

Etapa 2

Investigația tehnicii FICTION în carcinoamele invazive ale sânului, dezvoltarea unui protocol alternativ la testele duale IHC-ISH pentru evaluarea neoplaziei mamare și limfoide, validarea protocolului coloranților fotocromici și diseminare

ianuarie – decembrie 2021

Rezumatul etapei 2

Obiectivul acestei etape a fost dezvoltarea unui protocol alternativ la testele duale IHC-ISH care încorporează utilizarea coloranților fotocromici pentru evaluarea neoplaziei mamare și limfoide. Pentru îndeplinirea acestui obiectiv am desfășurat următoarele activități cuprinse în Planul de Lucru pentru Etapa 2:

Activitatea 2.1. Analiza FICTION: evaluarea statusului HER2 în carcinoamele invazive ale sânului conform orientărilor ASCO / CAP 2018 pentru testarea HER2.

Activitatea 2.2. Analiza rezultatelor: compararea rezultatelor pentru testele secvențiale IHC / ISH HER2 (standard de aur) și pentru testul FICTION.

Activitatea 2.3. Diseminarea rezultatelor parțiale: participare la cel puțin o conferință internațională.

Activitatea 2.4. Selectarea coloranților: identificarea posibilibilor coloranți fotocromici de tip P.

Activitatea 2.5. Analiza coloranților: examinarea proprietăților coloranților candidați în ceea ce privește cerințele impuse de protocoalele IHC și ISH și selectarea candidaților finali.

Activitatea 2.6. Selectarea cazurilor: cinci carcinoame de sân invazive și cinci cazuri de limfom selectate din dosarele de caz ale Departamentului de patologie al IOCN, cu informații disponibile clinice, imagistice, patologice și de tratament.

Activitatea 2.7. Elaborarea protocolului de colorare fotocromatică și analiza comparativă cu colorații imunohistochimice de referință automatizate.

Livrabilele prevăzute pentru această etapă:

- Raport privind utilizarea tehnicii FICTION pentru evaluarea statusului HER2 în carcinoamele invazive ale sânului;
- Raport privind coloranții candidați identificați pentru protocolul coloranților fotocromici;
- Lucrare prezentată la o conferință științifică;
- Draft articol pentru a fi publicat într-o revistă ISI.

Rezultate obtinute

Activitatea 2.1, 2.2 și 2.3

În cadrul activităților 2.1, 2.2 și 2.3 am desfășurat **două studii**.

Primul studiu a fost un studiu pilot care s-a desfășurat pe un număr de cinci cazuri de carcinoame mamare invazive. Scopul acestui studiu a fost de a evalua tehnica FICTION ca posibil candidat pentru evaluarea statutului HER2 în carcinoamele invazive de sân (IBC). Obiectivul studiului actual de a aplica și valida un protocol FICTION modificat pe probele IBC pentru determinarea statutului HER2.

Grupul de studiu a fost reprezentat de cinci cazuri de IBC, selectate din dosarele de caz ale Departamentului de Patologie al IOCN. Tehnica FICTION a fost evaluată prin efectuarea unei analize comparative cu testele standard de aur pentru evaluarea statutului HER2 reprezentate prin teste IHC și FISH secvențiate. Au fost selectate trei IBC de tip NST, un IBC lobular și un IBC lobular pleomorf.

Din punct de vedere al expresiei IHC, trei cazuri au prezentat un scor HER2 2+(echivoc), un caz a prezentat un scor 1+(negativ) și un caz a fost 3+(pozitiv). Două cazuri au fost clasificate prin examinarea FISH în grupul 5 ASCO/CAP, un caz în grupul 1, un caz în grupul 3 și un caz în grupul 4. După analiza combinată, două din cinci cazuri au fost clasificate ca HER2 pozitive. Analiza FICTION a arătat un acord absolut pentru expresia IF a proteinei HER2 în comparație cu expresia IHC. Pentru procentul de celule tumorale care arată expresia HER2, coeficientul de corelație al lui Pearson a fost 0,94 și valoarea p pentru testul t student a fost $p=0,12$. Analiza FICTION a arătat un acord absolut pentru expresia testelor ISH ale HER2 în comparație cu rezultatele FISH. Coeficienții de corelație pentru numărul mediu de copii centromeric, numărul mediu de copii HER2 și raportul HER2/CEP17 au fost: 0,98, 0,99, respectiv 0,99 și toate valorile p ale testelor t au fost peste 0,05.

În concluzie, studiul actual a arătat o corelație excelentă între cele două tehnici și justifică extinderea grupurilor de studiu.

Rezultatele acestui studiu au fost diseminate printr-un e-poster în cadrul Conferinței organizate de Universitatea de Medicină și Farmacie Cluj Napoca: Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, în conformitate cu obiectivul asumat în cadrul **Activității 2.3**. Titlul lucrării este: ***“Application of FISH and FICTION for the assessment of the HER2 status in breast invasive carcinomas - a pilot study”*** (Aplicarea FISH și FICTION pentru evaluarea statutului HER2 în carcinoamele mamare invazive - un studiu pilot). În secțiunea de fișiere suplimentare am atașat studiul detaliat, respectiv e-posterul pe care îl vom susține în cadrul Conferinței, în perioada 6-10 decembrie 2021.

Cel de-al **doilea studiu** a fost realizat pe lotul de 49 de cazuri de carcinoame invazive. În secțiunea de fișiere suplimentare am atașat studiul detaliat, respectiv draftul unui articol pe care urmează să îl submitem către o revista cotate ISI.

Grupul de studiu a fost reprezentat de 49 de pacienți diagnosticați cu cancer de sân selectați din cazuistica Departamentului de Anatomie patologică al IOCN. Media vârstei pacienților a fost de

57,59 ani și cu mediana de 60 de ani. Distribuția genului pacienților a evidențiat un raport ridicat între femei și bărbați (48:1).

De la acești pacienți au fost selectate 51 de specimene arhivate la parafina de carcinom mamar invaziv (IBC) pentru o analiză comparativă. Un caz a fost diagnosticat cu IBC bilateral și un caz a fost diagnosticat cu IBC bifocal. Dintre aceste probe, 92% au fost reprezentate de tumori primare, o probă a fost reprezentată de o metastază la nivelul ganglionilor limfatici și trei probe au fost reprezentate de tegument infiltrat de IBC. Majoritatea probelor au fost reprezentate de specimene biopsice (35/51 probe), restul fiind probe de excizie.

Distribuția tipului tumoral a arătat că 74% dintre probe au fost reprezentate de IBC ductal invaziv/NST (38/51), urmate de șase cazuri de carcinom lobular invaziv (12%) și patru cazuri de carcinom invaziv mixt (8%), reprezentat de o componentă primară NST și un carcinom mamar invaziv secundar de alt tip histologic a cărui pondere a depășit 10% din suprafața examinată. Restul cazurilor au fost reprezentate de carcinoame invazive micropapilare și cribriforme.

Cele mai multe cazuri au fost clasificate drept carcinoame invazive de gradul 2 Nottingham (57%, 29/51), urmate de cazurile de gradul 3 (21%, 11/51) și nouă cazuri de IBC de gradul 1, 18%. Pentru două cazuri, informațiile referitoare la gradare nu au fost disponibile.

Patru din 51 de probe au fost negative pentru receptorii estrogenici (7,84%) și nouă din 51 de probe au fost negative pentru receptorii de progesteronici (17,64%). Valoarea Ki-67 a variat de la 5% la 65%, cu o medie de 26% și o mediană de 21%.

Expresia HER2 IHC a fost de 2+ (echivoc) în 39/51 probe (76,47%), 10 cazuri au fost negative (1+, 19,6%), iar două cazuri au fost pozitive (3+, 3,92%).

Analiza FISH a permis clasificarea cazurilor în grupurile ASCO/CAP 2018. Grupul 1 a reprezentat 18% din probe (nouă probe), grupul 3 a reprezentat 12% din probe (șase probe), grupul 4 a reprezentat 27% din probe (14 probe), iar grupul 5 a reprezentat 43% din probe (22 de probe). Clasificarea finală a cazurilor a arătat o rată de pozitivitate HER2 de 27,45% (14/51 probe).

Analiza comparativă a fost efectuată pentru 49 de probe din cauza epuizării componentei invazive sau din cauza epuizării complete a materialului tisular din blocul de parafina.

La compararea rezultatelor IHC și IF pentru categoria imunohistochimie/imunofluorescență HER2 am observat un acord de 83,67% între IHC și IF. Opt cazuri au avut rezultate discordante: șase cazuri au fost clasificate ca 1+ de către IHC și ca 2+ de IF, un caz a fost clasificat ca 2+ de IHC și 3+ de IF, iar un caz a fost clasificat ca 3+ de IHC și ca 2+ de IF. Coeficientul Kappa al lui Cohen a fost egal cu 0,533 ($p < 0,0001$).

Am evaluat în continuare procentul de celule tumorale care exprimă proteina HER2 prin IHC și prin IF. Orice nivel de expresie a fost luat în considerare. Expresia medie pentru IHC a fost de 60,71%, iar pentru IF a fost de 73,77% ($p = 0,00026$). Plot-urile Bland-Altman au arătat pentru majoritatea măsurătorilor pereche că valorile au fost între limitele de acord (LOA) superior și inferior, 45/49, 91,83%, Figura 2.1.

Analiza comparativă a rezultatelor ISH pentru FISH și FICTION a arătat un număr mediu de semnale pentru sonda centromerică de 2.95 semnale / nucleu, iar pentru FICTION și o medie de 3.06 semnale / nucleu. Mediana pentru semnalele centromerice în cazul FICTION a fost de 2,7, iar

pentru FISH a fost de 2,75. Testul t a arătat valoarea p de 0.075, ceea ce arată că diferențele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic. Plot-urile Bland-Altman au arătat pentru majoritatea măsurătorilor pereche că valorile au fost între LOA superior și inferior (45/49, 91,83%, Figura 2.2).

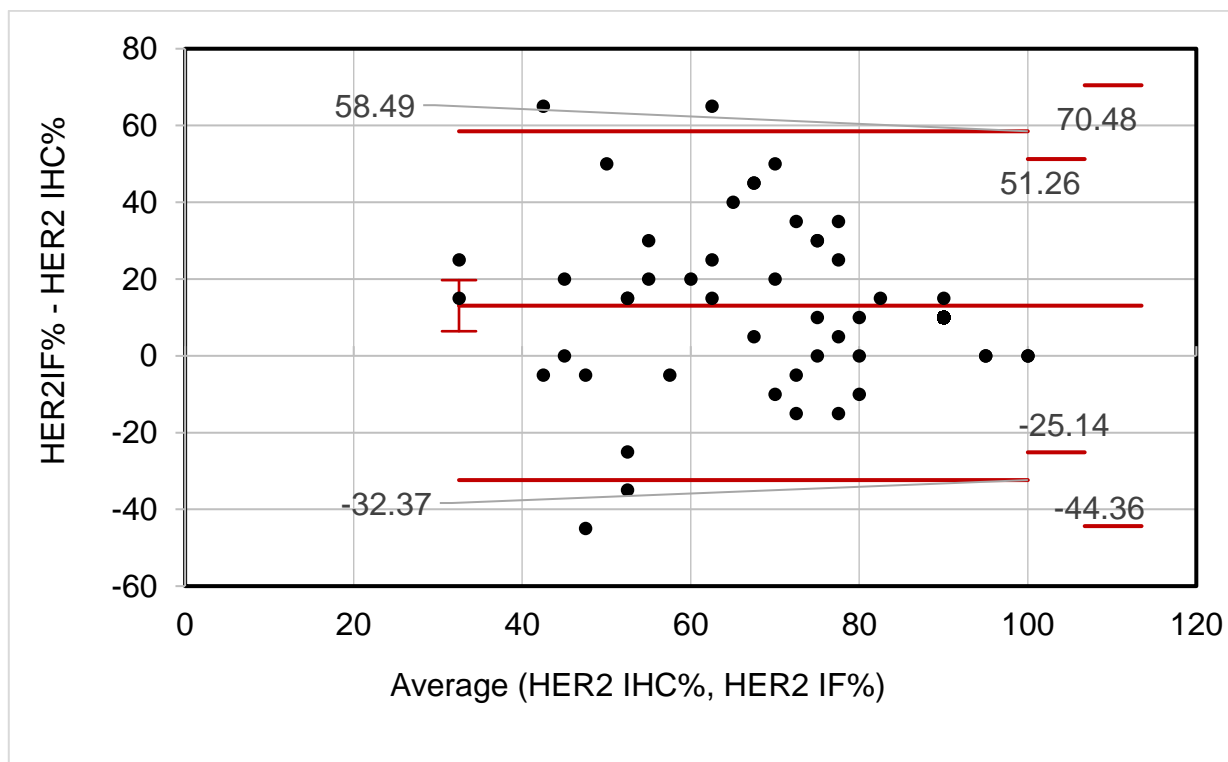


Figura 2.1. Ploturi Bland-Altman ce evaluează rezultatelor HER2 IHC% și HER2 IF%.

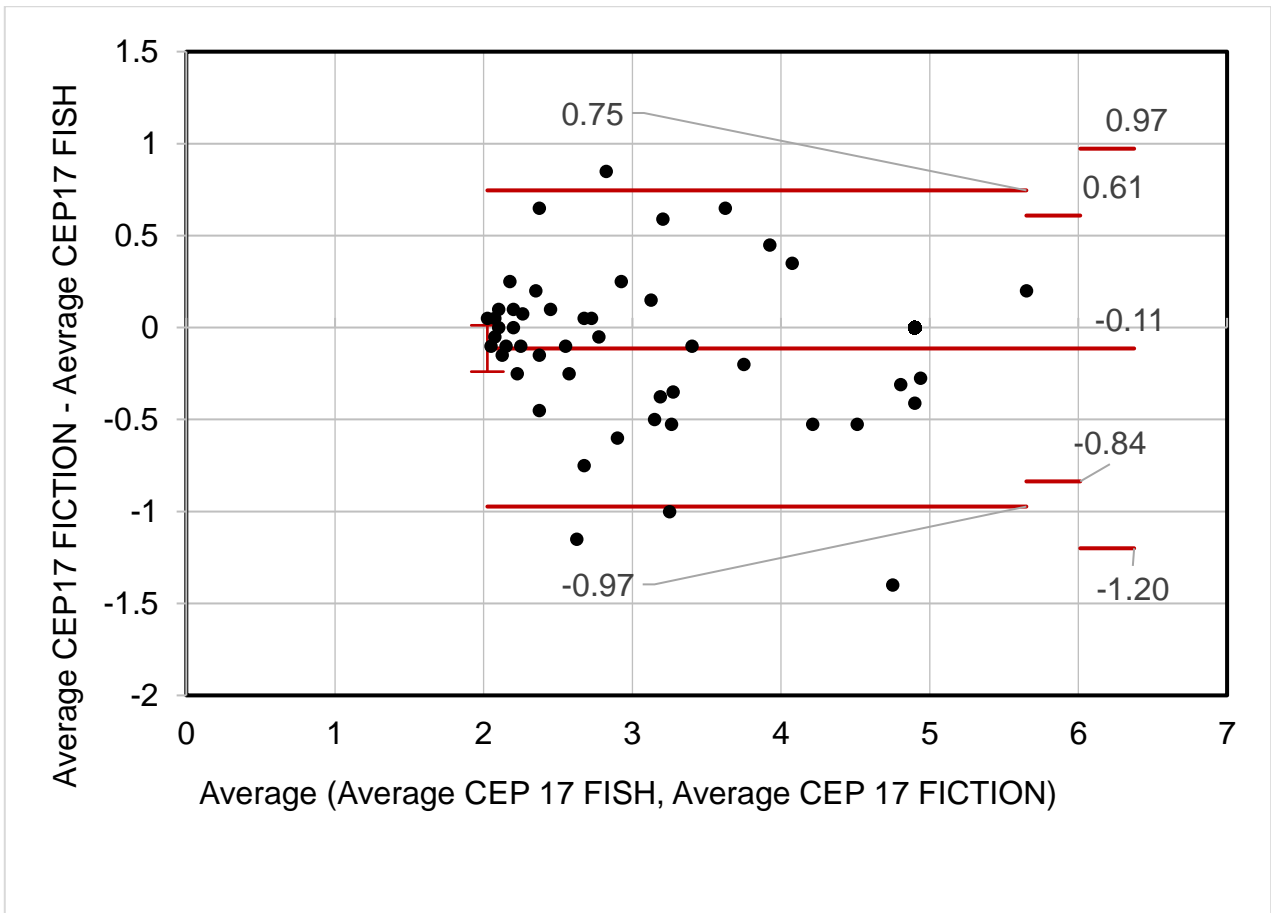


Figura 2.2. Ploturi Bland-Altman ce evaluează valorii medii CEP17 prin FISH și valorilor medii CEP 17 prin FICTION.

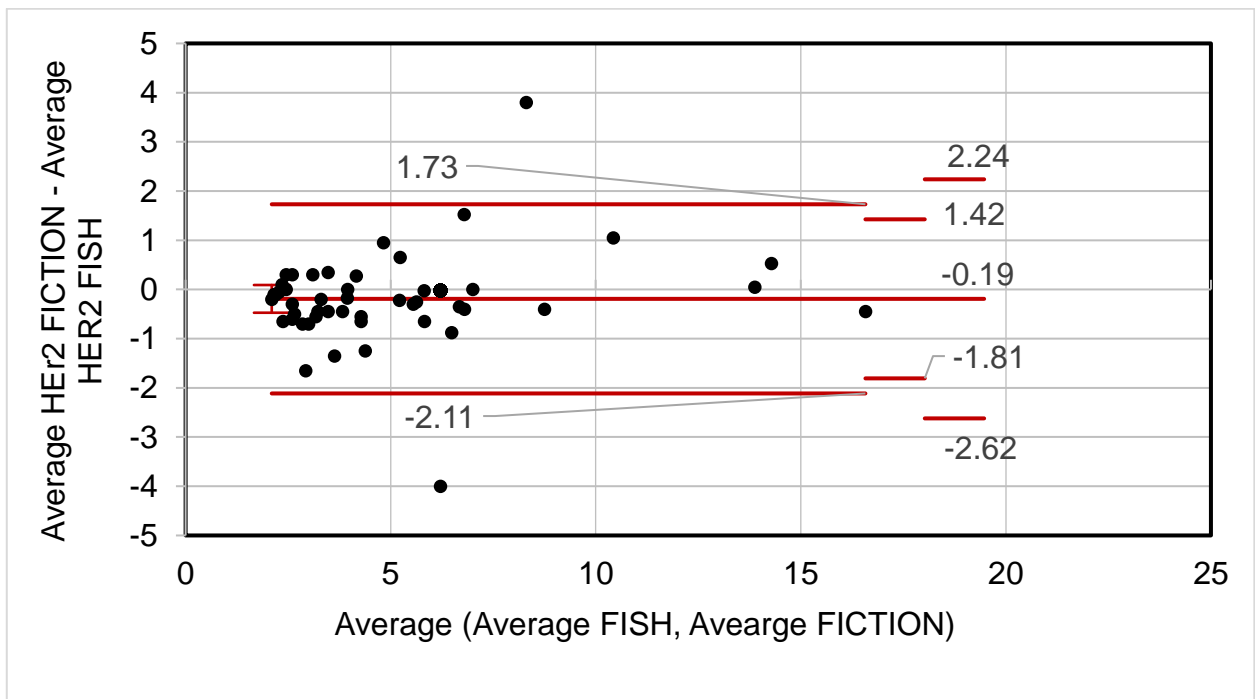


Figura 2.3. Ploturi Bland-Altman evaluarea valorii medii FISH HER2, respectiv FICTION HER2.

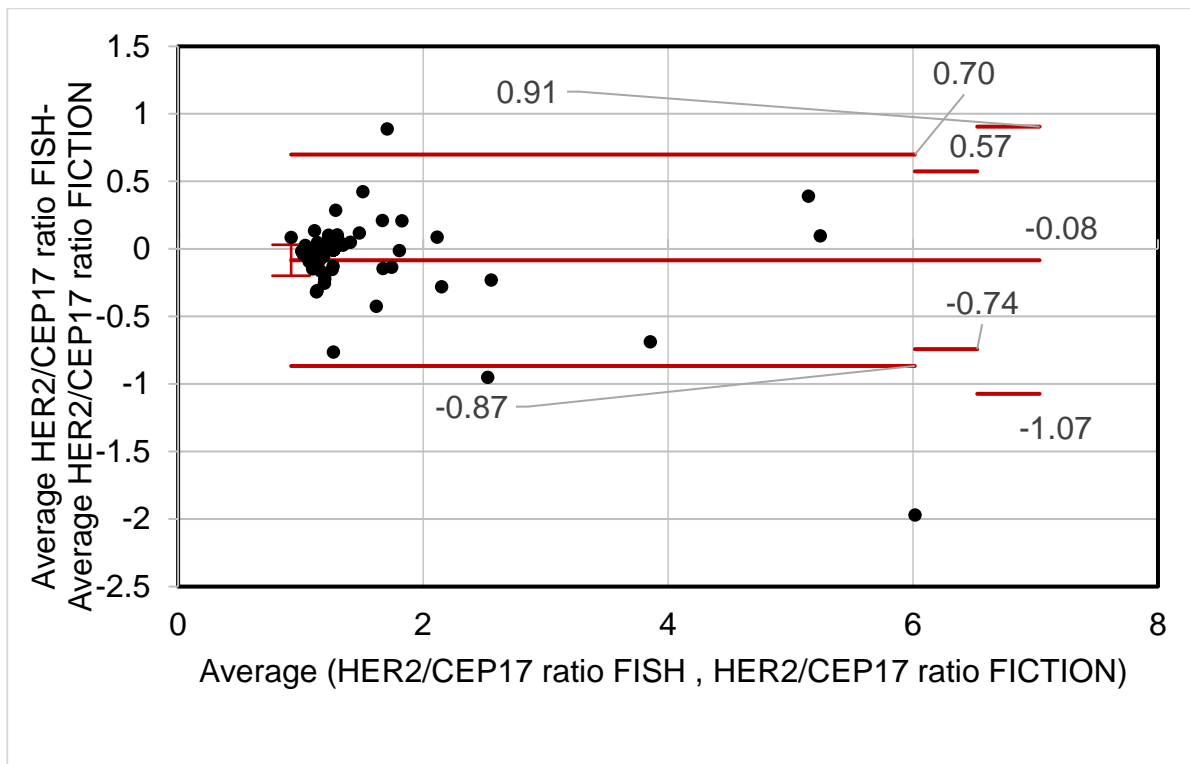


Figura 2.4. Plot-urile Bland-Altman care evaluează valoarea medie a raportului HER2/CEP17 obținut prin FISH, respectiv prin FICTION.

Analiza comparativă a rezultatului ISH în testele FICTION și FISH a arătat un număr mediu de semnale pentru sonda HER2 de 5,25 semnale / nucleu pentru FICTION și o medie de 5,05 semnale / nucleu pentru analiza FISH. Media pentru semnalele HER2 în cazul FICTION a fost de 3,85, iar pentru FISH a fost de 4,05. Valoarea p a testului t a fost de 0.18, ceea ce arată că diferențele nu au fost semnificative statistic. Plot-urile Bland-Altman au arătat pentru majoritatea măsurărilor pereche că valorile au fost între LOA superioară și inferioară (47/49, 95,91%, figura 2.3).

Analiza comparativă a rezultatului ISH în testele FICTION și FISH a arătat un raport mediu HER2/CEP17 de 1,78 pentru testările FISH și un raport mediu de 1,66 HER2/CEP17 pentru FICTION. Mediana pentru raportul HER2/CEP17 în cazul FICTION a fost de 1.277, iar pentru FISH a fost de 1.286. Testul t a arătat o valoare a p de 0.148, arătând că diferențele nu au fost semnificative statistic. Plot-urile Bland-Altman au arătat pentru majoritatea măsurărilor că valorile au fost între LOA superioară și inferioară (46/49, 93,87%, figura 2.4).

Coeficientul de corelație Pearson pentru numărul mediu de semnale/celule CEP 17 a fost de 0,90($p < 0,001$). Rezultatele comparative sunt prezentate în figura 5.a). Pentru numărul mediu de semnale/celulă HER2, coeficientul de corelație Pearson a fost de 0,96 ($p < 0,001$). Rezultatele comparative sunt prezentate în figura 5.b). Pentru raportul HER2/CEP 17, coeficientul de corelație Pearson a fost de 0,95 ($p < 0,001$). Rezultatele comparative sunt prezentate în figura 5.c).

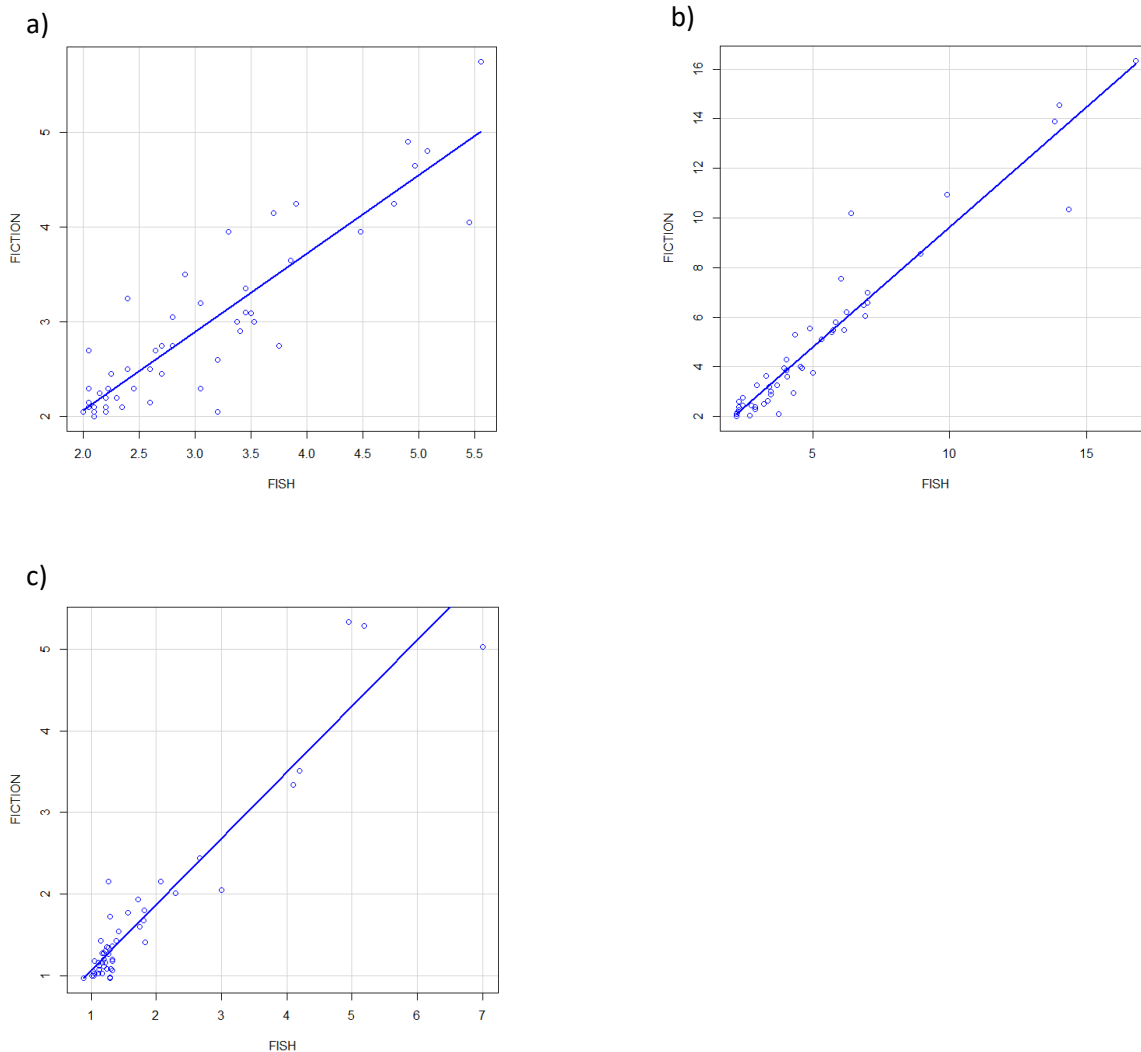


Figura 2.5.a). Scatter plot ce evaluează comparativ numărul mediu de copii pentru CEP17 obținut prin FISH și FICTION. Figura 2.5.b). Scatter plot ce evaluează comparativ numărul mediu de copii pentru HER2 obținut prin FISH și FICTION. Figura 2.5.c) Scatter plot ce evaluează comparativ numărul mediu de copii pentru raportul HER2/CEP17 obținut prin FISH și FICTION.

Pe baza raportului HER2/CEP17 și a numărului mediu al copiilor HER2, cazurile copii au fost incluse în grupurile ASCO/CAP ISH atât pentru analiza FISH, cât și pentru FICTION. Comparând rezultatele FISH și FICTION, am observat un acord de grup de 85,7%, cu un coeficient kappa al lui Cohen egal cu 0.785 ($p < 0.0001$). Cinci din cele șase cazuri discordante au fost clasificate prin FISH în grupul 5 și în grupul 4 prin tehnica FICTION. Un caz a fost clasificat în grupul 3 prin FISH și în grupa 1 prin FICTION.

Clasificarea finală a cazurilor în categoria HER2 POZITIV sau NEGATIV interpretarea secvențială combinată IHC și FISH și interpretarea FICTION a arătat un acord de 100% și o valoare kappa de 1 ($p < 0.0001$).

Activitatea 2.4

Punctul de plecare pentru realizarea acestei etape este reprezentat de coloranți fotocromi. Acestea reprezintă substanțe care au capacitatea de a-și schimba culoarea într-un mod reversibil la expunerea la anumite condiții (lumină cu lungime de undă variată).

Există două tipuri principale de coloranți fotocromici. Coloranții fotocromici de tip T sunt cel mai utilizat tip de coloranți comerciali și sunt reprezentați în principal de trei clase principale: spiropirani, spirooxazine și nafptopirani.

Această categorie de coloranți se caracterizează prin activare și inactivare rapidă, schimbare eficientă de la o formă incoloră la una colorată, culoare reziduală scăzută, o mică schimbare a ratei de răspuns în schimbarea temperaturii mediului și fotostabilitate.

Coloranții fotocromici de tip P utilizează expunerea la lumină pentru a declanșa comutarea moleculară și au avantajul că reacția nu este în general reversibilă prin utilizarea metodelor termice. Cele două clase principale sunt reprezentate de compuși de fulgide și de diariletene .

Ambele două categorii au câștigat recent atenția în domeniul științelor vieții datorită cererii tot mai mari de comutatoare moleculare controlabile. Coloranții de tip P au fost utilizați în industria textilă și a cernelii și, în ultimii ani, au fost luați în considerare în dezvoltarea circuitelor optice (întrerupătoare și porți logice), a tehnologiei informației și a nanotehnologiei.

	Fulgide	Diariletene
Reversibilitate termică	Nu	Nu
Stabilitate termică a ambilor izomeri	Da Unii compuși prezintă degradare după cicluri repetate de încălzire la 80 de grade Celsius	Da
Reversibilitate la întuneric	Nu	Nu
Proprietăți fotocromice în stare solidă	Da	
Sintetizare	Dificilă	Facilă
Stabilitate la temperatura camerei	Da	Da
Durata aproximativă de reversibilitate a culorilor	De ordinul picosecundelor	De ordinul picosecundelor
Dependenta de lungimea de undă a proprietății de fotocicloversibilitate	Pentru unii compuși s-a observat scăderea absorbanței la lungimea de undă maximă de	Compuși în soluții: <ul style="list-style-type: none">• 1,2-bis(2,4,5-trimethyl-3-thienyl)maleic anhidride

	absorbție după fotocolorări repetate și cicluri de albire	<ul style="list-style-type: none"> • 7 1,2-bis(5-(4-ethynylphenyl)-2-methyl-3-thienyl)perfluorocyclopentene • 1,2-bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)perfluorocyclopentene <p>Compuși în film polimeric</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1-(2-methyl-5-p-cyanophenyl-3-thienyl)-2-(2-methyl-5-p-methoxyphenyl-3-thienyl)perfluorocyclopentene
Numărul de cicluri	Stabilitate păstrată pentru anumiți compuși până la 500 de cicluri	Până la 30000 Numărul compușilor care pot depăși un pragul de 1000 de cicluri scade dramatic
Electrocromism	Anumiți compuși	Anumiți compuși
Proprietăți fluorescente	Da	Da
Absorbție în infraroșu	Da, pentru anumiți compuși	Da, pentru anumiți compuși

Tabelul 2.1. Analiza comparativă a celor mai importante clase de coloranți fotocromici de tip P.

Activitatea 2.5

În urma analizei protocoalelor de lucru pentru IHC și DDISH am identificat următoarele substanțe la care coloranții fotocromici vor fi expuși în timpul protocoalelor de colorare pentru cele două tehnici (Tabelul 2.2). De asemenea, am detaliat și etapele în care regimurile termice la care reacțiile chimice și biologice se produc ce pot avea un impact asupra stabilității coloranților utilizați.

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

Ne-am axat pentru acest proiect pe utilizarea clasei de coloranți fotocromici din clasa diariletanelor. Pe lângă proprietățile identificate și detaliate la A.2.4 un factor important a fost reprezentat de disponibilitatea unui număr mai mare de reactivi și stabilitatea termică la temperaturi ce depășesc 100 °C. Astfel am identificat următorii compuși disponibili comercial (tabelul 2.3).

Reactivul	Tehnica	Temperatura
VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit	DDISH	37°C
VENTANA Red ISH DIG Detection Kit	DDISH	37°C
HybReady Solution	DDISH	37°C
ISH Protease 3	DDISH	44°C
Hematoxylin II	DDISH	TC
Bluing Reagent	DDISH	TC
Reaction Buffer Concentrate (10X)	DDISH	TC
SSC (10X)	DDISH	TC
EZ Prep Concentrate (10X)	DDISH	TC
ultraView Silver Wash II (Pre-dilute)	DDISH	72°C
ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1)	DDISH	80 °C
ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2)	DDISH	80 °C
ULTRA LCS (Pre-dilute)	DDISH	TC
Xilen	DDISH	TC
Apa distilată	DDISH	TC
Alcool 96%	IHC	TC
Phosphate-Buffered Saline	IHC	TC
Tris-Buffered Saline	IHC	TC
H ₂ O ₂	IHC	TC
Protein Block	IHC	TC
Acid citric pH 6	IHC	100 °C
Anticorpi IHC	IHC	37°C
NovoLink Polymer	IHC	37°C
DAB (3,3'-diaminobenzidine)	IHC	TC
Carbonat de litiu	IHC	TC

Tabelul 2.2. Substanțe utilizate în timpul protocoalelor de colorare pentru IHC și DDISH.

Substanța	Formulă	Proprietăți
cis-1,2-Diciano-1,2-bis(2,4,5-trimetil-3-tienil)etenă	$C_{18}H_{18}N_2S_2$	Stare fizică la temperatura camerei: solid Punct de topire: 121 °C Culoare: palid galben-palid roșu Materiale incompatibile agenți oxidanți
1,2-Bis[2-metilbenzo[b]tiufen-3-il]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-ciclopentenă	$C_{23}H_{14}F_6S_2$	Stare fizică la temperatura camerei: solid Punct de topire: 160 °C Culoare: alb- foarte palid galben Materiale incompatibile agenți oxidanți
2,3-Bis(2,4,5-trimetil-3-tienil)maleimidă	$C_{18}H_{19}NO_2S_2$	Stare fizică la temperatura camerei: solid Punct de topire: 180 °C Culoare: palid galben- palid verde Materiale incompatibile agenți oxidanți
1,2-Bis[2-metilbenzo[b]tiufen-3-il]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-ciclopentenă	$C_{23}H_{14}F_6S_2$	Stare fizică la temperatura camerei: solid Punct de topire: 160 °C Culoare: alb- palid galben Materiale incompatibile agenți oxidanți
2,3-Bis(2,4,5-trimetil-3-tienil)maleic Anhidridă	$C_{18}H_{18}O_3S_2$	Stare fizică la temperatura camerei: solid Punct de topire: 168 °C Culoare: palid galben- palid verde Materiale incompatibile agenți oxidanți

Tabelul 2.3. Compuși disponibili comercial identificați.

Activitatea 2.6

Pentru evaluarea comparativa între cele două tehnici am considerat pentru studiul preliminar cinci cazuri de carcinoame mamare invazive si cinci cazuri de limfoame.

Pentru **selecția carcinoamelor invazive ale sânului** am selectat în funcție de materialul disponibil în blocul de parafină, cinci cazuri din cele 49 de cazuri prezentate la punctele A1.1, A1.2, A2.1,A2.2, A2.3. Datorită rezultatelor foarte bune pe care le-am obținut evaluând material tisular prelevat de la nivelul blocurilor aferente cazurilor prin tehnica FICTION, tehnica IHC și FISH considerăm că din punct de vedere calitativ aceste cazuri sunt adecvate pentru continuarea colorațiilor.

Pentru **selecția cazurilor de limfom** am identificat cinci cazuri de limfoame care au fost evaluate și diagnosticate în cadrul laboratorului de anatomie patologică al IOCN, în perioada august-noiembrie 2021. Am selectat cazuri pentru care datele clinice, patologice și cele de citogenetică au fost disponibile și care la momentul selecției acestora aveau blocurile de parafină în histoteca laboratorului. În tabelul 2.4 am prezentat un sumar al informațiilor clinice ale cazurilor.

NUMĂR CAZ	SEX	VARSTA	LOCALIZARE	SIMPTOME B	LOCALIZARE
1	F	68	Limfoganglionară	Absente	Boala diseminată
2	F	66	Limfoganglionară	Absente	Boala diseminată
3	M	44	Limfoganglionară	Prezente	Boala diseminată
4	F	88	Limfoganglionară	Prezente	Boala diseminată
5	M	60	Limfoganglionară	Absente	Boala localizată

Tabelul 2.4. Sumarul datelor clinice ale cazurilor de limfom.

În continuare am colectat datele histopatologice, imunohistochimice și de citogenetică care au fost sumarizate în tabelul 2.5.

NUMĂR CAZ	TIP SPECIMEN	TIP HISTOLOGIC	PROFIL IHC	FISH
1	Biopsie	Limfom de manta	CD20+, Cyclina D1+, CD5+, Bcl2+, CD43+, CD23-, CD10-, Bcl6-, Ki-67:30-40%	
2	Excizie	Limfom limfocitic cu celule mici/Leucemie limfatică cronică	CD20+, Cyclina D1-, CD5+, CD23+, CD3-, Ki-67: 30	
3	Excizie	Limfom Hodgkin clasic, subtipul cu celularitate mixtă	CD45-, PAX5+(slab), CD15+, CD30+, CD20-, CD3-, CD23-, Ki-67: 30%	
4	Biopsie	Limfom difuz cu celule B MARI	CD20+, CD5+, Cyclina D1-, CD10-, CD23-, CK-, Ki-67: 70%	Rearanjamente ale MYC, Copii suplimentare MYC, BCL2, BCL6, Fără rearanjamente BCL2,BCL6
5	Excizie	Limfom folicular	CD20+, CD10+, CD5-, CyclinaD1-, TdT-, CD23-, Ki-67:25%	

Tabelul 2.5. Datele histopatologice, imunohistochimice și de citogenetică

Activitatea 2.7

Conceptul propus pentru această activitate este prezentat în figura 2.6.

Coloranții fotocromici de tip P utilizează expunerea la lumină pentru a declanșa comutarea moleculară și au avantajul că reacția nu este în general reversibilă prin utilizarea metodelor termice.

Punctul final al activităților evidențiate în figura 2.6 este de a obține un negativ al modelului de colorare IHC pe lamela de sticlă acoperită cu colorantul de tip P. Acest lucru se realizează prin inversarea reacției fotocromice după ce tehnica IHC a fost efectuată prin utilizarea unei lumini de lungime de undă specifice colorantului, care poate inversa reacția. Zonele marcate (pozitive) din IHC vor proteja colorantul de lumina utilizată pentru a inversa reacția fotocromă. În zonele ecranate reacția fotocromă inversă nu va avea loc și vom obține, pe lama de sticlă, negativul tehnicii IHC. După efectuarea protocolului de colorare fotocromică, lamela este reutilizată pentru tehnicile ISH (aceleși specimen poate fi utilizat atât pentru IHC, cât și pentru ISH).

În timpul protocolului ISH, colorarea cromogenă IHC este îndepărtată din eșantion, dar conservată pe lamela de sticlă ca amprentă negativă. În lamele care nu au fost acoperite cu un colorant de tip P care inversează colorarea IHC are ca rezultat un specimen transparent.

Deoarece coloranții fotocromici de tip P nu sunt influențați de variațiile termice necesare pentru realizarea protocolului ISH, amprenta va fi păstrată, iar examinatorul va putea vedea un negativ al colorării IHC pe diapozitivul final ISH.

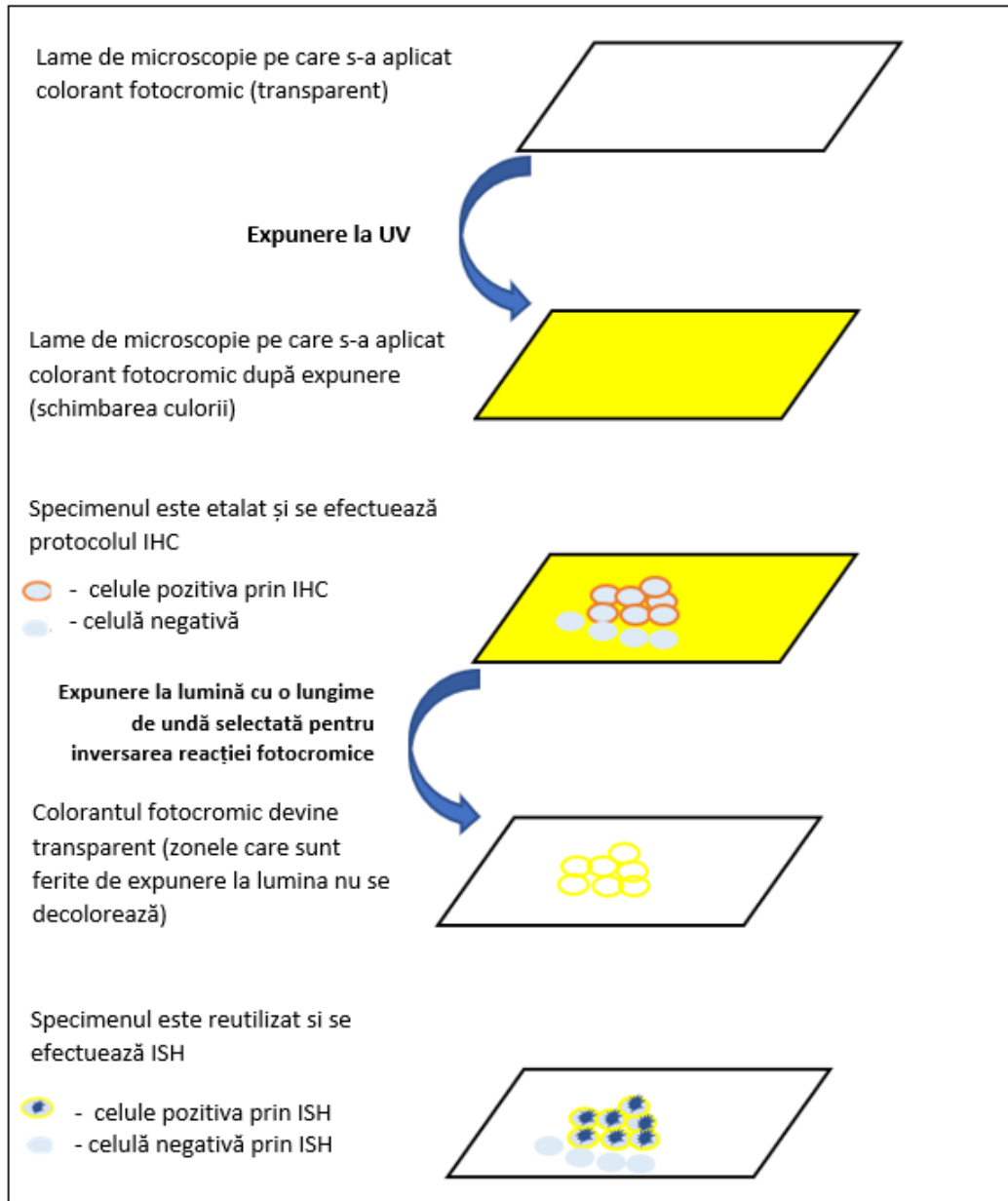


Figura 2.6. Protocolul de colorare fotocromică propus.

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

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

Obiectivul nostru principal pentru acest proiect este implementarea tehnicii în evaluările brightfield.

Protocolul IHC a fost detaliat anterior. Protocolul de ISH (metoda DDISH) realizat pe automatul de colorare IHC Ventana Benchmark Ultra este disponibil la adresa: <https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/LandingPages/her2-dual-ish/VENTANA-HER2-Dual-ISH-Method-Sheet.pdf>.

Dr. Bogdan POP

Dr. Ovidiu BĂLĂCESCU

Dr. Adrian TRIFA

Director proiect, Dr. Bogdan FETICA

Bibliografie

1. Towns A. Colorant, Photochromic. In: Luo R, editor. *Encyclopedia of Color Science and Technology*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 1-9.
2. Harris JD, Moran MJ, Aprahamian I. New molecular switch architectures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(38):9414-22.
3. Zhang J, Fu Y, Han HH, Zang Y, Li J, He XP, et al. Remote light-controlled intracellular target recognition by photochromic fluorescent glycoprobes. *Nat Commun*. 2017;8(1):987.
4. Fukaminato T, Ishida S, Métivier R. Photochromic fluorophores at the molecular and nanoparticle levels: fundamentals and applications of diarylethenes. *NPG Asia Materials*. 2018;10(9):859-81.
5. Sarter C, Dey S, Jaschke A. Photoswitchable Oligonucleotides Containing Different Diarylethene-Modified Nucleotides. *ACS Omega*. 2019;4(7):12125-9.
6. Nigel Corns S, Partington SM, Towns AD. Industrial organic photochromic dyes. *Coloration Technology*. 2009;125(5):249-61.
7. Irie M. Discovery and development of photochromic diarylethenes. *Pure and Applied Chemistry*. 2015;87(7):617-26.
8. Fan M-G, Yu L, Zhao W. Fulgide Family Compounds: Synthesis, Photochromism, and Applications. In: Crano JC, Guglielmetti RJ, editors. *Organic Photochromic and Thermochemical Compounds: Volume 1: Main Photochromic Families*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 141-206.
9. Köse M, Orhan E. Comparison of photochromic properties and thermal stabilities of fulgide, fulgimide, and benzimidazole [1, 2-a] pyrrolidine-2-one derivatives. *Turkish Journal of Chemistry*. 2009;33(5):579-88.
10. Wolak MA, Gillespie NB, Thomas CJ, Birge RR, Lees WJ. Optical properties of photochromic fluorinated indolylfulgides. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2001;144(2-3):83-91.
11. Wilson A. Applications of photochromic polymer films. *Physics in Technology*. 1984;15(5):232.
12. Matsuda K, Irie M. Diarylethene as a photoswitching unit. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2004;5(2):169-82.
13. Little AF, Christie RM. Textile applications of photochromic dyes. Part 2: factors affecting the photocolouration of textiles screen-printed with commercial photochromic dyes. *Coloration Technology*. 2010;126(3):164-70.