

Raport științific

privind implementarea proiectului

Dezvoltarea de soluții alternative fotocromice la testarea dublă prin hibridizare in situ - imunohistochimie pentru evaluarea neoplasmelor sânului și ale țesutului limfoid - DeAIPhISHIC

Obiectivul general ale proiectului. Scopul acestui proiect este de a dezvolta o metodă alternativă la imunohistochimia duală - teste de hibridizare in situ aplicate în neoplazia mamară și hematopoietică, prin încorporarea utilizării coloranților fotocromici, care pot crea o amprentă negativă a testelor IHC pe lame, care, de asemenea, reprezintă modelul demonstrativ al proiectului nostru.

Etapa 3

Validarea protocolului coloranților fotocromici pentru evaluarea neoplaziei limfoide și mamare și diseminare

ianuarie – octombrie 2022

Rezumatul Etapei 3

Activitățile concepute pentru această etapă cuprind studiul de validare a protocolului coloranților fotocromici pentru evaluarea neoplaziei mamare și limfoide. Am inclus în studiu cazurile selectate de carcinom invaziv evaluate prin testarea IHC/ISH Her2 secvențială standard și prin utilizarea tehnicii FICTION. De asemenea, am inclus în studiu alte 30 de cazuri de limfom selectate din cazurile de limfom diagnosticate în cadrul Departamentului de Patologie a IOCN, cu informații clinice, imagistice, patologice și de tratament disponibile. Cazurile de carcinom mamar invaziv au fost evaluate prin utilizarea protocolului de colorare fotocromică în combinație cu IHC și DDISH. Rezultatele au fost comparate cu testele standard de referință (testare IHC secvențială și ISH Her2) și testele FICTION. Cazurile de limfom au fost evaluate prin compararea colorațiilor automate IHC duale cu protocolul care combină IHC și colorantul fotocromic.

De asemenea am desfășurat activități de diseminare a rezultatelor prin pregătirea și înaintarea spre publicare a 1 articol științific și o participare la un congres.

Activitățile cuprinse în Planul de Lucru pentru această etapă:

Activitatea 3.1. Selecția cazurilor de limfom: 30 de cazuri de limfom selectate din dosarele de caz ale Departamentului de patologie al IOCN, cu informații disponibile clinice, imagistice, patologice și de tratament + cazuri selectate din A1.1.

Activitatea 3.2. Testarea carcinomului invaziv al sânului: efectuarea protocolului de coloranți fotocromici pentru evaluarea statusului HER2 în cazurile de carcinom invaziv al sânului folosind FICTION.

Activitatea 3.3. Diseminare: Pregătirea manuscrisului pentru publicare într-o revistă cotate ISI.

Activitatea 3.4. Testarea limfomului: Efectuarea IHC dual în cazurile de limfom și testele cu coloranți fotocromici pe cazurile de limfom selectate în A2.5.

Activitatea 3.5. Analiza datelor.

Livrabilele prevăzute pentru această etapă:

- Furnizarea unei metode validate de laborator
- Raport științific final al proiectului
- Articol publicat într-o revistă de specialitate cotate ISI

Rezultate obținute

Activitatea 3.1.

Pentru testarea cazurilor de limfoame am selectat 29 de cazuri de limfoame care au fost evaluate și diagnosticate în cardul Laboratorului de Anatomie Patologică al IOCN, în perioada 01/01/2021-15/07/2022.

Cazurile au fost evaluate în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică de un anatomopatolog cu experiență în diagnosticul neoplaziilor țesutului limfoid.

Criteriile de includere au fost:

- Pacienți diagnosticați cu neoplasme limfoide
- Pacienți cu material tisular recoltat în cadrul secțiilor clinice ale IOCN
- Pacienți al căror material tisular recoltat a fost prelucrat în cadrul laboratorului de anatomie patologică al IOCN
- Materialul tisular al pacienților arhivat la parafină este disponibil în histoteca laboratorului de anatomie patologică al IOCN.

Am ales să lucrăm protocoalele de colorație dublă imunohistochimică și protocoalele duble care utilizează coloranți fotocromici folosind doar material procesat și recoltat în cadrul laboratorului de anatomie patologică al IOCN deoarece am considerat că este necesară minimalizarea variabilității determinate de recoltarea, procesarea și examinarea cazurilor.

Deoarece materialul recoltat de la nivelul proliferărilor limfoide conține un număr crescut de limfocite am considerat că este necesar să utilizăm și un material tisular tumoral care să conțină și țesut non-neoplazic cu un număr cât mai redus de celule limfoide, utilizat cu scopul de a avea un control negativ. Pentru aceasta am selectat un caz de carcinom mamar invaziv, recoltat prin puncție biopsie, pentru care numărul de limfocite infiltrative (TILs) la nivelul tumorii a fost evaluat de către anatomopatologul care a diagnosticat inițial cazul ca fiind zero.

Descrierea lotului

În cele ce urmează vom realiza o descriere sumară a lotului utilizat pentru evaluarea protocolului de colorare fotocromică și pentru realizarea colorațiilor duble imunohistochimice. Sumarizarea cuprinde și cazul de control negativ descris mai sus.

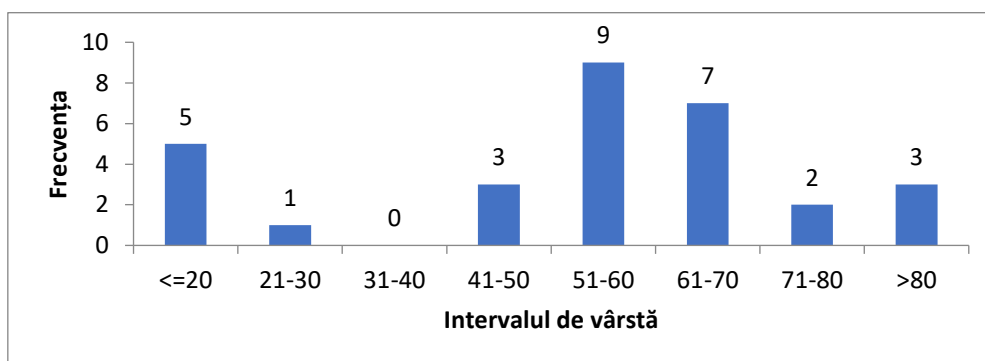


Figura 1. Distribuția vârstei în lotul de limfoame studiat.

Mediana vârstei a fost de 58 de ani. Cel mai tânăr pacient înrolat în studiu a avut o vârstă de 16 ani, iar cel mai vârstnic a avut o vârstă de 89 de ani. Distribuția pe sexe a lotului a arătat un raport de 1:1 (Figura 2). Mărimile statistice care descriu distribuția în funcție de vârstă în cadrul lotului studiat sunt prezentate în Tabelul 1.

Vârsta	
Media	54.30
Mediana	58.00
Deviația standard	20.27
Curtoza	-0.36
Asimetrie	-0.61
Interval	73.00
Minim	16.00
Maxim	89.00
Număr de cazuri	30.00
Interval de încredere 95.0%	7.57

Tabelul 1. Informațiile de statistică descriptivă ale lotului de limfoame studiat.

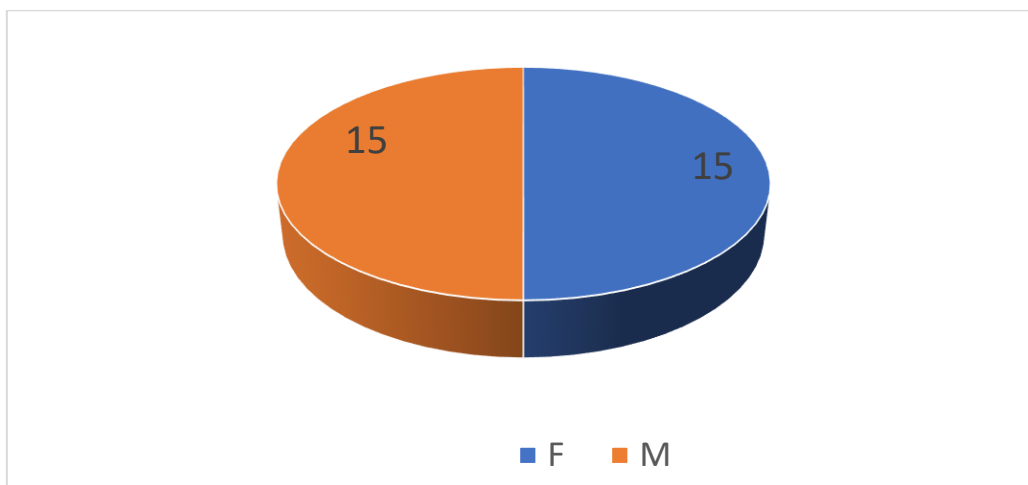


Figura 2. Distribuția pe sexe a lotului studiat.

Din punct de vedere al tipului histologic 28 de cazuri au fost reprezentate de proliferații limfoide. Un caz a fost reprezentat de un carcinom mamar invaziv NST, iar un alt caz a fost reprezentat de infiltrat reactiv limfoid la nivelul unui fragment de biopsie osteomedulară (Tabelul 2).

Din totalul de 6 cazuri de limfom difuz cu celule B mari, 2 cazuri au avut un fenotip de centru germinativ, iar un caz a fost reprezentat de un limfom difuz cu celule B mari dezvoltat în contextul unui limfom cu celule mici / leucemie limfatică cronică (sindrom Richter). Cazurile de limfom Hodgkin clasice au fost în majoritate variante cu scleroză nodulară (6 cazuri), urmate de subtipul cu celularitate mixtă. Un caz a fost reprezentat de un limfom compozit de tip Hodgkin și limfom periferic T, NOS. Din cele 3 cazuri de limfom de manta un caz a fost de tip polimorf.

Leziunea	Număr de cazuri
Limfom difuz cu celule B mari	6
Limfom Hodgkin clasic	9
Limfom cu celule de manta	3
Limfom cu celule mici / Leucemie limfatică cronică	2
Limfom compozit Hodgkin și Limfom periferic T NOS	1
Limfom folicular	3
Limfom cu celule B	2
Limfom anaplazic ALK negativ	1
Limfom Hodgkin nodular	1
Alte	2
Total	30

Tabelul 2. Sumarizarea patologiei cazurilor selectate.

Majoritatea cazurilor examinate (66% din cazuri) au fost diagnosticate inițial folosind material recoltat prin puncție biopsie. Pentru restul cazurilor s-au utilizat fragmente tisulare recoltate chirurgical prin biopsie incizională / excizională (Figura 3).

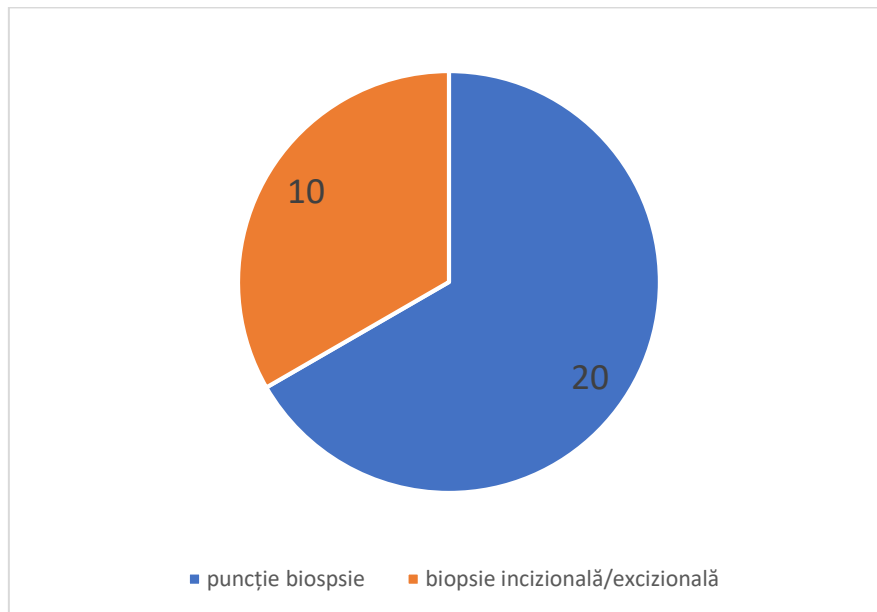


Figura 3. Tipul de material tisular disponibil evaluat inițial pentru diagnosticul cazurilor și utilizat ulterior în studiul nostru.

Din punctul de vedere al tipului de țesut, majoritatea țesutului examinat a fost reprezentat de parenchim limfoganglionar infiltrat parțial sau complet de proliferări limfoide (73,33%), urmat de măduva osoasă hematogenă (10%) (Figura 4).

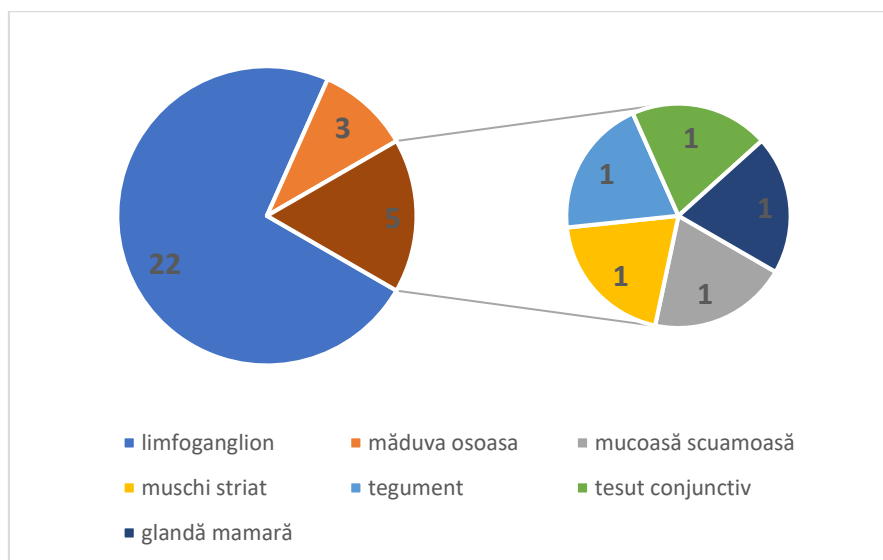


Figura 4. Tipul de țesut examinat și utilizat în studiul de față.

Pentru cazurile de cancer mamar selectate din cadrul activității A1.1 criteriile de includere în studiul de față au fost:

- Pacienți diagnosticați cu carcinoame invazive ale glandei mamare
- Examinarea histopatologică realizată în Laboratorul de Anatomie Patologică al IOCN
- Statusul receptorilor estrogenici, progesteronici, HER2 și valoarea Ki-67 cunoscută și evaluată în cadrul în Laboratorul de Anatomie Patologică al IOCN
- Cazuri care au fost evaluate prin IHC și prin metoda FISH pentru evaluarea expresiei proteinei HER2 și pentru evaluarea statusului genei HER2.

Examinarea histopatologică a cazurilor pentru stabilirea diagnosticului a fost realizată conform protocolului diagnostic a departamentului. Evaluarea histopatologică a urmat recomandările OMS 2019 din *WHO classification of tumors of the breast, 2019, ediția a 5-a*.

Tipul histologic de carcinom invaziv a fost clasificat conform OMS 2019. Gradarea cazurilor s-a realizat folosind sistemul de gradare Nottingham.

Evaluarea expresiei receptorilor estrogenici(RE) și progesteronici(RP), Ki-67 și HER2 s-a realizat conform recomandărilor ASCO/CAP actuale.

Etapa preanalitică a cazurilor a fost în realizată în conformitate cu ghidurile ASCO/CAP în vigoare pentru prelevarea și procesarea specimenelor provenite de la pacienți cu carcinoame mamare.

Colorațiile imunohistochimice (IHC) pentru RE,RP și KI-67 s-au realizat în conformitate cu protocolul de colorare IHC manuală validat al laboratorului. Colorațiile IHC pentru HER2 s-au realizat folosind tehnica de IHC automată și automatul de colorare Ventana Benchmark Ultra.

Pentru lamele colorate pentru RE și RP s-au utilizat ca martor intern expresia acestor markeri la nivelul parenchimului mamar glandular netumoral. În cazul evaluării unui material care nu conține aceste structuri absența controlului intern s-a menționat în rezultatul histopatologic. Colorațiile IHC pentru evaluarea expresiei HER2 au fost realizate folosind pe fiecare lamă un control extern reprezentat de un fragment tisular care conține o proliferare tumorală de tipul unui carcinom mamar invaziv cu scor IHC 3+ (pozitiv).

Lotul de studiu a fost reprezentat de 49 de pacienți cu carcinom mamar invaziv, respectiv 51 de specimene distincte prelevate, cu vârstă cuprinsă între 32 și 80 de ani, cu o medie de vârstă de 57.625 ani și o mediană de 60 de ani. Distribuția vârstei pacienților este detaliată în Figura 5.

Din punctul de vedere a distribuției pe sexe 97,95 % din subiecți au fost de sex feminin. Două din aceste cazuri au prezentat carcinoame mamare bifocale și un caz a prezentat carcinoame mamare bilaterale. Astfel, în final, au fost examinate 51 de formațiuni tumorale provenite de la acești pacienți.

Din punct de vedere al localizării formațiunii tumorale peste 92% din specimene au fost recoltate de la nivelul parenchimului mamar (Figura 6).

Din punct de vedere al tipului de material examinat 68,62% din secțiunile examinate au fost reprezentate de specimene biopsice, iar restul au fost specimene de excizie (Figura 7).

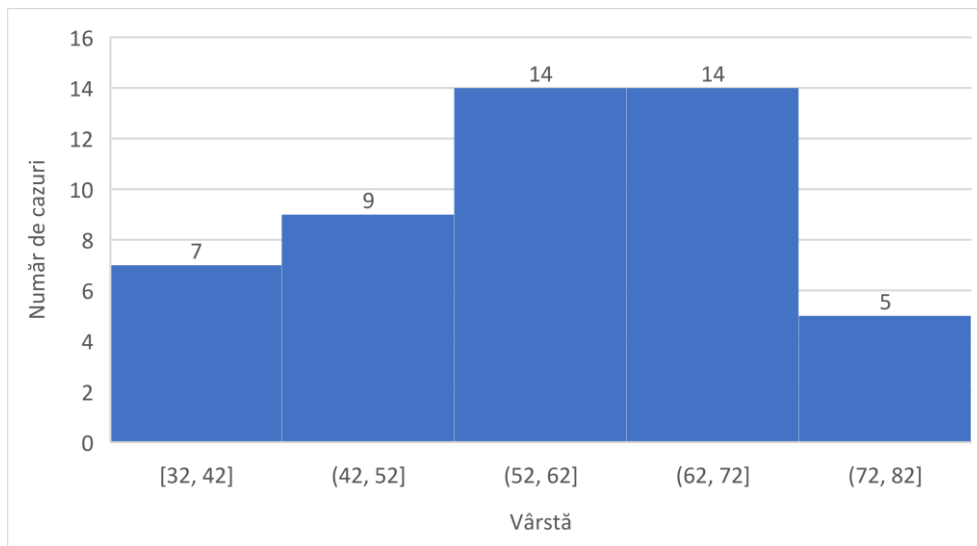


Figura 5. Distribuția vârstei pacienților

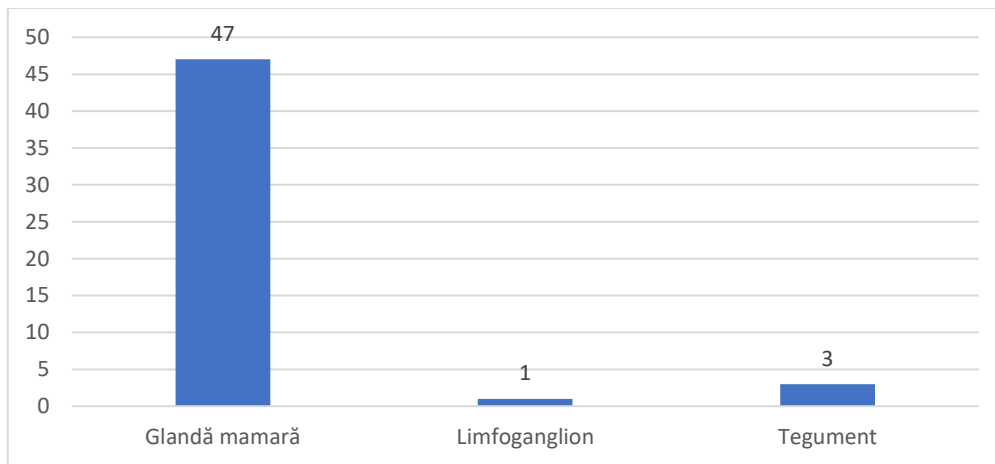


Figura 6. Localizarea anatomică a proliferării tumorale

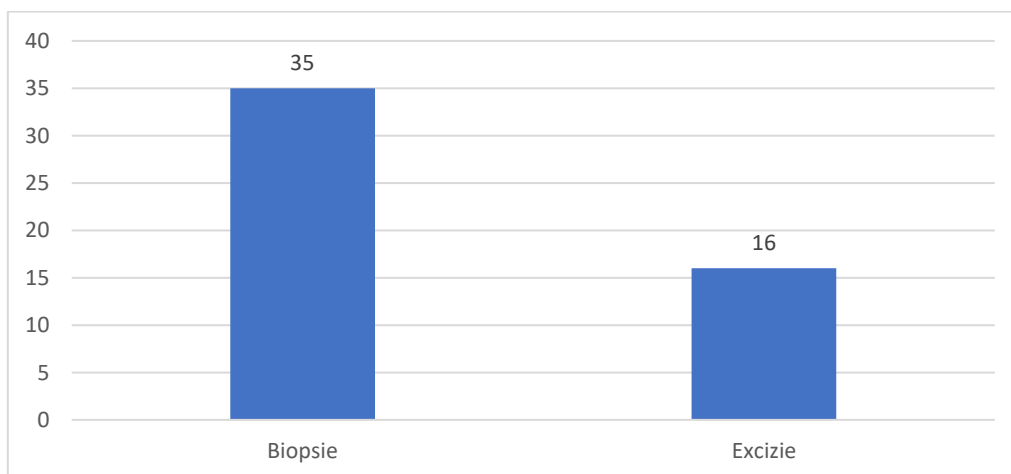


Figura 7. Tipul de material tisular examinat

Din punct de vedere al tipului histologic majoritatea cazurilor au fost reprezentate de carcinoame mamare invazive NST/ductal invazive ("No special type"), urmate de carcinoamele lobulare (Figura 8). Din cele 6 cazuri de carcinoame lobulare invazive, 2 au fost reprezentate de carcinoame lobulare invazive pleomorfe. Din categoria de carcinoame invazive mixte un caz a fost reprezentat de tipul NST + mucinos, un caz de tipul mucinos+NST+cribriform+micropapilar, un caz de carcinom invaziv NST+cribriform și un caz de carcinom invaziv NST+lobular invaziv. Pentru un caz nu s-a realizat încadrarea într-un subtip histologic.

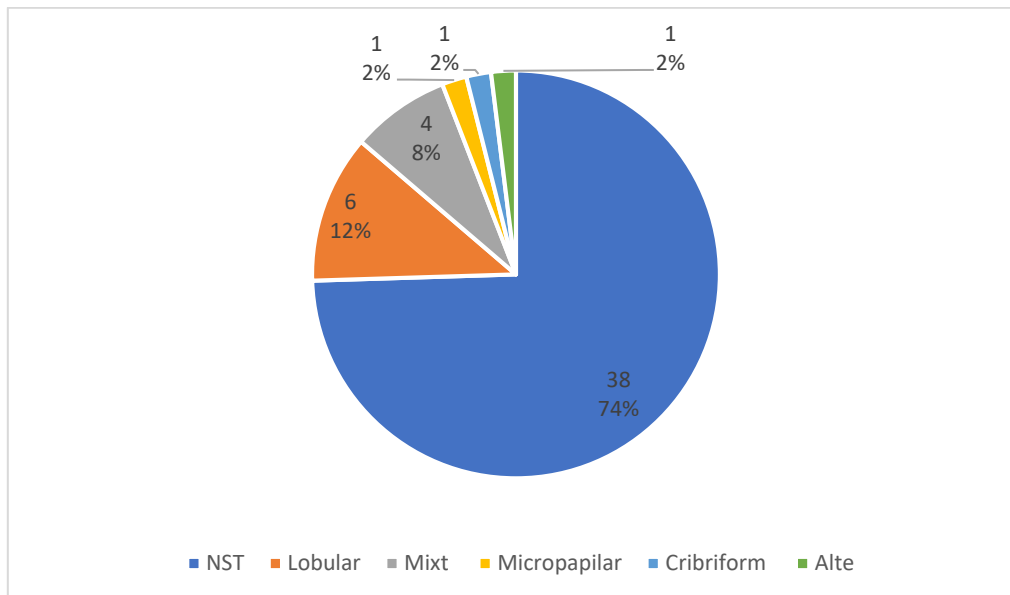


Figura 8. Distribuția tipurilor histologice în lotul examinat

Distribuția lotului în funcție de gradul Nottingham este detaliată în Figura 9. Pentru două cazuri gradarea nu a fost realizată. Majoritatea cazurilor (68%) au fost reprezentate de carcinoame de grad înalt, respectiv grad Nottingham 2 sau 3 (Figura 9).

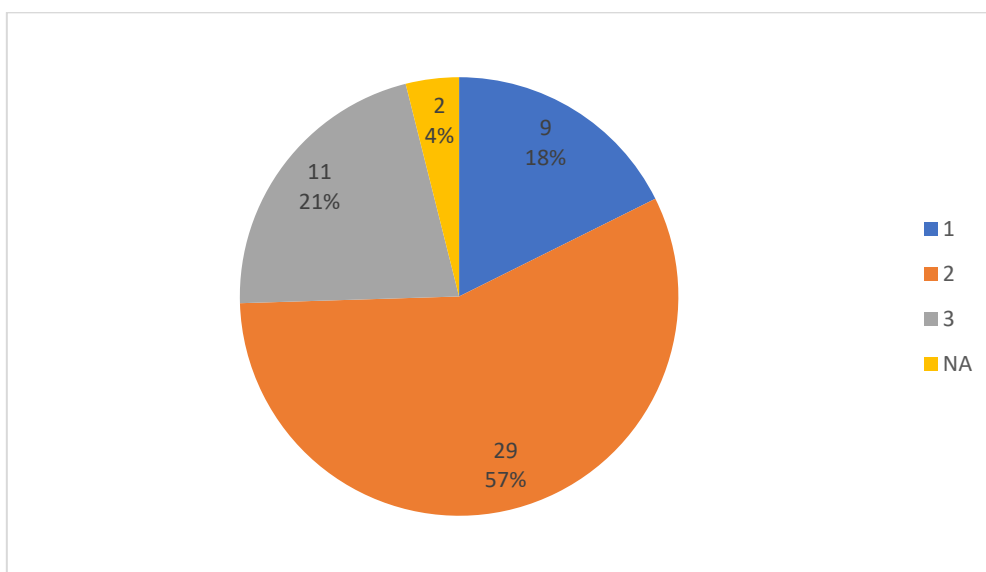


Figura 9. Distribuția cazurilor în funcție de gradul Nottingham

Din punct de vedere imunohistochimic, expresia RE si RP este prezentată în Tabelul 3. Patru cazuri examinate au fost negative pentru RE si RP având un scor Allred 0. Noua cazuri nu au exprimat RP.

Scor Allred Estrogen	Număr de cazuri	Scor Allred Progesteron	Număr de cazuri
0	4	0	9
4	1	3	1
7	9	4	4
8	37	5	6
		6	5
		7	5
		8	21

Tabelul 3. Distribuția scorului Allred pentru RE și RP

Din punct de vedere al expresiei proteinei HER2, majoritatea cazurilor evaluate au avut un scor IHC 2+ (echivoc). De asemenea, au fost incluse în lotul studiat și cazuri cu scorul 1+ (negativ) și 3+ (pozitiv) (Figura 10).

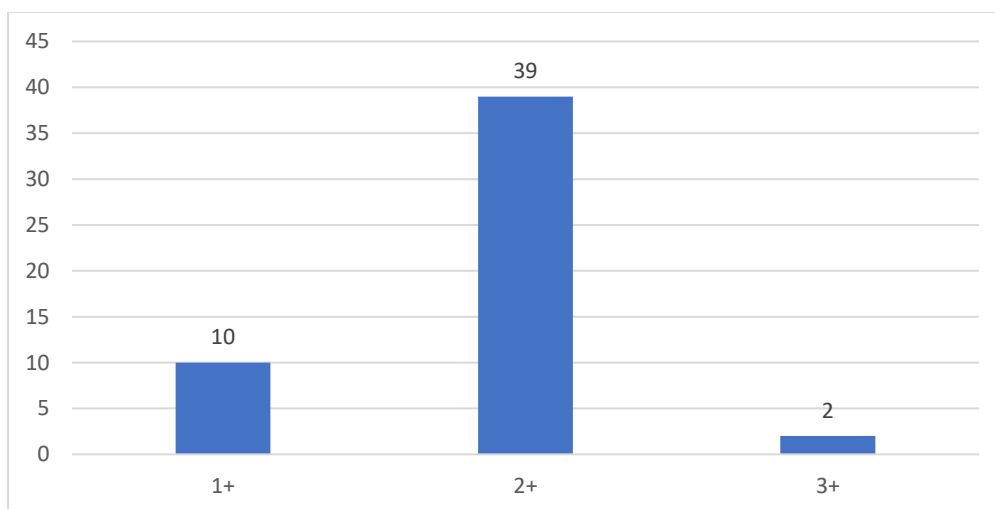


Figura 10. Expresia IHC a HER2 în lotul studiat.

Toate cazurile studiate au fost evaluate concomitent și prin tehnica de hibridizare in situ cu fluorescență (FISH). Evaluarea cazurilor s-a realizat conform recomandărilor ASCO/CAP 2018. În Figura 11 este sumarizată încadrarea cazurilor în grupele HER2 ASCO/CAP.

În conformitate cu recomandările ASCO/CAP 2018 evaluarea statusului final al HER2 pentru fiecare caz în parte se realizează după evaluarea concomitentă a scorului IHC și a rezultatelor hibridizării in situ. Astfel, pentru grupele ASCO/CAP 2, 3 și 4 se recomandă evaluarea în paralel a rezultatelor IHC și FISH. Încadrarea finală a cazurilor este prezentată în Figura 12.

Distribuția Ki-67 în lotul examinat este prezentată în figura 13. Valoarea Ki-67 a fost evaluată pentru 48 din tumorile incluse în studiu. Valoarea Ki-67 a variat între 5% și 65% cu o medie de 26% și cu o mediană de 21%.

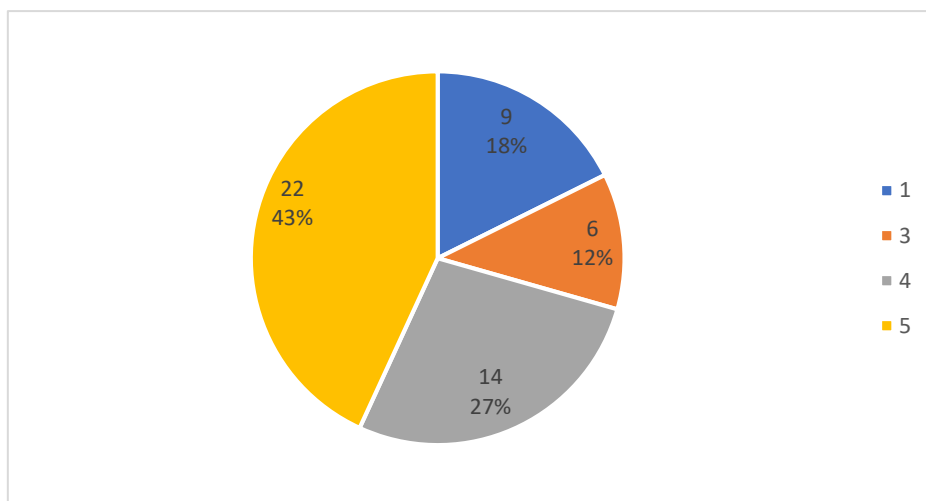


Figura 11. Încadrarea cazurilor în Grupurile ASCO/CAP HER2 pentru hibridizarea in situ.

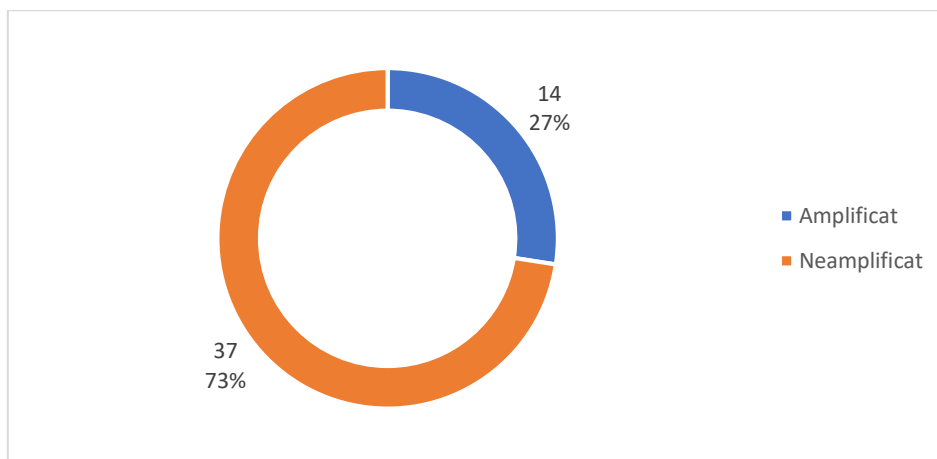


Figura 12. Distribuția cazului în funcție de rezultatele testării HER2.

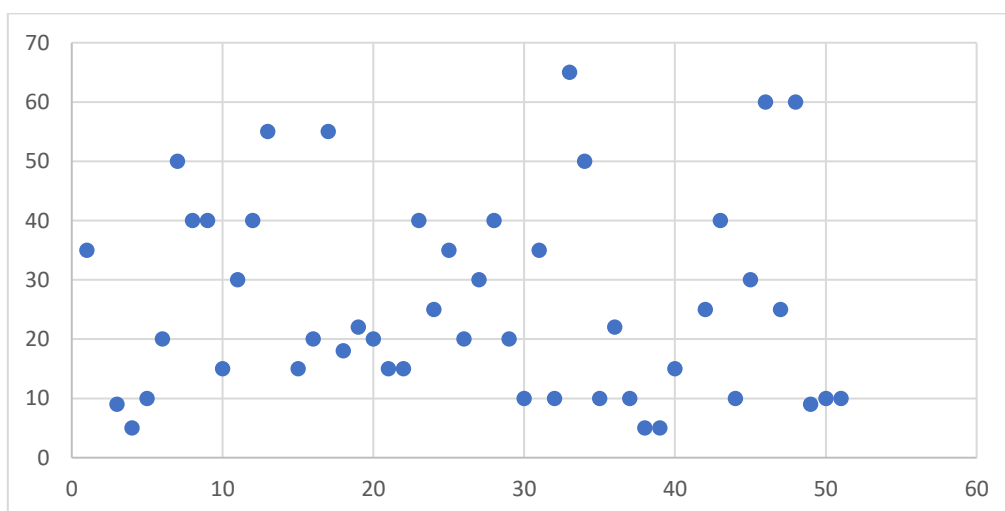


Figura 13. Distribuția valorilor expresiei proteinei Ki-67.

Activitatea 3.2.

În cadrul acestei activități am efectuat testarea carcinomului invaziv al sânului prin utilizarea protocolului de coloranți fotocromici pentru evaluarea statusului HER2 în cele 50 de cazuri de carcinom invaziv al sânului folosind FICTION.

Pacienți și metode. Criterii de includere:

- Pacienți diagnosticați cu carcinoame invazive ale glandei mamare
- Examinarea histopatologică realizată în Laboratorul de Anatomie Patologică al IOCN
- Statusul receptorilor estrogenici, progesteronici, HER2 și valoarea Ki-67 cunoscută și evaluată în cadrul în Laboratorul de Anatomie Patologică al IOCN
- Cazuri care au fost evaluate prin IHC și prin metoda FISH pentru evaluarea expresiei proteinei HER2 și pentru evaluarea statusului genei HER2
- Cazuri care au fost evaluate prin metoda FICTION

În cele ce urmează vom prezenta caracteristicile produselor selectate pentru protocolul de colorații fotocromice. Am selectat acești 3 compuși deoarece aceștia au stabilitate termică excelentă, toți 3 având puncte de topire peste 100 °C. Toți compușii au fost recepționați sub formă de pulbere. Produsul A 1,2-Bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentene este sub formă de pudră cristalină. Proprietățile fotocromice ale produsului se manifestă și în această stare. Astfel pudra de culoare albă, după expunerea la radiații ultraviolete (lumină cu o lungime de undă de aproximativ 395 de nanometri sau la lumina emisă prin filtrul DAPI), își schimbă culoarea într-o pudră culoare albastră.

Denumirea produsului	1,2-Bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentenă (purificat prin sublimare)
Puritate / Metodă de analiză	>99.0%(GC)
Formula moleculară / Greutate moleculară	C ₂₉ H ₂₂ F ₆ S ₂ = 548,61
Starea fizică (20 grade. C)	Solid
Condiție de evitat	Sensibil la lumină
PubChem Id-ul substanței	354334835
Aspect	Pudră cristalină albă spre albastru
Puritate	min. 99.0 %
Punct de topire	129.0 - 133.0 °C

Tabelul 4. Caracteristicile produsului A (1,2-Bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentene) (1)

Produsul B (2,3-Bis(2,4,5-trimethyl-3-thienyl)maleimidă) este sub formă de pudră cristalină. Proprietățile fotocromice ale produsului se manifestă și în această stare. Astfel pudra de culoare galbenă, după expunerea la radiații ultraviolete, folosind un microscop cu fluorescență și lumina emisă prin filtrul DAPI (4, 6-Diamidino-2-Phenylindole HCl) (lumină cu o lungime de undă de aproximativ 372 de nanometri), își schimbă culoarea într-o pudră de culoare maronie. Acest comportament a fost unul surprinzător deoarece specificațiile producătorului arată faptul că virarea

de culoare ar trebui să fie spre o nuanță de verde (tabelul 5). De asemenea am observat că după expunerea prelungită de peste 5 minute la lumina activatoare modificarea de culoare este permanentă spre o culoarea brună.

Denumirea produsului	(2,3-Bis(2,4,5-trimethyl-3-thienyl)maleimidă) (purificat prin sublimare)	
Puritate / Metodă de analiză	>>97.0%(T)(HPLC)	
Formula moleculară / Greutate moleculară	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂ S ₂ = 345.48	
Starea fizică (20 grade. C)	Solid	
Condiție de evitat	Sensibil la lumină	
PubChem Id-ul substanței	354334835	
Aspect	Pudră cristalină galben spre verde	
Puritate	min. 97.0 %	
Punct de topire	78.0 - 182.0 °C	

Tabelul 5. Caracteristicile produsului B (1,2-Bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentene) (1)

Produsul C (1,2-Bis[2-methylbenzo[*b*]thiophen-3-yl]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentenă) este sub formă de pudră cristalină. Proprietățile fotocromice ale produsului se manifestă și în această stare. Astfel pudra de culoare gălbuie, după expunerea la lumină ultraviolete, folosind un microscop cu fluorescență și lumina emisă prin filtrul DAPI (4, 6-Diamidino-2-Phenylindole HCl) (lumină cu o lungime de undă de aproximativ 372 de nanometri), își schimbă culoarea într-o pudră culoare roșie.

Denumirea produsului	(1,2-Bis[2-methylbenzo[<i>b</i>]thiophen-3-yl]-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentenă)	
Puritate	>>97.0%	
Formula moleculară / Greutate moleculară	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂ S ₂ = 345.48	
Starea fizică (20 grade. C)	Solid	
Condiție de evitat	Sensibil la lumină	
PubChem Id-ul substanței	354334835	
Aspect	Pudră cristalină galben spre roșu	
Puritate	min. 97.0 %	
Punct de topire	157-162 °C	

Tabelul 6. Caracteristicile produsului C (1,2-Bis(2,4-dimethyl-5-phenyl-3-thienyl)-3,3,4,4,5,5-hexafluoro-1-cyclopentene) (1).

De asemenea, am observat și pentru acest produs că după expunerea prelungită de peste 5 minute la lumina activatoare modificarea de culoare este permanentă spre o culoarea brună. Pentru acest produs am observat o stabilitate foarte redusă a activării (sub 12 ore). Pentru produsele A și B am observat o durată de cel puțin 72 de ore de stabilitatea colorării.

Pe lângă cei 3 produși descriși am utilizat de asemenea 2 produși care sunt disponibili comercial și pentru care informațiile disponibile furnizate de producători au fost foarte reduse. Proprietățile acestora observate de către noi au fost sumarizate în tabelul 7.

Proprietate	Produs D	Produs E
Stare fizică	Pudră cristalină	Soluție apoasă
Culoare în stadiul inactiv	Albă	Albă
Culoare în stare activate	Albastru-verzui	Albastră/Magenta
Metoda de activare	Expunere la lumină UV (395 nm)	Expunere la lumina UV (395 nm)
Grad de puritate	Necunoscut	Necunoscut
Furnizor/producător	SC Albacom Biz SRL, Alba-Iulia, România	Stardust Colors SAS, Saint Laurent des Arbres, Franța
Denumire comercială	Pigment fotocromic, sensibil solar, baza de apa, Culoare : Verde	Vopsea Fotocromică - FOTOCROMICĂ : Albastru/Roșu Magenta

Tabelul 7. Proprietățile produselor D și E.

Produsele D și E sunt produse care sunt disponibile direct sub formă comercială gata de utilizat și sunt destinate în principal acoperirii suprafețelor metalice. Acest tip de produse sunt disponibile publicului larg. Pentru ambele tipuri de produse am observat activitatea fotocromică menționată mai sus după expunerea la lampa cu lumina ultravioletă. Produsul D a fost diluat în mediu apos inițial și ulterior în mediu bazat pe soluția alcoolică. Etalarea pe lama de sticlă s-a realizat cu ușurință, însă după evaluarea microscopică și chiar aprecierea macroscopică am observat faptul că nivelul de impuritate a produsului era foarte ridicat. Imagini microscopice cu produsul etalat sunt prezentate în figura 14.

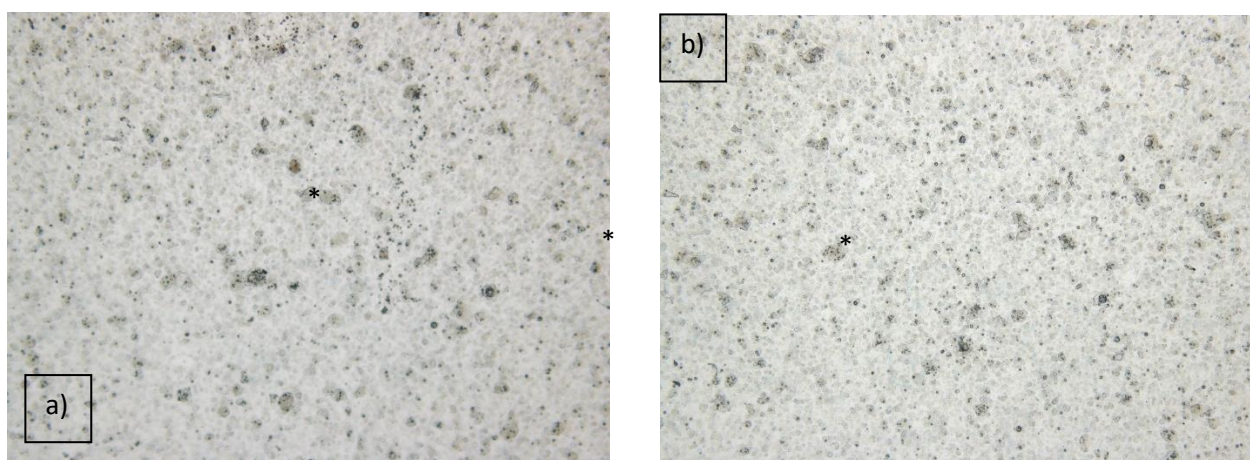


Figura 14. a) Aspectul microscopic al lamei după dizolvarea și etalarea produsului D; se observă un important fond de impurități de culoare neagră alături de vopsea fotocromică în formă cristalină, nedizolvată (marcate cu asterix*). b) Aspectul microscopic al lamei după etalarea produsului E; se observă un important fond de impurități de culoare neagră alături de vopsea fotocromică în formă cristalină, nedizolvată (marcate cu asterix*).

Activarea s-a realizat cu ușurință după aproximativ 3 secunde de la expunerea la ultraviolete. Stabilitatea produsului la lumina naturală sau artificială este una extrem de redusă decolorarea începând aproape instantaneu. În figura 15 este prezentată secvența de activare a produsului.

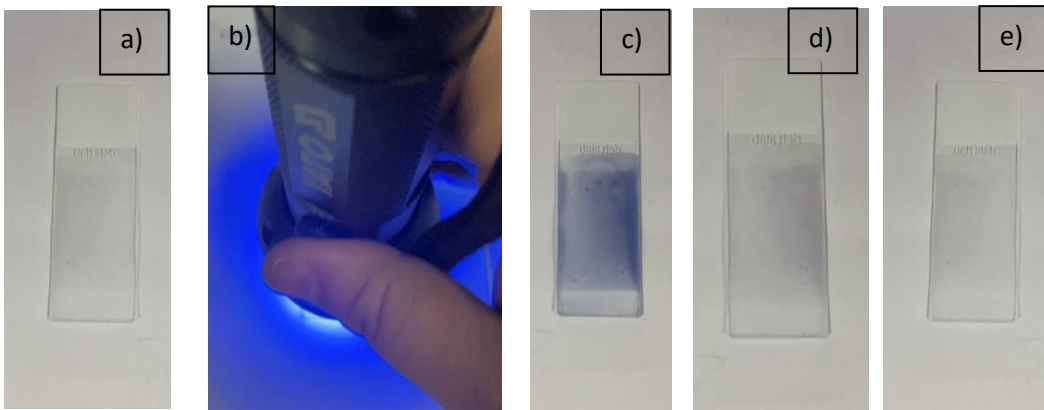


Figura 15. a) Lama pe care se observa preparatul D etalat in stare inactivă; se observă pelicula de colorant semitransparentă; b) expunerea la lumină ultravioletă (lungime de unda de 3095 nm) timp de 5 secunde ; c) lamă cu preparatul activat se observă modificarea de culoare spre o nuanță de albastru; d) decolorare parțială la aproximativ 25 de secunde de la momentul activării; e) decolorarea completă la 30 de secunde de la momentul activării.

Secvența de activare pentru cele 2 preparate (preparatele D și E) este una similară. Mai mult decât atât, durata colorației este, de asemenea, una similară fiind extrem de scurtă și pentru preparatul E. Acestea cuplate cu gradul crescut de impuritate ne-a făcut să renunțăm complet la utilizarea de soluții bazate pe aceste 2 preparate și, de asemenea, prezența acestor impurități în îndreptat către preparatele grad înalt de puritate (preparatele A,B,C). Un factor decisiv a fost durata redusă de stabilitate a vopselei în forma activată în mediul controlat de lumină artificială și temperatura, caracteristici care nu au fost compatibile cu activitățile propuse.

După analiza materialului tisular disponibil am observat că am rămas cu suficient material pentru testare din lotul inițial doar pentru 44 de cazuri. Testarea s-a realizat etapizat folosind diferiți compuși și diferite pelicule active fotocromice. În prima etapă am testat randamentul produsului B folosind o peliculă dublă alcătuită din 2 straturi primul dintre ele fiind reprezentat de lac acrilic, care s-a utilizat pentru solubilizarea compusului B. Am utilizat activarea permanentă rezultată prin expunerea la lumină filtrată prin filtrul DAPI. Am utilizat de asemenea un strat protector de rășină epoxidică așezat peste stratul de produs fotocromic.

Etapa I. Realizarea colorațiilor IHC

Colorația IHC a fost realizată folosind protocolul standard și utilizând aparatul Ventana Benchmark Ultra. Am utilizat clona CAL27 (Abcam) pentru anticorpul primar pentru a avea o mai bună suprapunere cu protocolul FICTION. Am utilizat titrarea manuală a anticorpului primar și protocolul de lucru a fost oprit la pasul de contracolorare cu hematoxină.

Din păcate cazurile testate nu au putut fi analizate deoarece pelicula de vopsea fotocromică a fost parțial dizolvată de solvenții care au pătruns sub stratul de protecție de rășină epoxidică prin partea laterală a acestuia și au dizolvat stratul de vopsea activă.

În această etapă am testat 15 cazuri. Pentru 4 cazuri materialul tisular s-a epuizat.



Figura 16. Detașare parțială sau completă a peliculei active sau a peliculei de protecție.

Etapa a II-a și a III-a

În etapa II am adus îmbunătățiri peliculei de vopsea astfel încât nu a mai fost necesară utilizarea unui strat suplimentar de protecție. Am utilizat tetrahidrofuran($(\text{CH}_2)_4\text{O}$) ca solvent pentru colorantul fotocromic, într-o concentrație de 50 de miligrame/0.3 ml. Am utilizat un singur strat în care am putut să includem atât colorantul cât și rușina epoxidică de protecție. Protocolul de lucru a fost similar cu cel prezentat anterior. Am utilizat, de asemenea, silanarea peliculei de vopsea fotocromică, conform protocolului detaliat mai jos la activitatea A.3.4. Am utilizat produsul B, activat permanent.

În etapa a III-a pentru a obține o suprafață plană și pentru a permite o cât mai bună silanare, am utilizat o lamelă de sticlă pe care am aplicat-o în momentul etalării peliculei de vopsea fotocromică amestecată cu rășină epoxidică. În etapa a III-a am utilizat preparatul A, care a fost activat după realizarea tehnicii IHC și anterior decolorării cromogenului. Pentru decolorare am utilizat protocolul detaliat în activitatea 3.4.

Nr caz	HER2 IF-FICTION	Etapa I / Material epuizat	HER2 Fotocromic etapa II	HER2 Fotocromic etapa III	DDSIH etapa II- Fotocromic	DDSIH etapa III- Fotocromic	Contrast HER2
22	2+		0		-		-
41	2+		0		-		-
27	2+		0		-		-
23	2+		0		-		-
15	2+		0		-		-
2	2+		0		-		-
13	2+		0		-		-
35	2+		1+		semnale absente		absent
16	2+		1+		semnale absente		absent
48	2+		2+		semnale centromerice absente		focal
49	2+		2+		semnale prezente		focal
50	2+		2+		semnale prezente		focal
21	2+		2+		semnale absente		absent
17	2+		2+		Silver dust		absent
47	2+		3+		detaşare		absent
3	3+		3+		detaşare		absent
43	2+		detaşare		-		-
40	2+			0		-	-
30	2+			0		-	-
19	2+			0		-	-
39	1+			1+		semnale absente	absent
37	2+			1+		semnale absente	absent
38	2+			2+		Silver dust	focal
34	2+			2+		Silver dust	absent
33	2+			2+		semnale centromerice absente	absent
42	2+			2+		semnale absente	absent
6	2+			2+		semnale absente	absent
12	2+			2+		semnale absente	absent
7	2+			2+		Silver dust	absent
10	2+			2+		Silver dust	absent
11	2+			2+		Silver dust	absent
4	2+			2+		Silver dust	absent
36	1+	x					
32	2+	x					
44	epuizat	epuizat					
31	1+	x					
46	2+	x					
45	epuizat	epuizat					
20	2+	x					

28	2+	x					
25	2+	x					
29	2+	x					
26	2+	x					
24	2+	x					
18	1+	x					
14	2+	x					
1	2+	x					
5	2+	x					
8	epuizat	epuizat					
9	2+	epuizat					

Tabelul 8. Sumarizarea rezultatelor comparative între tehnica FICTION și protocolul de lucru care utilizează lame cu peliculă activă fotocromică.

Pentru etapa II am reușit să evaluăm comparativ rezultatele testării IHC din cele 2 examinări. Am găsit un nivel de concordanță de 32,5 %. Cu toate acestea, trebuie să luăm în considerare faptul că majoritatea elementelor discordante au fost datorate absenței complete a marcajului imunohistochimic. Dacă eliminăm cazurile cu marcaje absente, rata de concordanță este de 66 %. Diferența dintre cele 2 tehnici poate fi explicată mai ales prin faptul că pentru o bună parte din cazuri tehnica IHC a eșuat. Mai probabil, ținând cont că am utilizat o etalare manuală a peliculei, acest fapt poate fi explicat prin grosimea inegală și lipsa de planeitate a suprafeței pe care preparatul a fost etalat.

Pentru a depăși acest inconvenient, în etapa a III-a am utilizat o peliculă identică pe care am suplimentat-o cu lamelă de sticlă pe care silanarea s-a putut realiza mult mai bine probabil și care a conferit o suprafață perfect plană. Dincolo de acestea, evaluarea rezultatelor IHC pentru protocolul care utilizează lame fotocromice presupune aprecierea colorației în absența unui fond de contracolorare cu hematoxilina ceea ce a avut impact cu siguranță asupra rezultatelor evaluării. De asemenea, am fost obligați să utilizăm doar obiectivele mici pentru evaluarea HER2. Rata de eșec pentru etapa a III-a a fost mult mai mică. Astfel analiza comparativă a arătat o concordanță de aproape 92% după eliminarea cazurilor cu rezultat 0 considerat eșec al tehnicii.

Tehnica DDISH a fost evaluată pe 21 cazuri. Din aceste cazuri doar aproximativ 20% am avut semnale care ar putea fi interpretate(4/21). Am atribuit această rată redusă de succes a tehnicii mai probabil grosimii suplimentare adăugate de această pelicula. Ținând cont de aceste observații este necesară obținerea unei pelicule mai subțiri în limitele de toleranță ale aparatului automat de hibridizare in situ pentru a putea repeta testarea.

Am putut, de asemenea, să evaluăm prezența unei diferențe de contrast între zonele care au fost protejate de activarea prin expunere la lungimea de undă corespunzătoare, prin prezența cromogenului utilizat în timpul tehnicii IHC față de zonele care au fost activate complet. Astfel în aproximativ 24% din cazuri am reușit să identificăm cel puțin focal sau izolat un contrast suficient pentru a putea identifica zonele care exprimă HER2 (Figura 17).

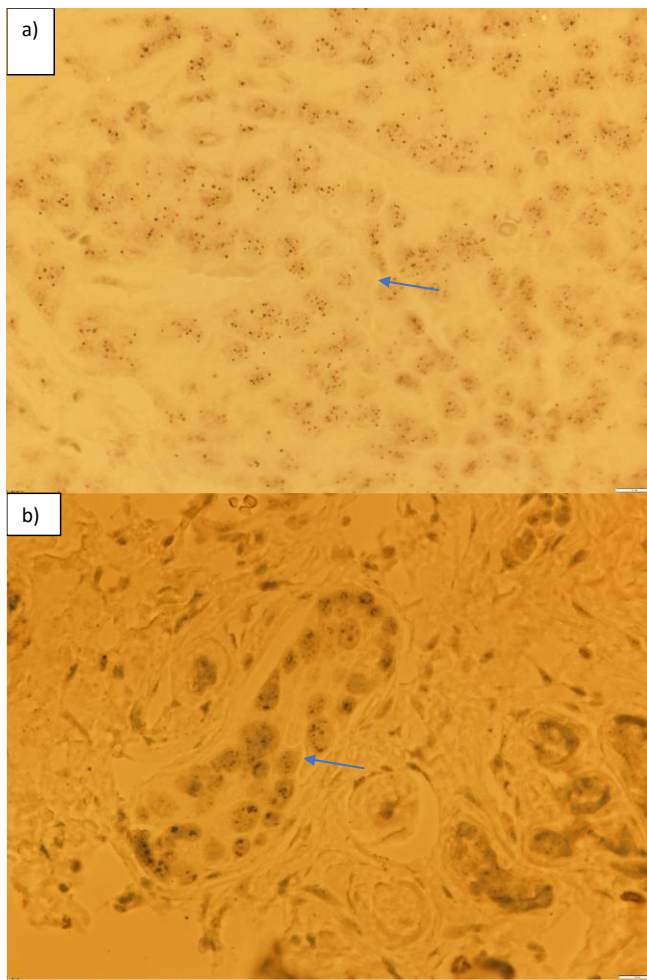


Figura 17. Protocol de testare fotocromică, carcinom mamar invaziv , notați prezenta de zone liniare de culoare mai deschisă(marcate cu săgeți albastre) comparativ cu fondul de culoare mai închisă.

Activitatea 3.3.

În cadrul acestei activități am realizat diseminarea rezultatelor obținute în cadrul proiectului. Astfel am pregătit un articol intitulat "**FICTION technique - a candidate for the assessment of the HER2 status in breast invasive carcinomas**" pe care l-am înaintat pentru publicare în Revista *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, care este specializată în tehnologiile de identificare și detecție recent dezvoltate și aplicațiile acestora în cercetare și diagnosticare pentru imunohistochimia aplicată și morfologia moleculară. Aceasta este indexată în Web of Science (ISI) și are un Factor de Impact de 1.992:

<https://journals.lww.com/appliedimmunohist/pages/default.aspx>

Rezumatul articolului:

Scopul acestui studiu a fost de a evalua tehnica FICTION ca un posibil candidat pentru evaluarea statusului HER2 în carcinoamele invazive de sân (IBC), în contextul actualizării în 2018 a ghidurilor de testare HER2 și a o compara cu imunohistochimia secvențială standard - tehnici de testare de rutină a hibridizării in situ. Grupul de studiu a fost reprezentat de 49 de paciente

diagnosticate cu cancer mamar invaziv. Analiza comparativă pentru testele de imunohistochimie (IHC) și imunofluorescență (IF) a arătat diferențe semnificative (83,67% concordanță categorială între IHC și IF), iar procentul de celule care au prezentat orice grad de exprimare a proteinei HER2 folosind cele două tehnici a fost 60,71% IHC vs. 73,77% pentru IF ($p=0,00026$). S-a observat un acord foarte bun pentru testul de hibridizare in situ. Sonda centromeră (CEP17), numărul mediu de copii HER2 și rapoartele HER2/CEP 17 au arătat în mai mult de 90% o concordanță atunci când au fost evaluate prin utilizarea graficelor Bland-Altman. Concordanța clasificării cazurilor de grup ASCO/CAP prin utilizarea ambelor teste ISH (FICTION și FISH standard) a fost ridicată (85,7%). Impactul asupra clasificării finale a cazurilor pentru statutul HER2 nu a fost semnificativ deoarece acordul a fost de 100% pentru clasificarea finală a cazurilor (HER2 pozitiv/negativ). Studiul nostru a relevat un acord moderat între rezultatele IHC și IF ale evaluării expresiei proteinei HER2 și un acord excelent între examinarea ISH a celor două tehnici, cu impact minim asupra numărului de copii pentru ambele sonde centromerice și HER2, fără impact asupra statusului final HER2 a cazurilor.

La momentul redactării acestui raport articolul este în curs de evaluare.

Activitatea 3.4.

Această activitate a constat în efectuarea IHC dual și a testelor cu coloranți fotocromici pe cazurile de limfom selectate în activitatea A2.5.

Efectuarea colorațiilor duble imunohistochimice

Pentru această activitate s-au utilizat cazurile selectate din cele prezentate la activitatea A2.5. Aceste cazuri au fost de asemenea utilizate și incluse în cazurile prezentate în cadrul activității 3.1.

Protocolul imunohistochimic de dublă colorare automată

Blocurile de parafină selectate au fost secționare la o grosime de 4 micrometri. Secțiunile obținute au fost etalate pe lame silanate și incubate peste noapte la 37 °C. Deparafinarea s-a realizat folosind 2 băi succesive de xilen, urmate de 3 băi succesive de alcool în concentrație crescândă (75%, 85% 95%) și spălare. Lamele ulterior au fost introduse în automatul de colorare Ventana Benchmark Ultra. Protocolul de lucru a fost cel prezentat în Figura 18.

Protocol # 180 : PAX5 DAB -CD20 RED (09/24/2022)
Version: 1 Validated: No Active: Yes
Procedure: U IHC DS uDAB-uRed v2 (v1.02.0016)
 BenchMark ULTRA IHC/ISH
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania

Step No	Procedure Step
1	Enable Mixers
2	Disable Mixers
3	[Set temperature to 72°C for Default]
4	Warmup Slide to [72 Deg C] from Medium Temperatures (Deparaffinization)
5	Incubate for 4 Minutes
6	Apply EZPrep Volume Adjust
7	Rinse Slide With EZ Prep
8	Apply EZPrep Volume Adjust
9	Apply Coverslip
10	Rinse Slide With EZ Prep
11	Apply EZPrep Volume Adjust
12	Apply Coverslip
13	Rinse Slide With EZ Prep
14	Apply Depar Volume Adjust
15	Apply Coverslip
16	Enable Mixers
17	Disable Slide Heater
18	Pause Point (Landing Zone)
19	[Short - 8 Minute Conditioning]
20	Rinse Slide With EZ Prep
21	Apply Long Cell Conditioner #1
22	Apply CC Coverslip Long
23	[Set temperature to 95°C for Default]
24	Warmup Slide to [100 Deg C], and Incubate for 8 Minutes (Cell Conditioner #1)
25	Apply Cell Conditioner #1
26	Apply CC Medium Coverslip No BB
27	Apply CC Medium Coverslip No BB
28	Apply Cell Conditioner #1
29	Apply CC Medium Coverslip No BB
30	[MILD]
31	Apply Cell Conditioner #1
32	Apply CC Medium Coverslip No BB
33	Apply Cell Conditioner #1
34	Apply CC Medium Coverslip No BB
35	Apply Cell Conditioner #1
36	Apply CC Medium Coverslip No BB
37	Apply Cell Conditioner #1
38	Apply CC Medium Coverslip No BB
39	Apply Cell Conditioner #1
40	Apply CC Medium Coverslip No BB
41	Apply Cell Conditioner #1
42	Apply CC Medium Coverslip No BB
43	Apply Cell Conditioner #1
44	Apply CC Medium Coverslip No BB

* one drop is one reagent dispense
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania
 VSS v12.5.4 Build 20104.2 Printed 10/20/2022 6:19:26 PM Page 1 of 4

Protocol # 180 : PAX5 DAB -CD20 RED (09/24/2022)
Version: 1 Validated: No Active: Yes
Procedure: U IHC DS uDAB-uRed v2 (v1.02.0016)
 BenchMark ULTRA IHC/ISH
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania

Step No	Procedure Step
45	Apply Cell Conditioner #1
46	Apply CC Medium Coverslip No BB
47	[STANDARD]
48	Apply Cell Conditioner #1
49	Apply CC Medium Coverslip No BB
50	Apply Short Cell Conditioner #1
51	Apply CC Medium Coverslip No BB
52	Apply Cell Conditioner #1
53	Apply CC Medium Coverslip No BB
54	Disable Slide Heater
55	Incubate for 8 Minutes
56	Rinse Slide With Reaction Buffer
57	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
58	Apply Coverslip
59	Rinse Slide With Reaction Buffer
60	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
61	Apply Coverslip
62	Pause Point (Landing Zone)
63	Warmup Slide to 38 Deg C
64	Rinse Slide With Reaction Buffer
65	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
66	Apply One Drop of UV INHIBITOR, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
67	Rinse Slide With Reaction Buffer
68	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
69	Apply Coverslip
70	Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes (Antibody)
71	Rinse Slide With Reaction Buffer
72	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
73	Apply One Drop of [anti-PAX5 (SP34)] (Antibody), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 35 Min]
74	Rinse Slide With Reaction Buffer
75	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
76	Apply Coverslip
77	Warmup Slide to 38 Deg C
78	Rinse Slide With Reaction Buffer
79	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
80	Apply One Drop of UV HRP UNIV MULT, Apply Coverslip, and Incubate for 8 Minutes
81	Rinse Slide With Reaction Buffer
82	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
83	Apply Coverslip
84	Rinse Slide With Reaction Buffer
85	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
86	Apply One Drop of UV DAB and One Drop of UV DAB H2O2, Apply Coverslip, Incubate for 8 Minutes
87	Rinse Slide With Reaction Buffer
88	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer

* one drop is one reagent dispense
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania
 VSS v12.5.4 Build 20104.2 Printed 10/20/2022 6:19:45 PM Page 2 of 4

Protocol # 180 : PAX5 DAB -CD20 RED (09/24/2022)
Version: 1 Validated: No Active: Yes
Procedure: U IHC DS uDAB-uRed v2 (v1.02.0016)
 BenchMark ULTRA IHC/ISH
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania

Step No	Procedure Step
89	Apply One Drop of UV COPPER, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
90	Rinse Slide With Reaction Buffer
91	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
92	Apply Coverslip
93	Pause Point (Landing Zone)
94	Rinse Slide With Reaction Buffer
95	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
96	Apply Coverslip
97	Apply 900ul of Reaction Buffer
98	Warmup Slide to 90 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
99	Apply 900ul of Reaction Buffer
100	Warmup Slide to 38 Deg C, and Incubate for 4 Minutes
101	Rinse Slide With Reaction Buffer
102	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
103	Apply Coverslip
104	Rinse Slide With Reaction Buffer
105	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
106	Apply Coverslip
107	Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes (DS Antibody)
108	Rinse Slide With Reaction Buffer
109	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
110	Apply One Drop of [ANTI-CD20] (DS Antibody), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 20 Min]
111	Warmup Slide to 38 Deg C
112	Rinse Slide With Reaction Buffer
113	Apply 100ul + VA Reaction Buffer
114	Apply One Drop of UV Red UNIV MULT, Apply Coverslip, and Incubate for 12 Minutes
115	Rinse Slide With Reaction Buffer
116	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
117	Apply Coverslip
118	Rinse Slide With Reaction Buffer
119	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
120	Apply Coverslip
121	Rinse Slide With Reaction Buffer
122	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
123	Apply One Drop of UV Red Enhancer, Apply Coverslip, and Incubate for 4 Minutes
124	Apply One Drop of UV Fast Red A and One Drop of UV Red Naphthol, and Incubate for 8 Minutes
125	Apply One Drop of UV Fast Red B, and Incubate for 8 Minutes
126	Rinse Slide With Reaction Buffer
127	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
128	Apply One Drop of [HEMATOXYLIN III] (Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
129	Rinse Slide With Reaction Buffer
130	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
131	Apply Coverslip
132	Rinse Slide With Reaction Buffer

* one drop is one reagent dispense
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania
 VSS v12.5.4 Build 20104.2 Printed 10/20/2022 6:19:51 PM Page 3 of 4

Protocol # 180 : PAX5 DAB -CD20 RED (09/24/2022)
Version: 1 Validated: No Active: Yes
Procedure: U IHC DS uDAB-uRed v2 (v1.02.0016)
 BenchMark ULTRA IHC/ISH
 Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania

Step No	Procedure Step
133	Adjust Slide Volume With Reaction Buffer
134	Apply One Drop of [BLUING REAGENT] (Post Counterstain), Apply Coverslip, and Incubate for [20 Minutes]
135	Rinse Slide With Reaction Buffer
136	Apply Coverslip
137	Disable Slide Heater
138	Rinse Slide With Reaction Buffer

Figura 18. Protocolul de lucru pentru colorațiile IHC duble CD20, PAX 5(capturi din soft-ul aparatului de colorare automată).

Rezultatele testelor IHC duble

Colorațiile imunohistochimice duble au fost realizate cu succes pe 27 de blocuri de parafină. Pe 2 secțiuni colorațiile au fost pozitive pentru CD 20, însă nu s-a observat colorare nucleară pentru PAX 5. Un caz a fost pozitiv pentru PAX 5 și nu a prezentat colorare membranară pentru CD 20. De asemenea, un caz a fost foarte slab pozitiv pentru colorația pentru CD20. Cazurile negative (controalele negative) au avut fie valori mai mici de 1 %, fie au fost complet negative.

Detalierea rezultatelor pentru colorațiile imunohistochimice duble s-a realizat în formă sumarizată în Tabelul 9.

Pentru evaluarea colorațiilor fiecare lamă a fost examinată la obiectiv mic și s-a notat procentul de celule CD20 pozitive atât pe lamele colorate dublu cât și pe lamele colorate inițial. Evaluarea celor 2-a seturi de lame a fost realizată independent de către 2 examinatori, care nu au avut cunoștință unul de rezultatele celuilalt (Figura 19). S-a reușit compararea a 19 de cazuri. Pentru celelalte cazuri lame IHC utilizate pentru diagnostic fie nu au fost disponibile fie nu au fost necesare, fie colorația a eșuat.

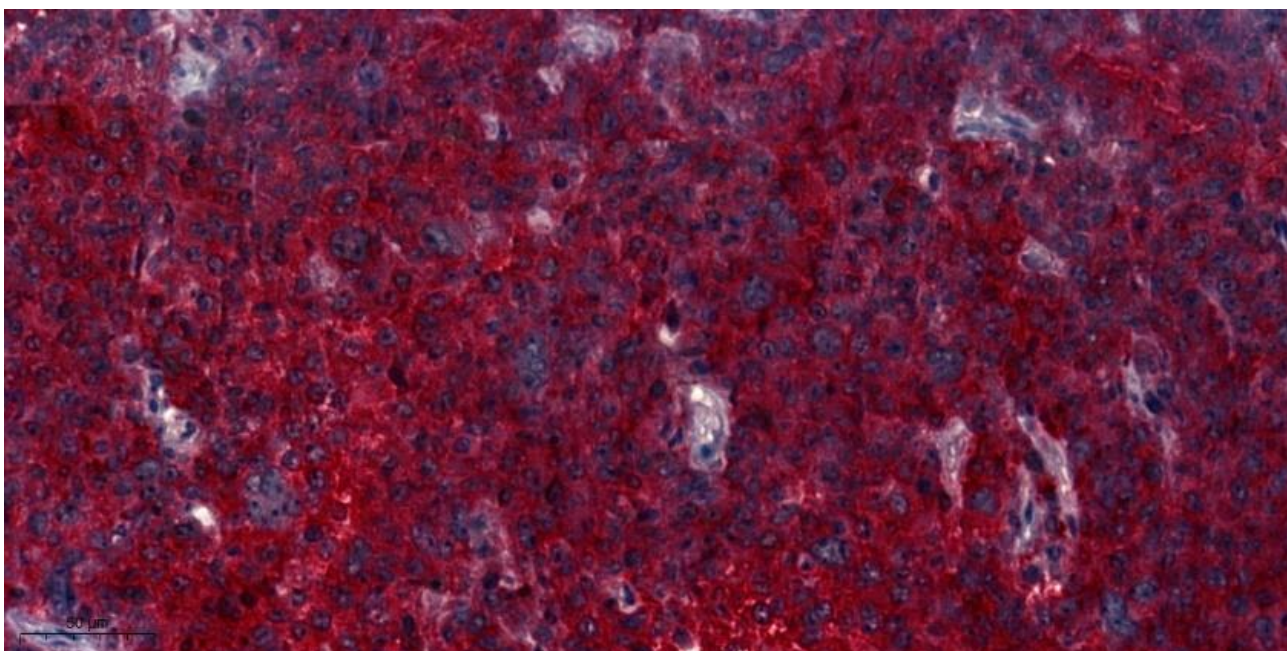


Figura 19. Limfom difuz cu celule B mari. Colorație imunohistochimică dublă CD20/PAX5. Se observă cromogenul roșu (FAST RED) care pozitivizează limfocitele B membranar. Datorită absenței expresiei nucleare a PAX5 cazul ca fost considerat ca eșec al tehnicii IHC.

Indicator caz	Colorație dubla-CD20	Colorație dubla-PAX 5	Procent CD20 (dubla)	Procent CD20 (inițial)
1	Reușita	Reușita	35	-
2	Reușita	Reușita	15	-
3	Reușita	Reușita	98	-
4	Reușita	Reușita	20	-
5	Reușita	Reușita	70	-
6	Reușita	Reușita	85	-
7	Reușita	Reușita	45	45
8	Reușita	Reușita	95	98
9	Reușita	Reușita	95	98
10	Reușita	Reușita	90	80
11	Nereușita	Reușita	-	65
12	Reușita	Reușita	40	60
13	Reușita	Reușita	50	55
14	Reușita	Reușita	60	80
15	Reușita	Reușita	25	45
16	Reușita	Reușita	98	95
17	Reușita	Reușita	75	-
18	Reușita	Reușita	0	-
19	Reușita	Reușita	95	85
20	Reușita	Reușita	40	45
21	Reușita	Reușita	95	95
22	Reușita	Reușita	70	-
23	Reușita	Reușita	95	90
24	Reușita	Reușita	<1	<1
25	Reușita	Nereușita	60	70
26	Reușita	Reușita	0	0
27	Reușita	Reușita	98	98
28	Reușita	Nereușita	55	-
29	Reușita	Reușita	60	55
30	Reușita	Reușita	30	30

Tabelul 9. Rezultatele colorațiilor IHC duble realizate folosind CD20 și PAX 5.

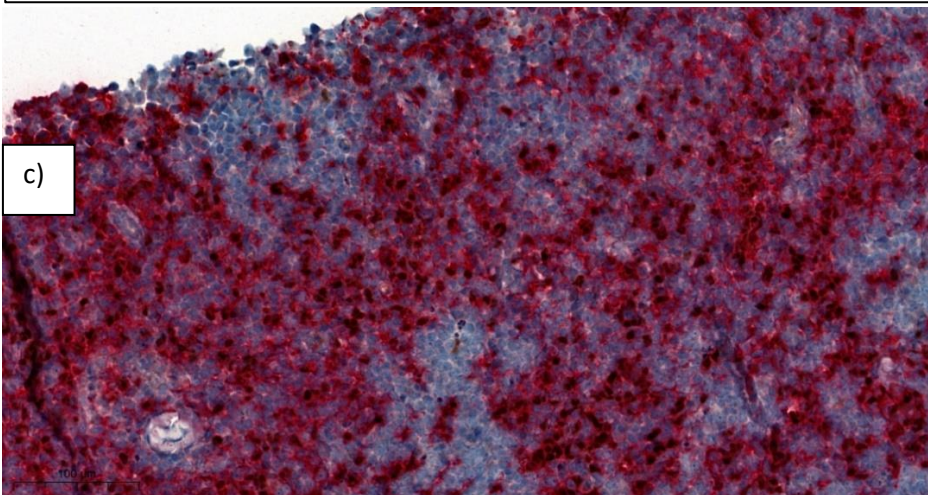
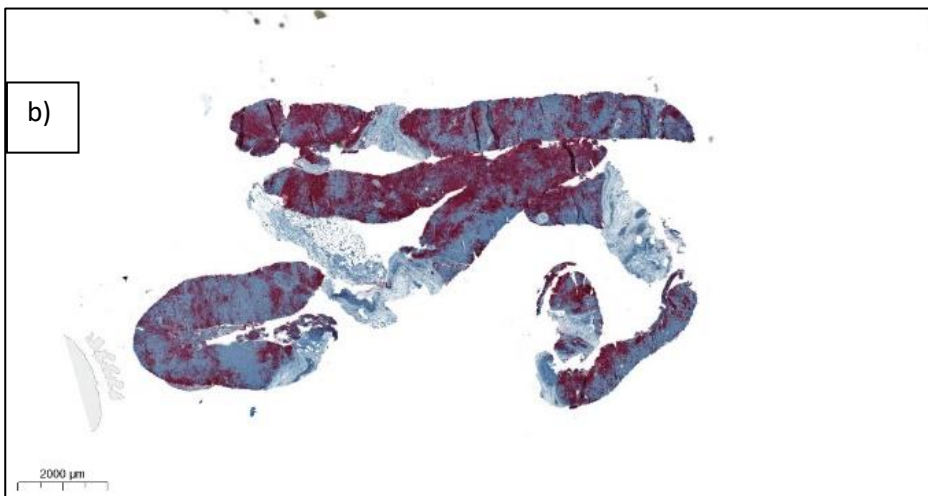
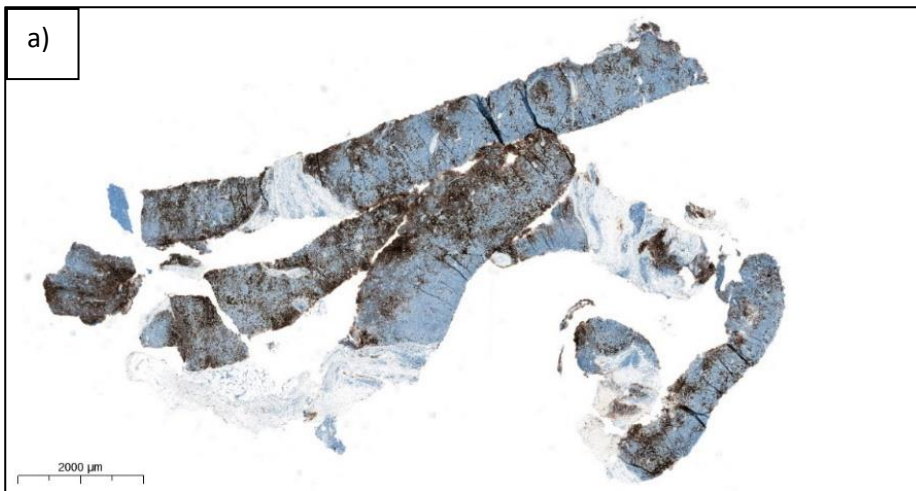


Figura 20. Limfom periferic cu celule T NOS; colorație CD20 inițială efectuată în scop diagnostic care prezintă parenchimul limfonodular netumoral; limfocitele B au fost approximate aici ca reprezentând 55 % din celularitate. b) Colorație imunohistochimică dublă CD20/PAX5; limfocitele B au fost approximate aici ca reprezentând 60 % din celularitate. c) Colorație imunohistochimică dublă CD20/PAX5 detaliu (CD20 pozitiv membranar, PAX5 pozitiv nuclear). Se observa faptul că limfocitele de talie nucleară mare sunt negative pentru cele două colorații (fiind vorba de un limfom cu celule T).

Cu toate că mediile celor 2 evaluări prezentate în tabelul 9 au fost diferite, diferențele observate nu au fost semnificative statistic în momentul în care am testat lotul folosind testul t pentru eșantioane cu variante egale. Valoarea lui p fost mai mare de 0.05.

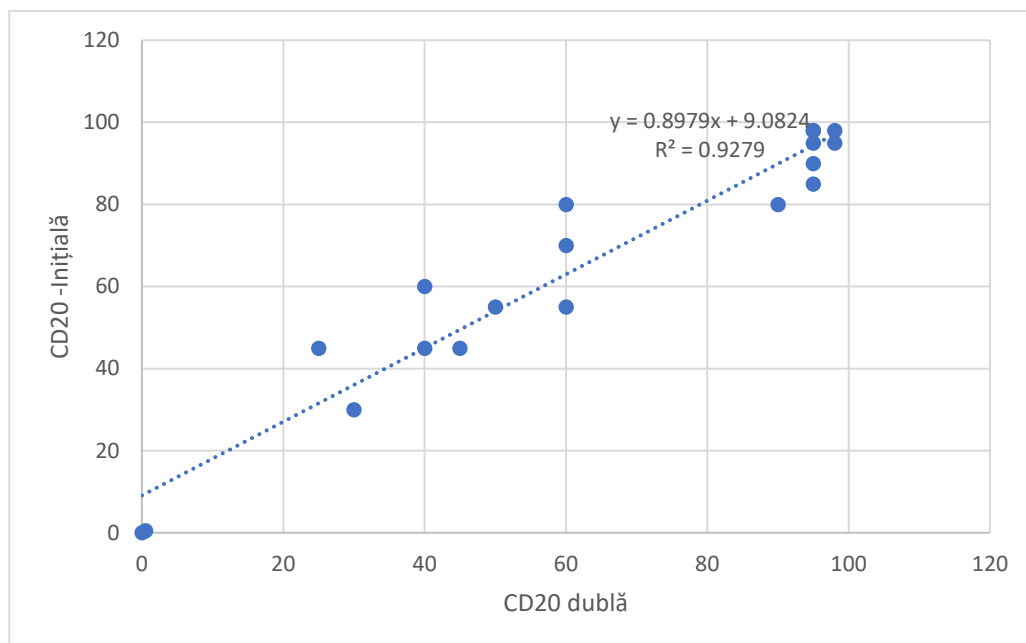


Figura 21. Scatter plot demonstrează concordanță bună pentru evaluare CD20 prin cele doua metode (IHC simplu si IHC dublu).

Am utilizat pentru evaluarea concordanței coeficientul p al lui Pearson. Astfel am obținut o valoare de 0.96 a coeficientului Pearson.

Procent CD20 (dubla)		Procent CD20 (inițial)	
Media	61.66	Media	64.44
Mediana	60	Mediana	70
Deviație standard	33.54	Deviație standard	31.26
Varianță	1125.06	Varianță	977.58
Interval	98	Interval	98
Minim	0	Minim	0
Maxim	98	Maxim	98
Număr de cazuri	19	Număr de cazuri	19

Tabelul 10. Comparatie între rezultatele colorației IHC duble și colorația inițială cu CD20

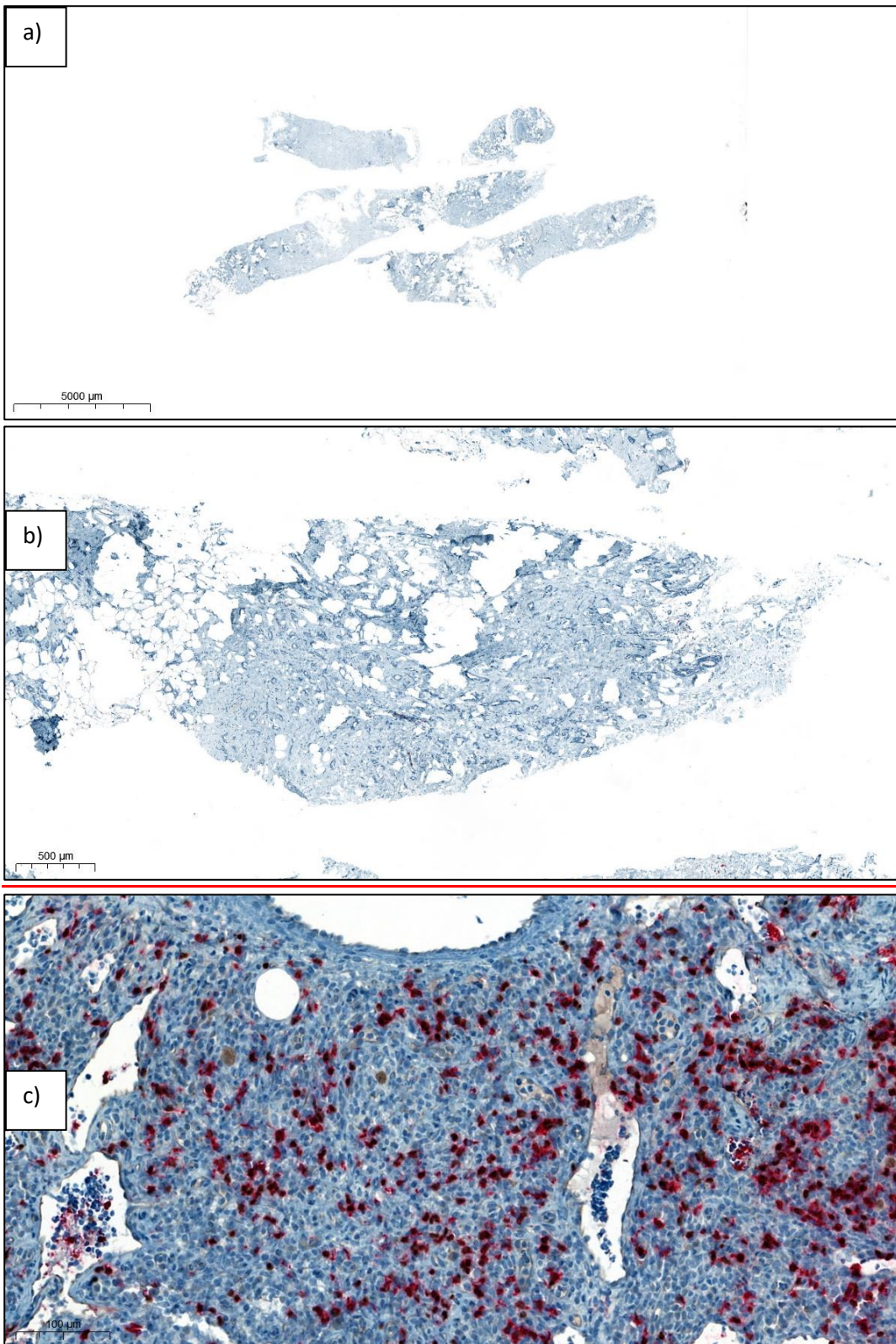


Figura 22. a) Colorație dublă IHC CD20/PAX 5; control negativ vedere de ansamblu se observă absența colorației imunohistochimice (puncție biopsie mamară, carcinom mamar invaziv cu TILS evaluat la 0%); b) Control negativ, imagine de detaliu, puncție biopsie mamară, carcinom mamar invaziv; c) Limfom Hodgkin, colorație dublă IHC (CD20, PAX5); se observă celule Reed-Sternberg și Hodgkin pozitive în colorațiile pentru PAX5 (colorație maro nucleară) și negative în colorația pentru CD20 (cromogen roșu); limfocitele B asociate exprimă CD20 și PAX5.

Aplicarea protocolului de colorație fotocromică pentru neoplaziile limfoide

Etapa I: Peliculă dublă + activare permanentă

Utilizând aceste rezultate cazurile au fost secționare din nou și au fost utilizate pentru a realiza colorațiile fotocromice. Sumarizarea protocolului de lucru folosit:

1. Realizarea peliculei de vopsea fotocromică
2. Silanarea lamelor utilizate pentru protocol
3. Realizarea colorației automate pentru CD20
4. Activarea peliculei fotocromice
5. Decolorarea lamelor pentru eliminarea cromogenului utilizat pentru CD20
6. Realizarea colorației automate pentru PAX-5

1. Realizarea peliculei de vopsea fotocromică

Realizarea peliculei de vopsea fotocromică așa cum am arătat anterior s-a dovedit a fi o provocare din mai multe puncte de vedere.

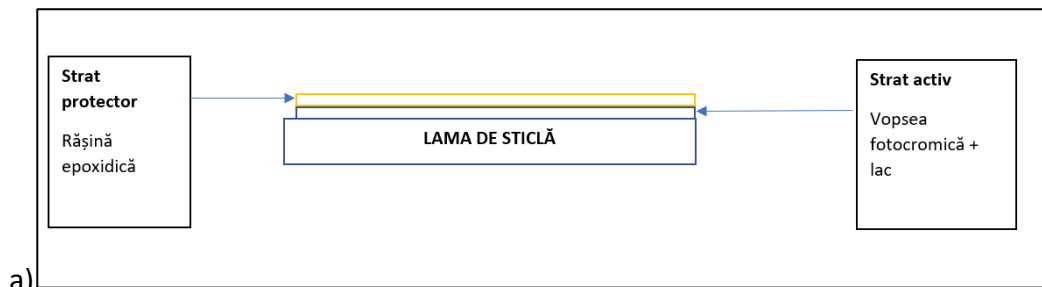
Prima dificultate întâmpinată a fost reprezentată de obținerea unui amestec potrivit pentru examinarea microscopică. Așa cum am arătat anterior, utilizarea solvenților pe bază de soluție apoasă de alcool etilic în diferite concentrații au dus la o dizolvare parțială a colorantului, ceea ce nu a permis utilizarea acestuia pentru realizarea peliculei active fotodinamic.

În urma studiului literaturii am decis să utilizăm proprietatea generală a coloranților fotocromici de dizolvare în lacuri pe baza de acril. Am utilizat un lac disponibil comercial transparent cu grad bun de etalare (Lac transparent Pentart lucios). Proprietatea de dizolvare a colorantului este datorată faptului că majoritatea lacurilor pe bază de acril conțin o cantitate variabilă de formaldehidă, toluen și alți solvenți.

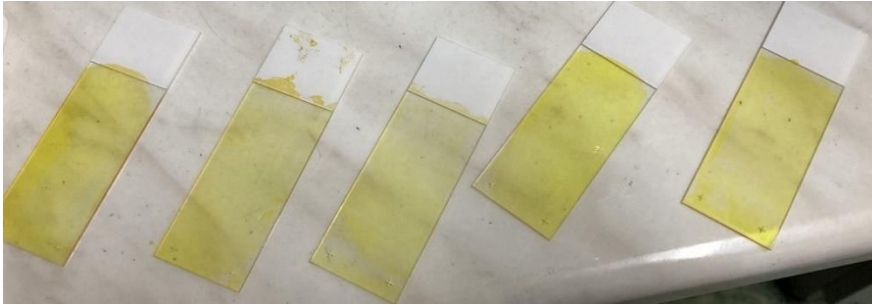
Am utilizat pentru colorații produsul C care a demonstrat o solubilitate excelentă în lac. Ținând cont de următoarea etapă și anume silanarea lamelor (vezi protocolul detaliat mai jos) cu toate că baza vâscoasă a lacului a permis o etalare și o aderență foarte bună trecerea prin soluția de acetonă ce urmează să fie efectuată și în amestecul de acetonă și alcool etilic sau acetona și silan așa cum era de așteptat a dus rapid la detașarea și dizolvarea peliculei.

Pentru a evita acest eveniment a fost necesar utilizarea unui al 2-lea strat de protecție pentru stratul activ. Ținând cont de numeroasele procese prin care lama va fi trecută, vezi protocoale de mai jos, a fost necesară utilizarea unei pelicule realizat din rășină epoxidică. Astfel am utilizat, de asemenea, un preparat disponibil comercial transparent (Adeziv Bison Bicomponent Transparent (5 Minute)), cu uscare rapidă. Conform specificațiilor producătorului aceasta rășină poate fi utilizată pe diferite medii inclusiv pentru realizarea unei pelicule de protecție a lacului. De asemenea, caracteristicile produsului au fost extrem de compatibile cu specificațiile pe care stratul de protecție trebuie să le îndeplinească protecție termică, chimică, mecanică.

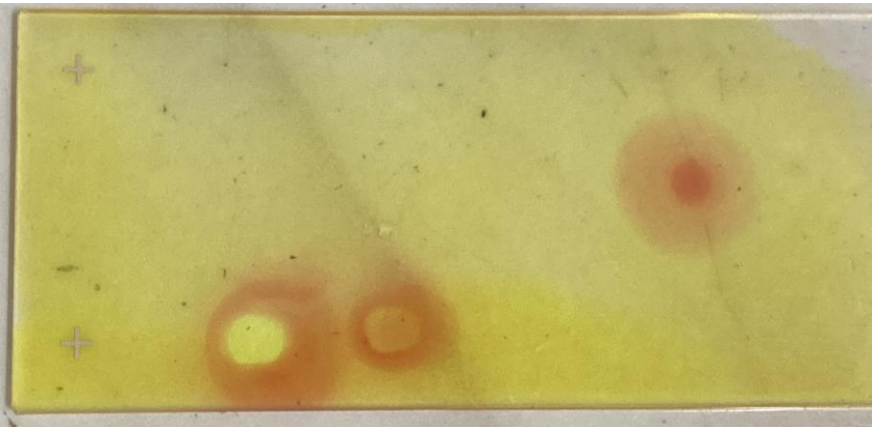
Etalarea ambelor pelicule s-a realizat manual. Rezultatul final a unei lame etalate și modul de activare sunt prezentate în Figura 23 și Figura 24.



a)



b)



c)



d)

Figura 23. a) diagrama lamei de sticlă și a peliculei utilizate. b) lame de microscopie cu peliculă activă etalată, fără strat protector, vopsea inactivă; c) lamă de microscopie cu pelicula etalată și strat de protecție aplicat; zonele de culoare galbenă sunt zone inactive; zonele de culoare roșie brună sunt zone în care colorantul fotocromic a fost activat, intensitatea activării fiind dependentă de durata de expunere și de concentrația colorantului; zona din stânga imaginii care conține în mijlocul ei o arie de culoare roșie cu o arie circulară de culoare galbenă este o zonă în care colorantul a fost activat și ulterior în zona de culoare galbenă am fost inactivat prin expunerea la lumina cu lungimea de undă corespunzătoare d) imagine de microscopie în care se observă interfața dintre zona activă, semicercul de culoare roșie brună, și fondul de vopsea inactivă de culoare galbenă.



Figura 24. Lamă activată permanent. Colorant fotocromic utilizat: preparatul C.

2. Silanarea lamelor

Silanarea s-a realizat manual prin imersia succesivă în următoarele soluții:

Recipientul 1- alcool absolut+ acetona(1:1).....5 minute

Recipientul 2- acetona.....3 minute

Recipientul 3- acetona (600 ml)+20-21ml de silan.... 3 minute

Recipientul 4- acetona..... 2 minute

Recipientul 5- acetona..... 3 minute

Uscare1 minut

3. Realizarea colorației automate pentru CD20 pentru protocolul de vopsele fotocromice

Blocurile de parafină selectate au fost secționare la o grosime de 4 micrometri. Secțiunile obținute au fost etalate pe lame preparate conform etapelor de mai sus și incubate peste noapte la 37 °C. Deparafinarea s-a realizat folosind 2 băi succesive de xilen, urmate de 3 băi succesive de alcool în concentrație crescândă (75%, 85% 95%) și spălare. Lamele ulterior au fost introduse în automatul de colorare Ventana Benchmark Ultra. Protocolul de lucru a fost cel prezentat in figura de mai jos (figura 25) si reprezintă o captura din soft-ul aparatului.

Am utilizat un protocol de lucru modificat, astfel încât contracolorarea cu hematoxină nu s-a mai realizat. Acest lucru a fost necesar deoarece colorația nucleară ar fi putut interfera cu activarea peliculei în zona corespunzătoare nucleului.

4. Activarea lamelor colorate cu CD20

Proprietățile fotocromice ale preparatului C au fost activate prin expunerea zonelor de interes timp de 1 minut la o lumină emisă prin filtrul DAPI (4, 6-Diamidino-2-Phenylindole HCl) (lumină cu o lungime de undă de aproximativ 372 de nanometri), ceea ce a dus la virarea spre roșu a culorii galbene în zona expusă. Am observat de asemenea o proprietate a colorantului care apare după expunerea prelungită la lungimea de undă de 372 de nanometri (după aproximativ 5 minute). Astfel, după expunerea preparatului la această lungime de undă colorarea maro sau brună se

permanentizează. Această proprietate este utilă pentru a realiza o activare permanentă. De asemenea, am observat că după trecerea prin întreg protocolul de lucru rășina epoxidică capătă de asemenea, uneori o culoare gălbuie, ceea ce face dificilă realizarea unui contrast suficient în final.

5. Decolorarea lamelor pentru eliminarea cromogenului utilizat pentru CD20

După activarea peliculei lamele au fost supuse la 2 băi de acetonă a câte 30 de minute fiecare separate o baie de 5 minute în apă curentă.

6. Realizarea colorației automate pentru PAX-5

Colorația pentru PAX-5 a fost realizată automat folosind aparatul de colorare Ventana Benchmark Ultra. Protocolul de lucru pentru PAX-5 a fost unul adaptat față de protocolul de lucru standard în sensul că, pentru a evalua viabilitatea metodei și pentru a asigura un contrast bun față de porțiunea inactivată a vopselei fotocromice, am considerat oportună modificarea protocolului astfel încât etapa de contracolorare cu hematoxină să fie realizată manual ulterior unei examinări microscopice fără aceasta.

Pentru vizualizarea preparatului am utilizat montare simplă cu apă lamele sau preparatul a fost examinat folosind doar obiectivele mici fără lamelă.

Protocolul detaliat este prezentat ca o captură din softul aparatului de imunohistochimie în Figura 26.

Protocol # 178 : CD 20 RED TEST 20.20.RED

Version: 1

Validated: No

Active: Yes

Procedure: U ultraView Red (v1.02.0018)

BenchMark ULTRA IHC/ISH

Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania

Step No	Procedure Step
1	Enable Mixers
2	Disable Mixers
3	[Set temperature to 72°C for Default]
4	Warmup Slide to [72 Deg C] from Medium Temperatures (Deparaffinization)
5	Incubate for 4 Minutes
6	Apply EZPrep Volume Adjust
7	Rinse Slide With EZ Prep
8	Apply EZPrep Volume Adjust
9	Apply Coverslip
10	Rinse Slide With EZ Prep
11	Apply EZPrep Volume Adjust
12	Apply Coverslip
13	Rinse Slide With EZ Prep
14	Apply Depar Volume Adjust
15	Apply Coverslip
16	Enable Mixers
17	Disable Slide Heater
18	Pause Point (Landing Zone)
19	[Short - 8 Minute Conditioning]
20	Rinse Slide With EZ Prep
21	Apply Long Cell Conditioner #1
22	Apply CC Coverslip Long
23	[Set temperature to 95°C for Default]
24	Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 8 Minutes (Cell Conditioner #1)
25	Apply Cell Conditioner #1
26	Apply CC Medium Coverslip No BB
27	Apply CC Medium Coverslip No BB
28	Apply Cell Conditioner #1
29	Apply CC Medium Coverslip No BB
30	[MILD]
31	Apply Cell Conditioner #1
32	Apply CC Medium Coverslip No BB
33	Apply Cell Conditioner #1
34	Apply CC Medium Coverslip No BB
35	Apply Cell Conditioner #1
36	Apply CC Medium Coverslip No BB
37	Apply Cell Conditioner #1
38	Apply CC Medium Coverslip No BB
39	Apply Cell Conditioner #1
40	Apply CC Medium Coverslip No BB
41	Apply Cell Conditioner #1
42	Apply CC Medium Coverslip No BB
43	Apply Cell Conditioner #1
44	Apply CC Medium Coverslip No BB

* one drop is one reagent dispense

Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta' , Str. Republicii Cluj Napoca , Cluj , Romania
VSS v12.5.4 Build 20104.2

Figura 25. Protocolul de lucru automat pentru colorația pentru CD20 realizată utilizând lame cu peliculă fotocromică.

Protocol # 183 : PAX 5 TEST

Version: 1

Validated: No

Active: Yes

Procedure: U ultraView DAB (v1.02.0018)

BenchMark ULTRA IHC/ISH

Active

Institutul Oncologic 'Prof.Dr.I. Chiricuta', Str. Republicii Cluj Napoca, Cluj, Romania

Step No	Procedure Step
1	Enable Mixers
2	Disable Mixers
3	[Set temperature to 72°C for Default]
4	Warmup Slide to [72 Deg C] from Medium Temperatures (Deparaffinization)
5	Incubate for 4 Minutes
6	Apply EZPrep Volume Adjust
7	Rinse Slide With EZ Prep
8	Apply EZPrep Volume Adjust
9	Apply Coverslip
10	Rinse Slide With EZ Prep
11	Apply EZPrep Volume Adjust
12	Apply Coverslip
13	Rinse Slide With EZ Prep
14	Apply Depar Volume Adjust
15	Apply Coverslip
16	Enable Mixers
17	Disable Slide Heater
18	Pause Point (Landing Zone)
19	[Short - 8 Minute Conditioning]
20	Rinse Slide With EZ Prep
21	Apply Long Cell Conditioner #1
22	Apply CC Coverslip Long
23	[Set temperature to 95°C for Default]
24	Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 8 Minutes (Cell Conditioner #1)
25	Apply Cell Conditioner #1
26	Apply CC Medium Coverslip No BB
27	Apply CC Medium Coverslip No BB
28	Apply Cell Conditioner #1
29	Apply CC Medium Coverslip No BB
30	[MILD]
31	Apply Cell Conditioner #1
32	Apply CC Medium Coverslip No BB
33	Apply Cell Conditioner #1
34	Apply CC Medium Coverslip No BB
35	Apply Cell Conditioner #1
36	Apply CC Medium Coverslip No BB
37	Apply Cell Conditioner #1
38	Apply CC Medium Coverslip No BB
39	Apply Cell Conditioner #1
40	Apply CC Medium Coverslip No BB
41	Apply Cell Conditioner #1
42	Apply CC Medium Coverslip No BB
43	Apply Cell Conditioner #1
44	Apply CC Medium Coverslip No BB

* one drop is one reagent dispense

Figura 26. Protocolul de colorare pentru colorația IHC PAX5.

Descrierea lotului testat în etapa I și etapa II

Datorită dificultăților întâmpinate pentru testare cazurilor de tumori mamare am considerat necesară divizarea lotului și testarea separată a diferitelor tipuri de pelicule propuse. Astfel, în Tabelul 11 am descris sumar cazurile testate în fiecare etapă.

Nr. caz	Etapă de testare	Diagnostic	Material
1	I	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	excizie
2	I	Limfom compozit Hodgkin si Limfom periferic T NOS.	excizie
3	I	Limfom folicular	biopsie
4	II	Limfom Hodgkin clasic, subtipul cu celularitate mixta.	excizie
5	I	Limfom limfocitic cu celule mici/leucemie limfocitica cronica (SLL/CLL).	excizie
6	II	Limfom cu celule de manta	biopsie
7	II	Limfom Hodgkin forma clasica cu celularitate	biopsie
8	II	Limfom folicular	biopsie
9	I	Limfom cu celule mari B dezvoltat in contextul unei Leucemii limfatice cronice Sindrom Richter	biopsie
10	I	Limfom Hodgkin nodular cu predominanta limfocitara pe fond de transformare progresiva a centrilor germinali.	excizie
11	I	Limfom limfocitic cu celule mici/leucemie limfocitica cronica (SLL/CLL).	biopsie
12	II	DLBCL tip Germinal center	biopsie
13	II	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie
14	I	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie
15	I	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie
16	II	DLBCL tip Germinal center	excizie
17	II	DLBCL	excizie
18	I	Carcinom mamar invaziv, NST, grad histologic Nottingham G1(2;2;1; scor total=4).	biopsie
19	I	Limfom cu celule B	excizie
20	I	Limfom de manta	biopsie
21	I	Limfom de manta polimorf	biopsie
22	II	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie
23	II	DLBCL	excizie
24	II	Infiltrat non- limfoid medular	biopsie
25	I	limfom cu celule B	biopsie
26	I	Limfom anaplazic ALK negativ	excizie
27	II	Limfom folicular	biopsie
28	II	DLBCL	biopsie
29	I	Limfom periferic cu celule T NOS	biopsie
30	I	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie

Tabelul 11. Etapele de testare a cazurilor de limfom.

Evaluarea colorației pentru CD20

Evaluarea lamelor s-a realizat prin comparație cu colorațiile imunohistochimice duble realizate folosind anticorpii CD20 și PAX-5. Fiecare lamă a fost evaluată după fiecare etapă a protocolului de colorare.

Astfel, colorația pentru CD20 a fost evaluată folosind obiectivele mici 10x și 4 x și folosind acoperire simplă cu lamelă a lamelor, în mediu apos. Colorația a fost clasificată ca fiind reușită dacă s-a observat o distribuție similară a pozitivității pentru CD20 comparativ cu colorația dublă. Decolorarea a fost evaluată în mod similar și a fost considerată reușită dacă după această etapă nu se mai observă cromogen roșu în zona preparatului folosind obiectivele mici. Colorația pentru PAX5 a fost evaluată similar cu cea pentru CD20 astfel că a fost considerată pozitivă sau reușită dacă evaluarea comparativă cu lama colorată dublu a arătat o colorație similară. Rezultatele au fost sumarizate în tabelul 12.

Nr. caz	Diagnostic	Material	CD20 lama fotocromică	Decolorare	PAX5 lama fotocromică	Contrast fata de fundal
3	Limfom folicular	biopsie	Eșec	Nereușită	-	-
14	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie	Eșec	Nereușită	-	-
21	Limfom de manta polimorf	biopsie	Eșec	Nereușită	-	-
29	Limfom periferic cu celule T NOS	biopsie	Eșec	Nereușită	-	-
30	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie	Eșec	-	-	-
1	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	excizie	Reușită	Nereușită	Reușită	Absent
2	Limfom compozit Hodgkin si Limfom periferic T NOS.	excizie	Reușită	Completa	Nereușită	-
5	Limfom limfocitic cu celule mici/leucemie limfocitica cronica (SLL/CLL).	excizie	Reușită	Parțiala	Reușită	Focal
9	Limfom cu celule mari B dezvoltat in contextul unei Leucemii limfatice cronice Sindrom Richter	biopsie	Reușită	Parțiala	Reușită	Focal
10	Limfom Hodgkin nodular cu predominanta limfocitara pe fond de transformare progresiva a centrilor germinali.	excizie	Reușită	Parțiala	Reușită	Focal

11	Limfom limfocitic cu celule mici/leucemie limfocitica cronica (SLL/CLL).	biopsie	Reușită	Completa	Reușită	Focal
15	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie	Reușită	Parțiala	Parțiala	Absent
18	Carcinom mamar invaziv, NST, grad histologic Nottingham G1(2;2;1; scor total=4).	biopsie	Reușită	Reușită	Reușită	Absent
19	Limfom cu celule B	excizie	Reușită	Parțiala	Focala	Absent
20	Limfom de manta	biopsie	Reușită	Completa	Nereușită	-
25	Limfom cu celule B	biopsie	Reușită	Parțiala	Focala	Absent
26	Limfom anaplazic ALK negativ	excizie	Reușită	Completa	Reușită	Absent

Tabelul 12. Rezultatele evaluării CD20 și PAX-5 pentru cazurile de limfom etapa I.

Nr. caz	Diagnostic	Material	CD20 lama fotocromică	Decolorare	PAX5 lama fotocromică	Contrast fata de fundal
4	Limfom Hodgkin clasic, subtipul cu celularitate mixta.	excizie	Reușită	Reușită	Reușită	Focal
6	Limfom cu celule de manta	biopsie	Nereușită	-	-	-
7	Limfom Hodgkin forma clasica cu celularitate	biopsie	Nereușită	-	-	-
8	Limfom folicular	biopsie	Reușită	Reușită	Reușită	Absent
12	DLBCL tip Germinal center	biopsie	Reușită	Reușită	Reușită	Absent
13	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie	Reușită	Reușită	Reușită	Focal
16	DLBCL tip Germinal center	excizie	Reușită	Parțială	Nereușită	Focal
17	DLBCL	excizie	Reușită	Parțială	Reușită	Focal
22	Limfom Hodgkin forma clasica cu scleroza nodulara	biopsie	Reușită	Reușită	Nereușită	-
23	DLBCL	excizie	Reușită	Parțială	Reușită	Absent
24	Infiltrat non- limfoid medular	biopsie	Nereușită	Nereușită	-	-
27	Limfom folicular	biopsie	Reușită	Parțială	Reușită	Absent
28	DLBCL	biopsie	Reușită	Reușită	Reușită	Focal

Tabelul 13. Rezultatele evaluării CD20 și PAX-5 pentru cazurile de limfom etapa II.

Activitatea 3.5.

În cadrul acestei activități am analizat comparativ rezultatele celor 2 etape de testare a limfoamelor.

Etapa I

În prima etapă am analizat un număr total de 17 cazuri de limfoame. În această etapă am utilizat o peliculă de tip fotocromic în care mediul de diluție a avut la bază compuși micști din lac acrilic. Pentru a proteja pelicula activă am utilizat o peliculă secundară de rășină epoxidică cu rolul de a proteja pelicula activă care conține vopseaua.

Din cele 17 cazuri analizate, pentru 5 dintre ele colorația dublă CD20-PAX5 nu a fost posibilă fie din cauză că pelicula de vopsea fotocromică s-a desprins, fie datorită faptului că preparatul nu s-a colorat, fie preparatul s-a detașat complet de pe lamă. Desprinderea peliculei fotocromice s-a **produs de cele mai multe ori datorită pătrunderii reactivilor între stratul de rășină epoxidică și lama de sticlă** ceea ce a permis ca solvenți precum și xilenul sau alcoolul să dizolve părțile laterale ale peliculei de lac și să detașeze complet sau parțial stratul de rășină epoxidică, fapt ce nu a permis evaluarea microscopică. Mai mult decât atât lipsa de uniformitate a stratului a dus în final la detașarea preparatului sau la imposibilitatea ca reactivii utilizați pentru realizarea colorației CD20 să rămână pe suprafața lamei. Reamintim faptul că colorațiile IHC au fost realizate cu ajutorul aparatului de colorare automat Ventana Benchmark Ultra. De asemenea, la acestea se adaugă și eșecul decolorării preparatelor cel puțin într-o măsură în care să permită cel puțin focal activarea mai redusă a vopselei fotocromice în regiunile de interes (Figura 27).

Din cele 12 cazuri rămase colorația pentru PAX-5 a reușit în 10 cazuri dintre acestea după analiza comparativă cu colorațiile duble prin metoda standard pentru 7 cazuri concordanța a apreciată ca fiind peste 90 % , iar valorile sub 90 % fiind considerate colorații reușite de focal. Evaluarea contrastului între fondul de colorant activat și aria mai puțin activată datorită prezenței marcajului imunohistochemic pentru CD20 s-a realizat pe aceste 10 cazuri. Astfel 4 din 10 cazuri au demonstrat după examinare microscopică prezența cel puțin focală a unui contrast vizibil între aria perinucleară în care activarea colorantului fotocromic este de intensitate mai redusă comparativ cu activarea mai intensă din zonele în care colorația pentru CD20 a fost absentă.

Trebuie menționat de la început că am utilizat ca reper zone în care am avut o densitate mare a celulelor PAX 5 pozitive. Trebuie menționat, de asemenea, faptul că la microscop contrastul între cele 2 nuanțe ale colorantului fotocromic a fost deosebit de dificil de identificat și a necesitat accentuarea contrastului fie prin îndepărtarea condensatorului de lamă, fie prin scoaterea acestuia din axul luminos.

În figura 28 este exemplificat un caz în care am analizat comparativ colorația dublă secvențială standard IHC și colorația secvențială realizată pe lama fotocromică. În acest caz am observat doar focal, la examinarea microscopică, un contrast suficient pentru a putea identifica ariile pozitive în colorația inițială CD20. Imaginea realizată după decolorare completă arată prezența unui contrast bun între fundalul lamei și aria mai puțin activă de la nivelul zonelor în care colorația cu CD20 a fost pozitivă. După realizarea colorației cu PAX 5 s-au observat zone de culoare mai

deschisă perinuclear, care corespund zonelor CD20 pozitive. Imaginea prezentată a fost realizată prin accentuarea contrastului la microscop cu ajutorul condensatorului de lumină. Pentru a evidenția diferența dintre ariile care au fost activate mai puțin, membranare, am utilizat un software de prelucrare de imagine Irfanview, versiunea 4.60, și am utilizat funcția acestuia de înlocuire a culorilor (Replace color). Am selectat ariile perinucleare și am observat faptul că în momentul în care am oferit 15 grade de toleranță culorii selectate, opțiune disponibilă în meniu, am putut să reconstituim ariile CD20 pozitive fără ca înlocuirea de culoare să se producă și la nivelul fondului activat complet. Rezultatele obținute au fost doar focale în imaginea de mai jos din același preparat observăm că nu putem evidenția un contrast suficient între fondul activat și ariile perinucleare.

Etapa II

În a doua etapă am analizat un număr total de 13 cazuri de limfoame. În această etapă am utilizat o peliculă cu un singur strat care a avut la bază rășina epoxidică. Diluarea colorantului fotocromic a fost realizată folosind tetrahidrofuran. Pentru realizarea peliculei am diluat 100 mg de compus A fotocromic în 0,3 ml de THF. Amestecul rezultat l-am amestecat, fără dificultate cu 5 ml de rășină epoxidică. Amestecul astfel obținut l-am etalat pe lame silanate și imediat după etalare a fost acoperit cu o lamelă de sticlă pentru protecție și pentru obținerea unei suprafețe plane. Lamele au fost ulterior silanate pentru a obține o suprafață aderentă. activarea peliculei de vopsea fotocromică s-a realizat după colorarea cu CD20 fără contracolorare nucleară. Fondul de vopsea activată are acum o culoare albastră.

Din cele 13 cazuri analizate pentru 4 dintre ele colorația dublă CD20-PAX5 nu a fost posibilă fie datorită faptului că preparatul nu s-a colorat, fie preparatul s-a detașat complet de pe lamă. Reamintim faptul că colorația IHC a fost realizată cu ajutorul aparatului decolorare automat Ventana Benchmark Ultra. De asemenea, la acestea se adaugă ca dificultate și decolorarea parțială a preparatelor cel puțin într-o măsură în care să permită cel puțin focal activarea vopselei fotocromice în regiunile de interes.

Evaluarea contrastului între fondul de colorant activat și aria mai puțin activată datorită prezenței marcajului imunohistochimic pentru CD20 s-a realizat pe aceste 9 cazuri. În 5 din 9 cazuri am demonstrat după examinare microscopică prezența cel puțin focală a unui contrast vizibil între aria perinucleară în care activarea colorantului fotocromic este de intensitate mai redusă comparativ cu activarea mai intensă din zonele în care colorația pentru CD20 a fost absentă.

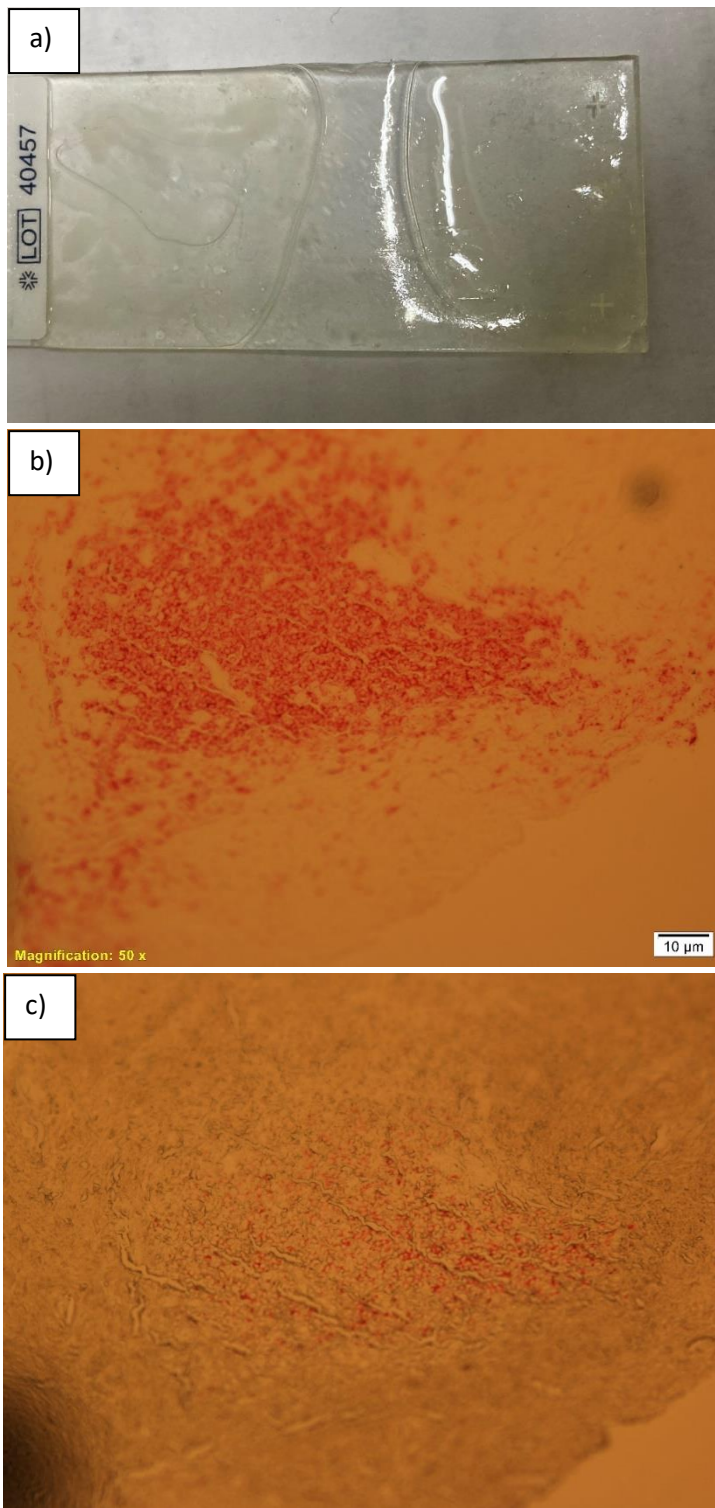
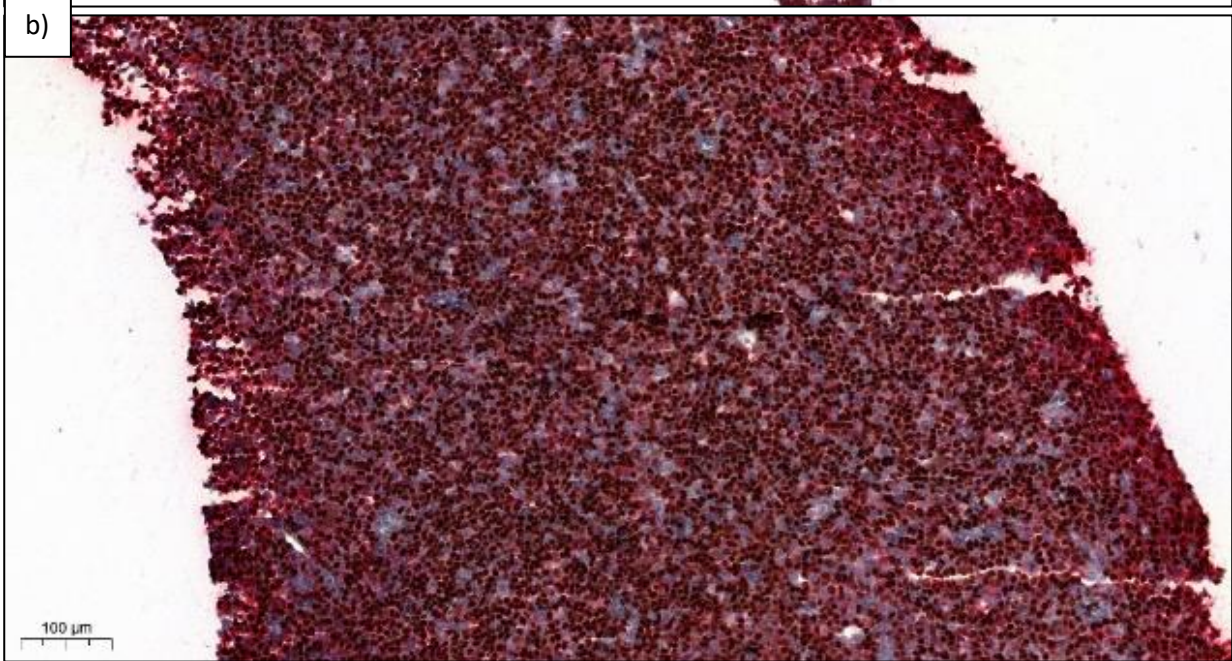
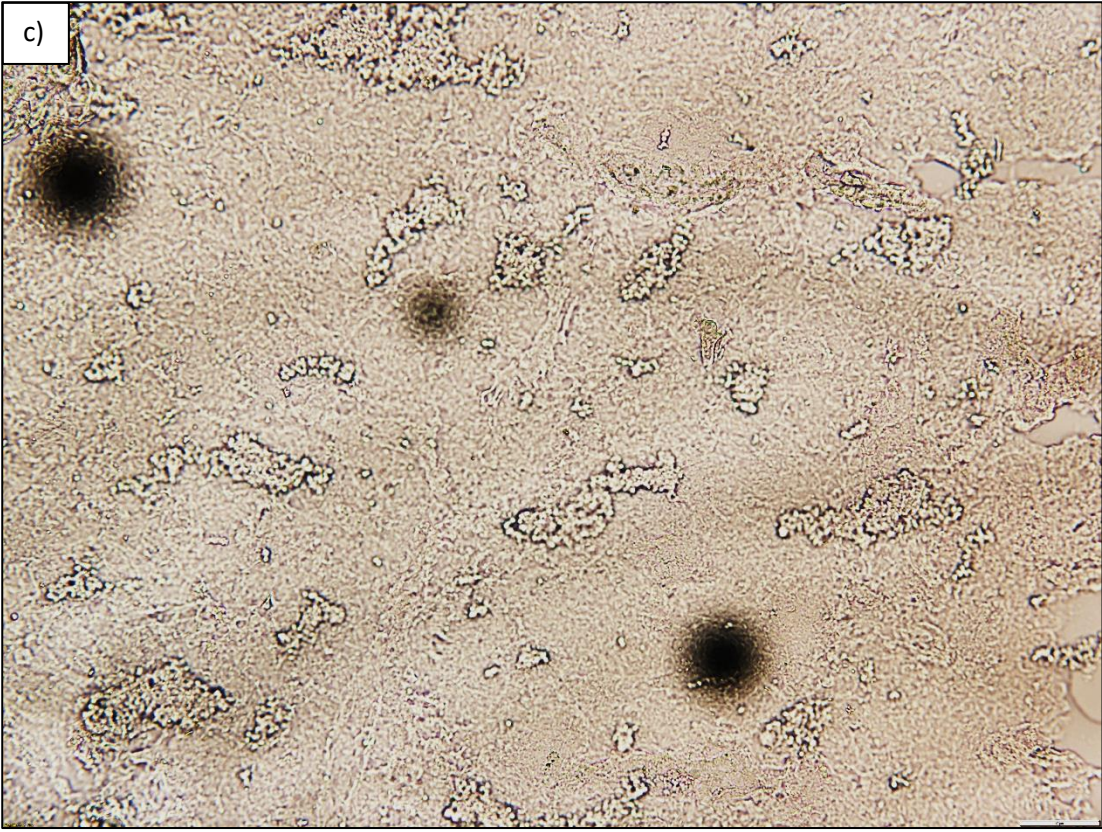


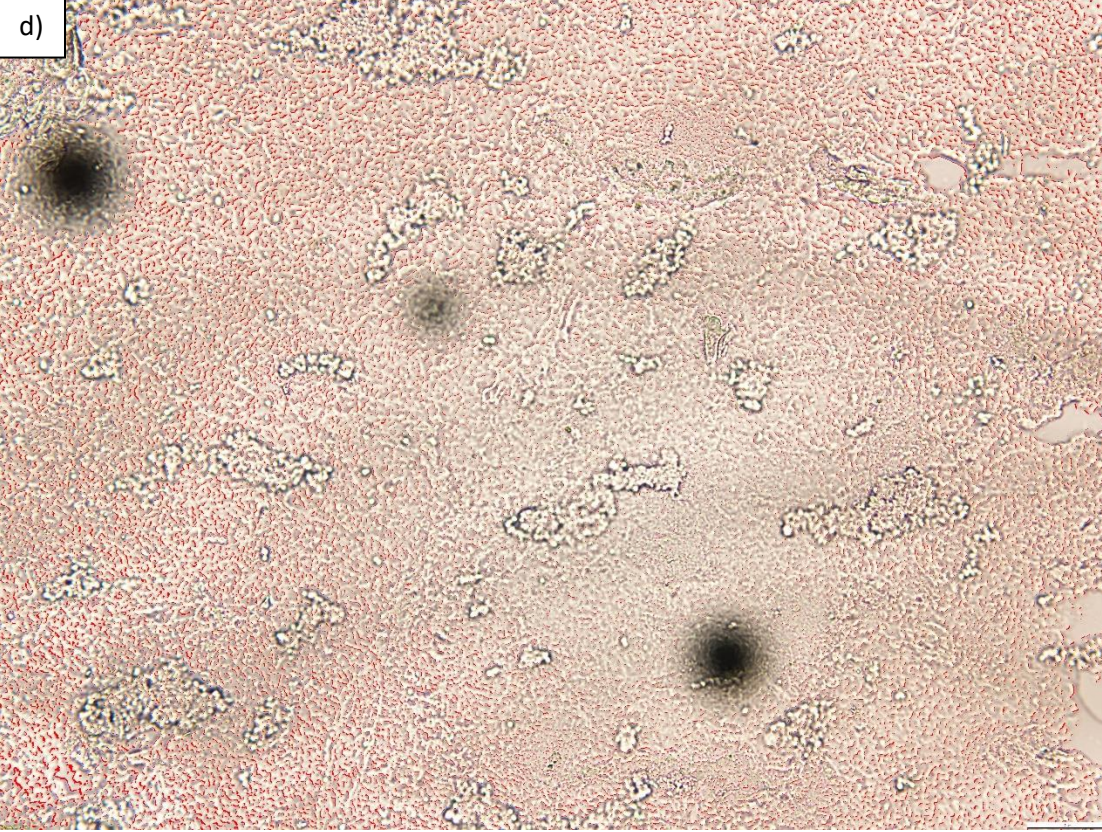
Figura 27. a) Lamă de microscopie utilizată pentru realizarea colorației CD20 cu pelicula fotocromică parțial detașată; observați faptul că pelicula de rășină epoxidică superficială este intactă. b) colorație pentru CD20 fără contracolorare cu hematoxină în care se observă decolorarea parțială după primul timp de acetonă al preparatului; notați fundalul de culoare galben brun datorat activării peliculei de vopsea fotocromică înainte de pasul de decolorare; c) același preparat care se observă decolorarea aproape completă după al 2-lea timp de imersie în acetonă; observați că pelicula de vopsea fotocromică este neafectată de procedura de decolorare.

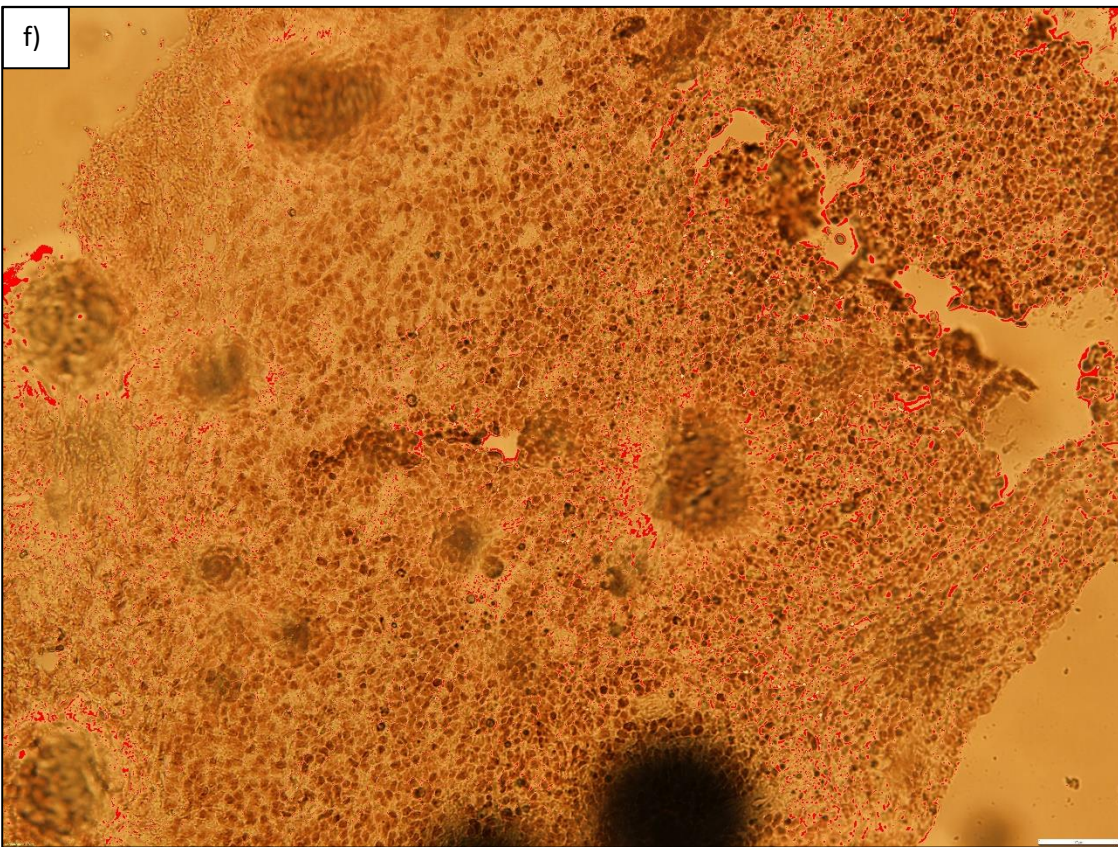
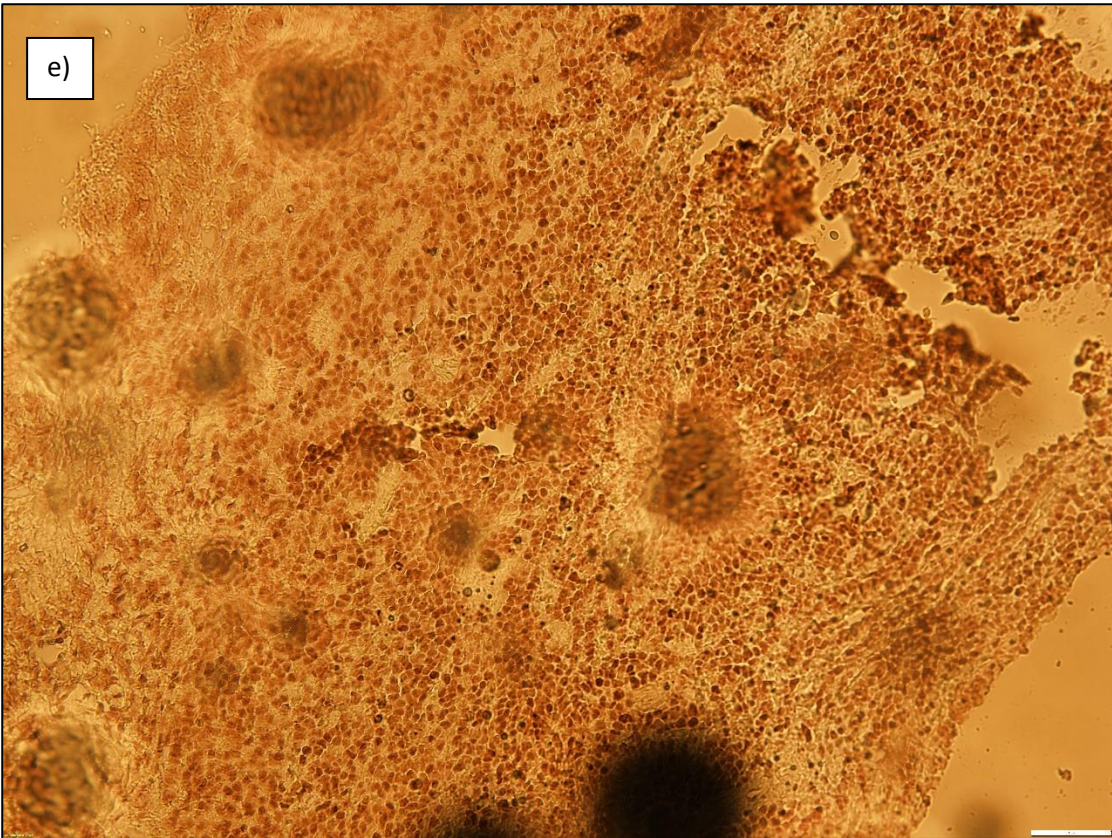


c)



d)





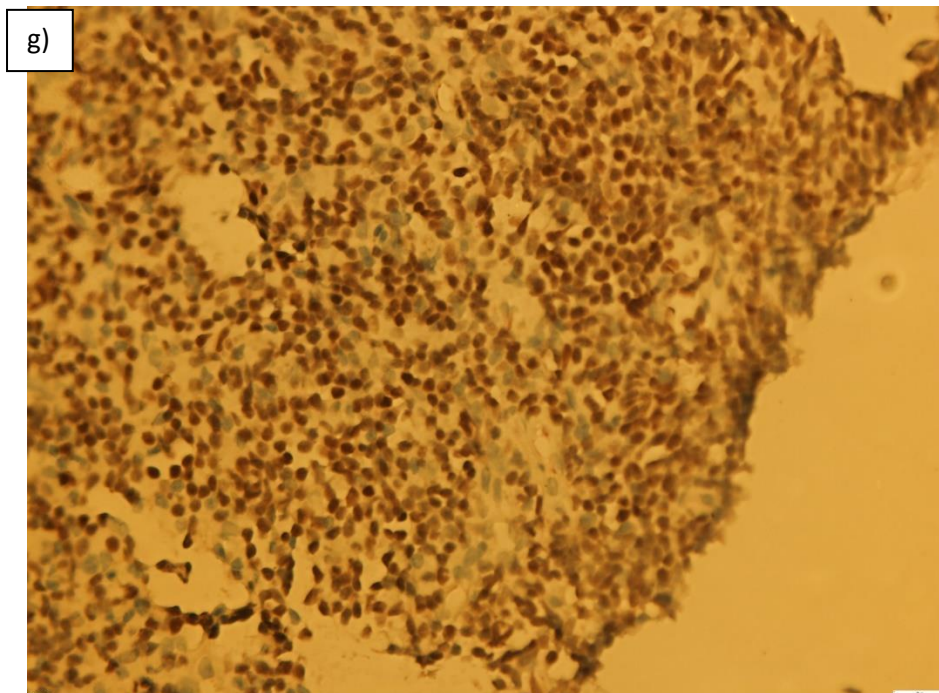


Figura 28. a) Leucemie limfatică cronică/ limfom cu celule mici- colorație dublă standard IHC (CD20 cu cromogen roșu, PAX 5 cu cromogen brun). b) imagine de detaliu, același preparat c) preparat decolorat complet după expunerea prelungită la acetona; se observă prezența de contururi celulare de culoare mai deschisă comparativ cu fondul activat; d) aceeași imagine ca la punctul c) ariile de culoare albicioasă corespunzătoare membranelor limfocitelor CD20 pozitive au fost înlocuite folosind software-ul de prelucrare de imagini cu culoarea roșie; se observă faptul că ariile în care celularitatea este absentă complet (fondul de colorant fotocromic activat) nu s-au colorat automat cu softul de prelucrare de imagini; e) același caz colorație PAX5 în care se observă cu ajutorul contrastului crescut ariile de culoare mai deschisă comparativ cu fondul de culoare mai închisă care corespund zonelor CD20 pozitive; f) aceeași imagine ca la punctul e) am utilizat softul de prelucrare de imagine pentru a reconstitui zonele CD20 pozitive g) același preparat arie PAX 5 pozitivă, dar fără contrast suficient pentru a putea identifica pozitivitatea membranelor anterioare.

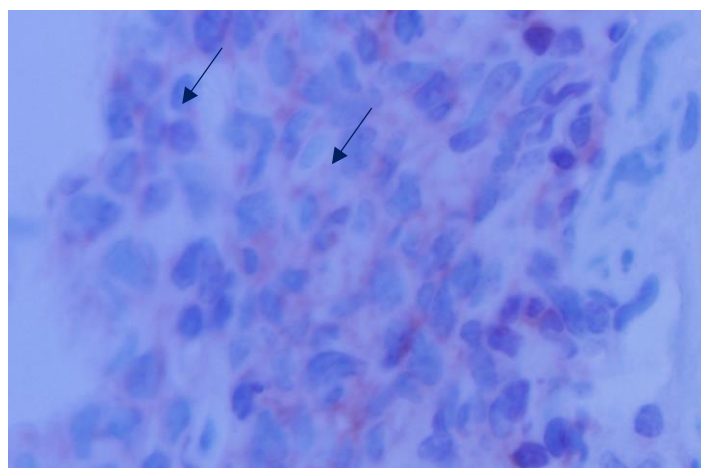
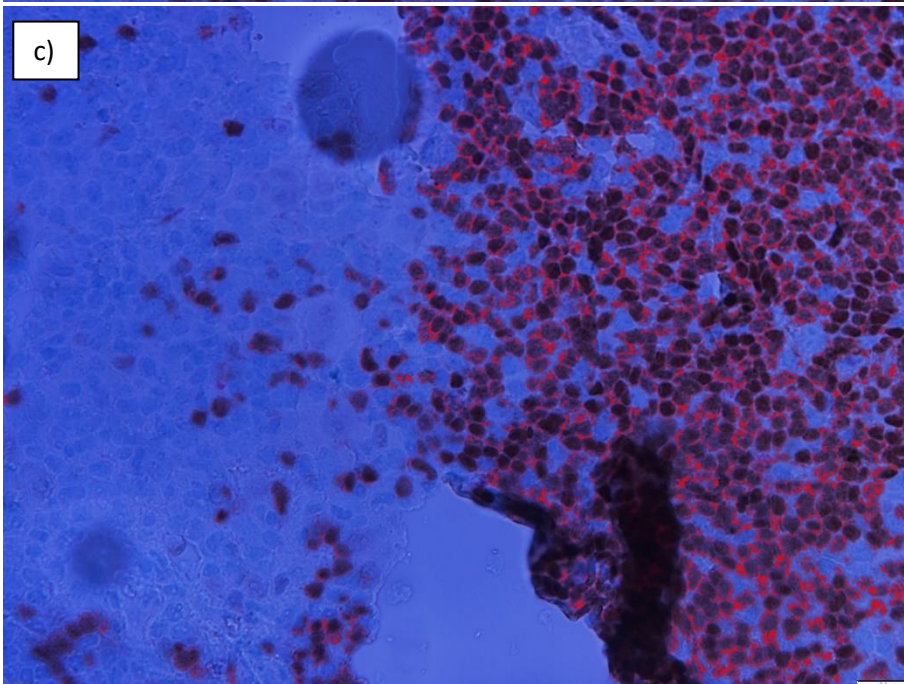
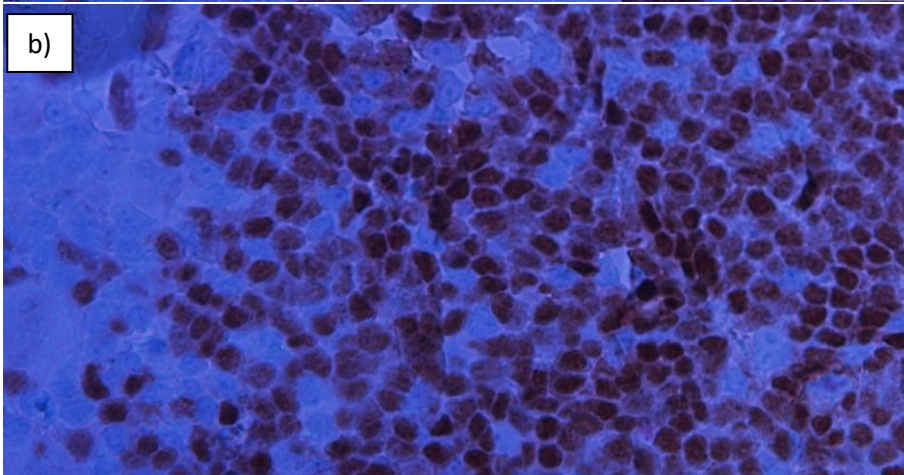
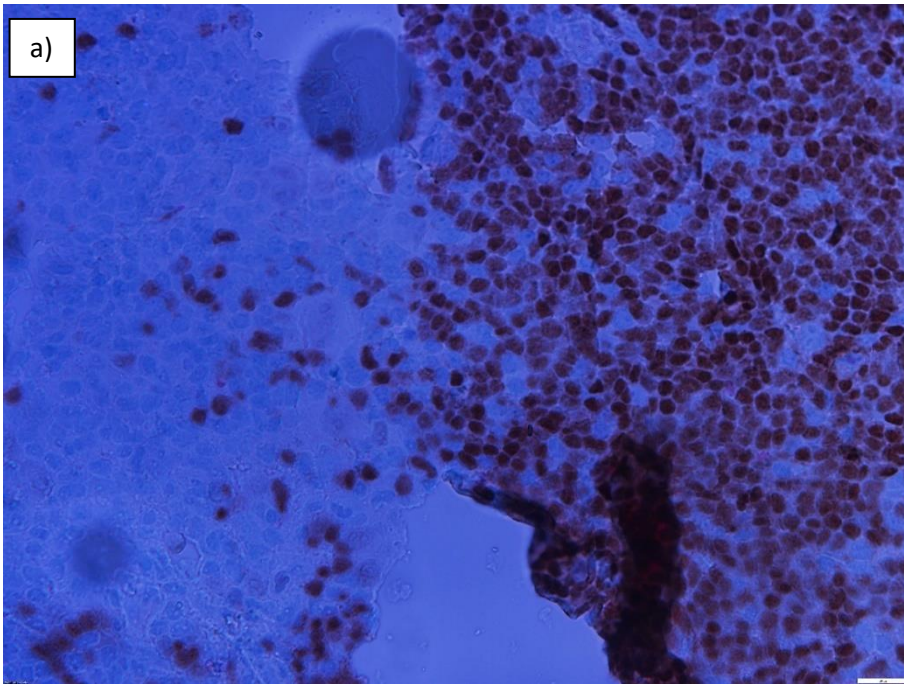


Figura 29. Colorație pentru PAX 5 eșuată; observați celulele care nu prezintă colorație pentru PAX 5 nucleară; de asemenea decolorarea colorației pentru CD20 a fost doar parțial reușită. Observați în jurul restului de decolorant FAST RED un halou de culoare albastru deschisă (săgeată neagră) corespunzând ariei membranare și parțial citoplasmatică pozitivă în CD20 .



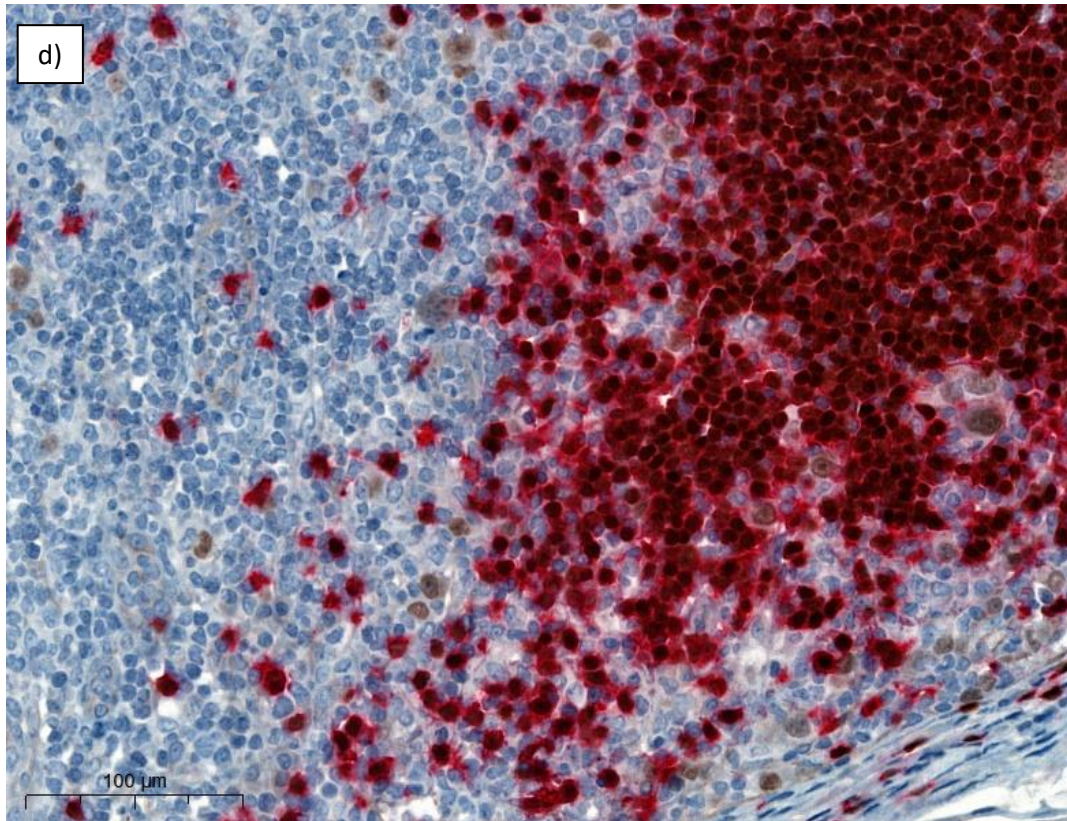


Figura 30. a) Limfom Hodgkin clasic, subtipul cu celularitate mixta, lama cu colorant fotocromic activat (preparatul A), colorație cu PAX-5, realizată ulterior pasului de colorare cu CD20, activării peliculei fotocromice și decolorării cromogenului FAST RED. B) detaliu imaginea a); observați prezența unui halou perilimfocitar, în jurul celulelor PAX5 pozitive și absența acestuia în zonele PAX-5 negative; c) aceeași imagine prelucrată prin IrfanView folosind funcția Replace Color cu 10 grade de toleranță; d) colorație secvențial IHC dublă standard CD20-PAX5, arată pozitivitate similară (aceeași zonă ca la punctul c)).

Concluzii

Analiza comparativă a rezultatelor din cele 2 etape arată faptul că pentru cea de a 2-a etapă rata de succes a fost mai mare, stabilitatea peliculei a fost și ea mai mare, rata de rezultate negative pentru colorațiile IHC a fost inferioară în etapa a 2-a comparativ cu rata din prima etapă.

Cu toate că am obținut aceste rezultate încurajatoare, tehnica este încă la un nivel care nu permite momentan o examinare uzuală microscopică în special datorită unui contrast insuficient între fondul de vopsea activată și ariile de dimensiuni foarte mici în care vopseaua are un grad mai redus de activare.

Din acest motiv evaluarea comparativă procentuală a colorațiilor standard și a celor realizate pe lame cu pelicule fotocromice nu a fost posibilă. Rezultatele de față sunt încurajatoare în ceea ce privește dezvoltarea mai departe a conceptului și îmbunătățirea calității și contrastului peliculei fotocromice.

Management de proiect

În cadrul acestei activități am urmărit în continuare dezvoltarea coordonată și coerentă a întregului proiect până la atingerea obiectivelor de etapă și a obiectivului final cu încadrarea în bugetul alocat și în conformitate cu planul de monitorizare privind integrarea tuturor activităților de implementare a proiectului, controlul riscurilor și costurilor, comunicarea internă și externă și asigurarea obținerii de rezultate. Am avut în vedere actualizarea website-ului proiectului și întocmirea Raportului Științific final al proiectului.

Director proiect, Dr. Bogdan FETICA

Bibliografie

1. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(1):18-43.
2. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks D, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3997-4013.
3. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* 2018;36(20):2105-22.
4. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast Tumours, 5th Edition, Volume 2 Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019 ISBN-13 978-92-832-4500-1. Available at: <https://publications.iarc.fr/581>. Accessed October 3, 2022.
5. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(7):e48-e72.
6. Carkeet A. A Review of the Use of Confidence Intervals for Bland-Altman Limits of Agreement in Optometry and Vision Science. *Optom Vis Sci* 2020 Jan;97(1):3-8.
7. Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, et al. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 1992;40(2):171-5.
8. Giefing M, Siebert R. FISH and FICTION to detect chromosomal aberrations in lymphomas. *Methods Mol Biol* 2013;971:227-44.

9. Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, et al. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol* 2005;205(5):577-84.
10. Ikeda S. Novel and simple method of double-detection using fluorescence in situ hybridization and fluorescence immunostaining of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Oncol Lett* 2018; 15:1084-1088.
11. Gatta LB, Incardona P, Cadei M, et al. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and Her-2/neu genotyping (FICTION) in breast carcinoma candidates to target therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20(4):413-20.
12. Tubbs R, Pettay J, Skacel M, et al. Gold-facilitated in situ hybridization: a bright-field autometallographic alternative to fluorescence in situ hybridization for detection of Her-2/neu gene amplification. *Am J Pathol* 2002;160(5):1589-95.
13. Downs-Kelly E, Pettay J, Hicks D, et al. Analytical validation and interobserver reproducibility of EnzMet GenePro: a second-generation bright-field metallography assay for concomitant detection of HER2 gene status and protein expression in invasive carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 2005;29(11):1505-11.
14. Ni R, Mulligan AM, Have C, et al. PGDS, a novel technique combining chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of ErbB2 (HER2/neu) status in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(3):316-24.
15. Reisenbichler ES, Horton D, Rasco M, et al. Evaluation of dual immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization for HER2 on a single section. *Am J Clin Pathol* 2012;137(1):102-10.
16. Nitta H, Kelly BD, Padilla M, et al. A gene-protein assay for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2): brightfield tricolour visualization of HER2 protein, the HER2 gene, and chromosome 17 centromere (CEN17) in formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue sections. *Diagn Pathol* 2012;7:60.