe cu scopul și obiectivele generale propuse, urmată apoi de patru capitole: caracteristicile materialului secționabil (**CAPITOLUL IV**), matricea biomimetică BxFrame™ (**CAPITOLUL V**), utilitate comparativă și tehnici histochimice de colorare (**CAPITOLUL VI**), matricea biomimetică BxChip™ (**CAPITOLUL VII**).

Capitolul IV dezvoltă experimentele efectuate pe materialul biomimetic urmărind rezistența a 15 materiale secționabile de consistențe diferite prin imersarea lor în diferite soluții de decalcifiere utilizate de rutină în laboratoarele de patologie (acid formic 10%, acid clorhidric 5% și EDTA 10%) și prin supunerea lor la teste de reologie. După finalizarea duratelor de imersie în soluțiile de decalcifiere, materialele sunt procesate histologic cu un protocol de deshidratare de 9 ore, fiind comparate în cadrul aceluiași protocol cu alte țesuturi: splină, ficat, piele, creier, rinichi, inimă și plămân. Rezultatele sunt delimitate prin aplicarea de calificative (Foarte bine, Bine, Suficient și Insuficient). Tot în prezentul capitol este urmărită conservarea structurală a celor 15 materiale biomimetice prin supunerea lor la protocoale de deshidratare cu durate diferite (Protocol 1 – 4h30min, Protocol 2 – 5h50min, Protocol 3 – 7h, Protocol 4 – 9h, Protocol 5 – 13h). Micșorarea materialelor este observată prin măsurarea acestora în lungime, lățime și înălțime înainte și după efectuarea proceselor de deshidratare.

În **capitolul V** se urmărește dezvoltarea unei noi matrici secționabile, BxFrame™, pentru multiplexarea de țesuturi cu forme neregulate de dimensiuni diferite. În primul subcapitol sunt testate 7 modele de matrici dreptunghiulare cu grosime de până la 3 mm având godeuri prestabilite din diferite forme (godeuri pătrate, rotunde, hexagonale) toate numerotate pentru eficientizarea trasabilității țesuturilor. Aceste matrici sunt testate cu țesuturi de porc (rinichi, ficat, inimă și piele). Datorită acestui experiment cu rezultate promițătoare se stabilește un singur model, BxFrame™ GRID, matrice secționabilă tip plasă însoțită de o bază perforată din același material cu rol de suport la încărcarea biopsiilor. În al doilea subcapitol este dovedită eficiența adusă de BxFrame™ ca timp și costuri de consumabile prin metoda multiplexării în comparație cu un proces histologic uzual. Testarea este efectuată pe un număr limitat de țesuturi: coadă, intestin, creier și inimă de șoarece C57BL/6, piele de porc domestic. Noua metodă de multiplexare scade timpul necesar de lucru pentru același număr de biopsii de trei ori comparativ cu metoda convențională, iar costurile pot fi reduse până la 50%.

Capitolul VI prezintă testarea și utilizarea matricilor BxFrame™ în două stări diferite pe parcursul procesului histologic: în stare crudă, fixată cu formol 4% și în stare pre-deshidratată (cu ajutorul unui protocol de deshidratare lent) și infiltrate cu parafină. Scopul acestui experiment este de a determina posibile avantaje de utilizare a matricilor în funcție de etapa procesului histologic de multiplexare a țesuturilor. Experimentul este efectuat pe cozi de șoarece Albino și descris în primul subcapitol. Testarea a trei colorații histochimice (hematoxilină-eozină, safranină și Fast Green, roșu pricrossirius) pe secțiunile matricilor sunt expuse în al doilea

subcapitol. În subcapitolul trei este pus în evidență rolul matricilor secționabile în domeniul educațional, proiect realizat cu ajutorul catedrei de Anatomie Patologică a Facultății de Medicină Veterinară. Acest proiect a fost realizat cu blocuri de parafină donor de rinichi pentru realizarea unor matrici TMA educaționale.

Ultimul capitol din cadrul tezei, **capitolul VII**, este reprezentat de matricea secționabilă BxChip™ și este compus din două subcapitole. În primul subcapitol este dovedită creșterea randamentului diagnosticului datorită utilizării matricii anterior menționate, prin studiu efectuat în cadrul spitalului clinic “Prof. Dr. Theodor Burghel” din București. Pentru 24 de pacienți au fost recoltate biopsii prin procedura TRUS (Transrectal Ultrasound), din care pentru prima jumătate de pacienți s-a realizat proces histologic uzual, în care biopsiile au fost împăturite în hârtie histologică subțire și supuse procesului de deshidratare și infiltrare cu parafină, iar pentru a doua jumătate biopsiile au fost plasate în matricile BxChip™ urmând apoi același protocol de deshidratare și infiltrare cu parafină. În ambele categorii de pacienți, biopsiile recoltate au fost măsurate înainte și după procesul de deshidratare (biopsii în stare crudă, apoi biopsiile pe lamele histologice). Studiul este finalizat cu menționarea multiplelor avantaje aduse de matricea secționabilă BxChip™ și subliniază că datorită utilizării ei randamentele de diagnostic cresc cu minim 10% comparativ cu metoda convențională. Al doilea subcapitol oferă o nouă perspectivă în cadrul istoriei TMA, anume că multiplexarea este și va putea fi utilizată cu mult interes în patologia digitală. În prezentul subcapitol este descrisă matricea BxChip™ împreună cu software-ul vizualizator de lame histologice BxLink™. Datorită formei de dimensiuni reduse a acestei matrici tehnicienii de laborator pot aplica pe lamele histologice trei secțiuni de parafină BxChip™ (reprezentând trei nivele de adâncime din blocul de parafină). Lamele rezultate sunt colorate cu coloranți histochimice uzuale sunt apoi scanate pentru a fi introduse ca imagini în sistemele de calculator. Odată ajunse în sistemul de stocare BxLink™ acestea pot fi observate ușor cu ajutorul scalei de mărime similare obiectivelor de microscop și accesate oriunde și oricând de către medicii specialiști și patologi pentru determinarea diagnosticelor.