



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00686**

(22) Data de depozit: **29/09/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2018** BOPI nr. **8/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/05/2017** BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:

- **PIRICI IONICA, STR. VIRGIL MADGEARU NR. 2, BL. J22, SC. 1, AP. 10, ET. 2, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **PIRICI NICOLAE DANIEL, STR. VIRGIL MADGEARU NE. 2, BL. J22, SC. 1, AP. 10, ET. 2, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **MUREȘANU FIOR DAFIN, STR. LIVIU REBREANU NR. 19, AP. 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **MOGOANȚĂ LAURENȚIU, CALEA BUȘUREȘTI NR.30, BL.C 9, SC.2, ET.4, AP.9, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **MĂRGĂRITescu CLAUDIU, STR.VASILE ALECSANDRI NR.37, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **BĂLȘEANU TUDOR-ADRIAN, BD. ȘTIRBEI VODĂ NR. 32D, BL. B1, SC. 1, AP. 9, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **BOGDAN CĂTĂLIN, STR. CARTIER DOROBANȚI NR. 2, BL. H2, AP. 2, BUZĂU, BZ, RO**

(72) Inventatori:

- **PIRICI IONICA, STR. VIRGIL MADGEARU NR. 2, BL. J22, SC. 1, AP. 10, ET. 2, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **PIRICI NICOLAE DANIEL, STR. VIRGIL MADGEARU NE. 2, BL. J22, SC. 1, AP. 10, ET. 2, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **MUREȘANU FIOR DAFIN, STR. LIVIU REBREANU NR. 19, AP. 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **MOGOANȚĂ LAURENȚIU, CALEA BUȘUREȘTI NR.30, BL.C 9, SC.2, ET.4, AP.9, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **MĂRGĂRITescu CLAUDIU, STR.VASILE ALECSANDRI NR.37, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **BĂLȘEANU TUDOR-ADRIAN, BD. ȘTIRBEI VODĂ NR. 32D, BL. B1, SC. 1, AP. 9, CRAIOVA, DJ, RO;**
- **BOGDAN CĂTĂLIN, STR. CARTIER DOROBANȚI NR. 2, BL. H2, AP. 2, BUZĂU, BZ, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**EP 3252752 A1; US 2606912 A1**

(54) **DISPOZITIV AUTOMAT ȘI PROCEDEU DE CLARIFICARE ȘI IMUNOMARCARE ÎN BLOC A SPECIMENELOR ANATOMICE ȘI ANATOMOPATOLOGICE**



# RO 131896 B1

1           Invenția de față se referă la un dispozitiv automat și la un procedeu de clarificare și  
imunomarcare în bloc a speciemenelor anatomice și anatomopatologice cu ajutorul acestui  
3           dispozitiv.

5           Investigarea probelor histologice sau anatomopatologice sub microscop reprezintă  
elementul central al tuturor aplicațiilor ce vizează evaluarea în scop diagnostic sau didactic  
7           a unor țesuturi normale sau patologice. Odată cu aprofundarea mecanismelor moleculare  
și de biologie celulară, a crescut și nevoia rezoluțiilor de investigare, cu necesitatea păstrării  
9           unei cât mai bune integrări a structurilor celulare și sub-celulare în ansamblul volumetric al  
țesutului/organului din care provine. Cu alte cuvinte, evaluarea microscopică clasică a secțiu-  
11           nilor tisulare cu grosimi de ordinul micronilor tinde să devină insuficientă atunci când este  
necesară investigarea continuității unor structuri anatomice care se întind pe volume de zeci  
de mm<sup>3</sup>.

13           Chiar și tehnicile imagistice multimodale, precum RMN și PET-CT, nu se pot adresa  
problemelor de expresie multiproteică la rezoluție celulară, singura abordare care asigură  
15           o rezoluție suficientă fiind, în prezent, extrapolarea datelor obținute pe lame histologice cu  
ajutorul unor metode stereologice, precum principiul lui Cavalieri (**Michel și Cruz-Orive, J  
17           Microsc, 1988; Ruple si colab., PLoS.One., 2013; Papp si colab., Neuroimage., 2014**).  
În vreme ce stereologia are avantajul de a permite și imunomarcarea țesutului (IHC), această  
19           abordare aproximează numai proporțiile volumetrice și pierde continuitatea absolută a  
țesutului, făcând imposibilă evaluarea proporțională a modificărilor volumetrice tisulare.  
21           Există tehnici noi de microscopie de tip doi-fotoni și multi-fotoni dezvoltate în acest sens, însă  
și acestea sunt limitate de o grosime tisulară de câteva sute de μm datorită difuziei luminii  
23           și epuizării moleculelor de fluorofor (Hoover și Squier, Nat.Photonics., 2013).

25           Recent, a apărut o evoluție majoră în acest domeniu, odată cu introducerea tehnicilor  
de clarificare de organ, tehnici ce vizează transparentizarea țesutului și aducerea sa la un  
27           indice de refracție apropiat de un mediu de imersie în care se poate face apoi și vizualizarea  
sa cu ajutorul unui microscop cu iluminare în plan de lumină (light sheet microscopy), aceste  
29           tehnici fiind compatibile și cu imunomarcarea simplă/multiplă a unor ținte antigenice (**Dodt  
și colab., Nat. Methods, 2007; Hama și colab., Nat. Neurosci., 2011; Becker și colab.,  
31           PloS. One., 2012; Erturk și colab., Nat Protoc, 2012; Chung și Deisseroth, Nat.  
Methods, 2013; Ke și colab., Nat. Neurosci., 2013; Kuwajima și colab., Development,  
33           2013; Renier și colab., Cell, 2014; Susaki și colab., Cell, 2014; Yang și colab., Cell,  
2014**).

35           Procedeele de clarificare de organ se realizează în prezent prin mai multe tehnici,  
fiecare cu avantajele și dezavantajele sale: (i) deshidratarea țesutului și înlocuirea parțială  
37           a lichidului interstițial cu un solvent organic (procedeele BABB, 3Disco și iDISCO), dez-  
avantajul major fiind legat de pierderea relativ rapidă a fluorescenței markerilor utilizați pentru  
vizualizarea semnalelor de interes (**Dodt și colab., Nat. Methods, 2007; Erturk și colab.,  
39           Nat. Protoc, 2012; Renier și colab., Cell, 2014**); (ii) înfiltrarea cu substanțe hidrosolubile  
cu indice mare de refracție precum sucroza, glicerolul, fructoza sau soluția comercială  
41           FocusClear, dezavantajele acestora fiind legate de penetrarea redusă a agenților în țesut,  
precum și de modificarea drastică a dimensiunilor totale ale țesuturilor (**Hirshburg și colab.,  
43           Lasers Surg Med, 2007; Lee și colab., PLoS Comput Biol, 2012; Imai și colab., Brevet  
WO 2013191274 A1, 2013; Zhao si colab., Biomacromolecules, 2014; Hou si colab.,  
45           Front Neuroanat, 2015; Lin, Brevet US 6472216 B1, 2016**); (iii) imersarea în soluții de uree  
și detergent (Scale), având dezavantajul timpilor mari de incubare și al deformării țesutului  
47           (**Hama și colab., Nat. Neurosci., 2011; Miyawaki și colab., Brevet US 20130045503 A1,**

**2013; Miyawaki si colab., Brevet EP 2547999 A1, 2014**); sau (iv) prin eliminarea lipidelor și transformarea țesutului într-un hibrid țesut-hidrogel (Clarity), metodă care impune însă solubilizarea lipidelor și lipoproteinelor cu un detergent ionic și eliminarea acestora prin migrare electroforetică - procedeu îndelungat, cu penetrabilitate redusă în țesuturi și care duce la modificările de volum ale probelor (**Deisseroth și Gradinaru, 2012; Chung și Deisseroth, Nat. Methods, 2013**). Recent au apărut și sisteme automate, unele disponibile comercial, derivate în principal din tehnica electroforetică Clarity (X-Clarity, Logos Biosystems, USA), care reduc timpul de procesare al probelor, însă au costuri ridicate de achiziție a instrumentarului și a consumabilelor, și nu rezolvă problemele legate de durata mare a protocolului și modificările de volum ale probei. În plus, față de dezavantajele individuale ale acestor tehnici se pot enumera și dezavantaje generale, precum existența autofluorescenței, ce îngreunează evaluarea microscopică a probelor, și gradul scăzut de reproductibilitate al acestor protocele, datorită gradului de automatizare redus, existent în acest domeniu.

Pe de altă parte, în microscopia cu fluorescență clasică, problema autofluorescenței există de mult timp, fiind cunoscut faptul că flavonozii, lipofuscina, colagenul, elastina, forma redusă a nicotinamid adenin dinucleotidei (NADH), și chiar fixarea cu formaldehidă în sine sunt surse de autofluorescență în țesuturi (Viegas și colab., Eur. J. Histochem., 2007). De-a lungul timpului au existat diferite tehnici de mascare/eliminare a autofluorescenței, precum colorarea lipidelor cu un colorant specific (de exemplu Negru Sudan), tratarea lamelor cu  $\text{CuSO}_4$  sau  $\text{NaBH}_4$  (**Schnell și colab., J Histochem Cytochem, 1999; Baschong și colab., J Histochem Cytochem, 2001**), depigmentarea cu peroxid de hidrogen (**Rogers, Brevet US 6232092 B1, 2001**) sau epuizarea emisiei autofluorescente prin expunerea prealabilă a țesuturilor la radiație ultravioletă în domeniul 250...400 nm (**Viegas și colab., Eur J Histochem, 2007**), chiar și cu surse LED (**Duong și Han, J Neurosci Methods, 2013**). Tehnica expunerii la ultraviolete se pretează aplicării nu numai a fragmentelor tisulare destinate includerii în parafină, ci și a fragmentelor supuse tehnicilor de clarificare de organ, însă nu a fost folosită până în prezent în acest scop.

Nici problema unui mediu histologic de acoperire care să protejeze fluorescența țintelor imunomarcate nu este nouă, iar odată cu observația că oxidarea și modificările pH-ului sunt puternic responsabile de reducerea timpului de viață al fluoroforilor utilizați în imunomarcare, o serie de agenți reducători precum  $\beta$ -mercaptoetanolul au început să fie utilizați în concentrații mici în mediile de acoperire, cu rezultate ajungând până la posibilitatea păstrării secțiunilor imunomarcate pentru luni de zile (**Ravikumar și colab., Journal of Dr. NTR University of Health Sciences, 2014**). Nici această posibilitate tehnică nu a fost explorată în scopul îmbunătățirii performanțelor mediilor de clarificare de organ (**Kim B-G, 2013, Brevet US 20130164224 A1**).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un dispozitiv automat și un procedeu de clarificare și imunomarcare în bloc a specimenelor anatomice și anatomopatologice umane și animale cu ajutorul acestui dispozitiv, cu potențial rol diagnostic și în cercetare în domenii precum histologia, anatomia patologică microscopică, neuropatologia, fenomene de angiogeneză post-accident vascular cerebral, modele experimentale tumorale, studii de embriologie, și la utilizarea acestui dispozitiv într-un protocol/procedeu optimizat de clarificare de organ anatomic ce permite vizualizarea îmbunătățită a unor ținte imune (antigene) la un microscop cu iluminare în plan de lumină.

Dispozitivul automat pentru clarificare și imunomarcare în bloc a specimenelor anatomice și anatomopatologice într-o cameră de incubare cu volum variabil, conform invenției, înlătură multiplele dezavantaje cunoscute din stadiul tehnicii, prin aceea că este constituit dintr-un sistem automat și independent format dintr-o cameră de incubare cu volum variabil

# RO 131896 B1

1       **1** ce se realizează prin înfiletarea unui piston **2** în partea inferioară a camerei propriu-zise,  
un capac din plexiglas **3** transparent la UV și rezistent la solvenți organici ce se înfiletează  
3       în partea superioară a camerei, un circuit de conducte **4** ce poate recircula orice fluid intro-  
5       dus în cameră cu ajutorul unei minipompe electrice de recirculare **5** rezistentă la solvenți  
organici cu un debit 1...5 ml/min, o conductă centrată pe capacul de plexiglas **6** prin care o  
7       pompa de vid de laborator rezistentă la chimicale **7** poate crea vacuum cu un nivel de vid  
minim de -670 mmHg, la un debit de ~ 10 l/min în camera de incubare, un sistem de ilumi-  
9       nare LED UV de spectru larg **8**, la 380 nm, 440 nm, 460 nm, la minim 10 W, montat pe  
capacul de plexiglas împreună cu un reflector **9** care servește și ca radiator **10** pentru  
11       aranjamentul de LED-uri, un element Peltier de răcire prevăzut și el cu un radiator de  
disipare a căldurii **11**, și cu un senzor de temperatură **12**, care să asigure posibilitatea con-  
trolului real al temperaturii în camera de incubare.

13       Procedeu de clarificare și imunomarcare în bloc a speciimenelor anatomice și anatomo-  
mopatologice care se desfășoară într-un dispozitiv definit în revendicarea 1 înlătură multi-  
15       plele dezavantaje cunoscute din stadiul tehnicii, prin aceea că are următoarele faze:

17       a. Se depigmentează și se blochează autofluorescența țesutului ales dintre unul  
dintre organele selectate pentru imunomarcare, care se fixează prin: (i) deshidratare în băi  
19       succesive de metanol de concentrație crescătoare 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, câte  
30 min, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (la temperatura camerei, TC); (ii)  
21       depigmentare în apă oxigenată 5% în metanol timp de 18 h, sub lumina UV dată de aranja-  
mentul de LED-uri (4°C); (iii) rehidratare în serii de metanol 80%, 60%, 40%, 20% în tampon  
23       fosfat salin 1M (1 x PBS) timp de câte 30 min, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-  
uri (TC), etapele acestei faze efectuându-se fără vid, cu pompa de recirculare pornită.

25       b. Se spală țesutul în 1 x PBS sau 1 x PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton),  
1 h (TC), fără vid, cu pompa de recirculare pornită.

27       c. Se imunomarchează țesutul prin incubare în vid cu cocktail de anticorpi primari,  
de exemplu anticorpi anti-vase de sânge, anti-vase limfatice, anti-neuroni, anti-celule tumo-  
29       rale etc., marcați cu fluorofori, precum FITC, TexasRed, Alexa Fluor488, Alexa Fluor555,  
Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710, diluați în 3% albumină serică bovină/3%  
31       DMSO/0,2% Tween în 1 x PBS pentru 3 zile (TC), diluția stabilită de experimentator prin  
tatonări în funcție de concentrația, afinitatea și aviditatea fiecărui anticorp în parte (în cazul  
în care anticorpii primari nu sunt marcați fluorescent, după încă un pas de spălare în soluție  
33       1 x PBS/detergent, țesutul este incubat cu un cocktail de anticorpi fluorescenți anti-specia  
primului set de anticorpi), sub vid, cu pompa de recirculare pornită.

35       d. Se spală țesutul din etapa anterioară în 1 x PBS sau 1 x PBS cu detergent 0,2%  
(Tween sau Triton), 2 zile (TC) fără vid, soluțiile de anticorp nelegat părăsind încet, prin difu-  
37       ziune, proba de țesut, fără vid, cu pompa de recirculare pornită.

39       e. Se clarifică organul prin: (i) incubare în 50% tetrahidrofuran în 1 x PBS timp de  
18 h (TC), apoi pentru câte 1 h în soluții crescătoare de tetrahidrofuran (70%, 90%, 97%,  
100%, 100%); (ii) incubare în diclormetan timp de 1 h (TC); (iii) incubare în dibenzileter cu  
41       10 mM β-mercaptoetanol timp de minimum 1 h TC (agentul reducător β-mercaptoetanol pre-  
lungeste semnificativ timpul de viață al fluoroforilor, cum ar fi FITC, TexasRed, Alexa  
43       Fluor488, Alexa Fluor555, Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710, cu care sunt  
etichetați direct sau indirect anticorpii din etapa de imunomarcare), sub vid, cu pompa de  
45       recirculare pornită.

47       f. Se vizualizează organul, clarificat în etapa anterioară, la un microscop cu iluminare  
în plan optic, prin introducerea acestuia în camera de vizualizare a microscopului cu ilumi-  
nare în plan optic, și imersat în mediul final de dibenzileter conținând 10 mM β-mercapto-  
49       etanol ca agent reducător, fluorescența anticorpilor marcați fiind păstrată și piesele/organele  
putând fi conservate în frigider la 4°C minimum 45 de zile.

# RO 131896 B1

Procedeul propus se bazează pe un protocol rapid de deshidratare și clarificare a speci- 1  
menelor, cu blocarea autofluorescenței prin supraexpunere la lumină UV, cu creșterea 3  
penetrării în țesut a anticorpilor utilizați ca markeri prin difuzie forțată sub vid și prin 5  
circularea continuă a soluțiilor de incubare printr-o pompă de fluid, cu prelungirea duratei de 7  
viață a speci- 5  
menelor finale imunomarcate prin adăugarea unui agent reducător în soluția 5  
finală de clarificare, și prin automatizarea întregului procedeu într-un instrument simplu și cu 7  
costuri de utilizare reduse. 7

Protocoalele prezentate mai jos fac referire la o serie de compuși utilizați în mod 9  
clasic în imunohistochimie, precum soluția tampon fosfat salin cu 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 9  
1,42 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> și pH = 7,4 (1 x PBS); detergenții Tween și Triton; dimetil- 11  
sulfoxid (DMSO); diferiți reporteri fluorescenți ce permit vizualizarea anticorpilor în micro- 11  
scopia în fluorescența [fluorescein izotiocianat - FITC; clorura acidă a sulforodaminei 101 - 13  
TexasRed; sau compușii sulfonați din seria Alexa (**Panchuk-Voloshina, N. și colab, J. 13  
Histochem. Cytochem, 1999**)]. 13

Invenția prezintă următoarele avantaje: 15

- utilizează un protocol general de clarificare de organ simplu și rapid, eficient chiar 15  
și pentru volume mari, derivat dintr-un protocol deja confirmat în literatură [iDISCO, (Renier 17  
și colab., Cell, 2014)]; 17

- introduce utilizarea unei surse LED cu emisie UV în spectru larg (380 nm, 440 nm, 19  
460 nm) în scopul eliminării autofluorescenței; 19

- autofluorescența indusă de suprafixarea țesutului, frecvent întâlnită în cazul unor 21  
preparate vechi, arhivate (frecvent în formol), poate fi eliminată prin expunerea la lumina UV; 21

- introduce utilizarea β-mercaptoetanolului (10 mM) în soluția finală de clarificare, în 23  
scopul creșterii timpului de viață al speci- 23  
menelor imunomarcate; 23

- introduce utilizarea vacuumului în scopul impregnării piesei în timpul prelucrării, dar 25  
și în scopul facilitării difuziei anticorpilor vizând diverse ținte antigenice; 25

- secvența tehnologică folosită este deosebit de simplă; 27

- procedeul se poate aplica pentru orice specimen fixat în prealabil în fixatori pe bază 29  
de apă sau alcool; 29

- secvența tehnologică propusă a fost deja testată de autori în laborator, confirmând 31  
reducerea autofluorescenței și menținerea viabilității unor fluorofori precum FITC, TexasRed, 31  
Alexa Fluor488, Alexa Fluor555, Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și AlexaFluor710; 31

- introduce un dispozitiv de automatizare unic în domeniu, flexibil, simplu, eficient și 33  
accesibil ca preț ce permite repetabilitatea protocolului cu exact aceleași condiții de pre- 33  
lucrare a pieselor; 35

- dispozitivul de automatizare propus poate fi utilizat atât în scopul automatizării pro- 37  
cedeului de clarificare propus, cât și a secvențelor de imunomarcare sau a altor procedee 37  
de clarificare de organ existente în literatură; 37

- dispozitivul de automatizare, prin utilizarea unei camere de incubație cu volum 39  
variabil, reduce la minimum necesar reactivii folosiți în timpul tuturor etapelor de prelucrare; 39

- dispozitivul de automatizare elimină necesitatea altor containere, agitatoare meca- 41  
nice, reducând astfel timpul de implicare al personalului uman și instrumentarul necesar pre- 41  
lucrării pieselor. 43

Se redă, mai jos, un exemplu de realizare a invenției în legătură și cu fig. 1 și 2, care 45  
prezintă schemele de realizare ale dispozitivului de automatizare: 45

- fig. 1, organul supus procesării (un creier de șobolan întreg în cazul de față cu 47  
dimensiuni de 1 cm x 1 cm x 2 cm) este introdus într-o cameră de incubare cu volum variabil 47  
**1**, ce se obține prin înfiletarea pistonului culisant inferior **2** în camera propriu-zisă. Camera 49  
se închide apoi prin înfiletarea în partea superioară a unui capac de plexiglas transparent la 49

# RO 131896 B1

1 UV **3** și rezistent la solvenți organici. Pistonul camerei și peretele acesteia conțin câte o  
conductă **4** prin care se poate recircula orice fluid introdus în cameră, cu ajutorul unei mini-  
3 pompe electrice de recirculare rezistentă la solvenți organici **5** (debit 1...5 ml/min), fluid care,  
la nevoie, poate fi evacuat și înlocuit printr-o valvă de golire/umplere. Capacul de plexiglas  
5 transparent la UV conține o conductă centrală **6** legată la o pompă de vid de laborator  
rezistentă la chimicale **7** (nivel vid minim 670 mmHg, debit ~ 10 l/min) și un robinet ce poate  
7 permite deconectarea pompei după obținerea vidului. Același capac este acoperit de un  
aranjament de LED-uri UV de spectru larg **8** (380 nm, 440 nm, 460 nm, minimum 10 W)  
9 atașate sub un reflector metallic **9** ce servește și drept radiator **10** pentru aranjamentul de  
LED-uri. În final, întreg dispozitivul, în afara pompei de vid, este realizat într-un format com-  
11 pact ce poate fi introdus și electroalimentat cu ușurință într-un frigider de laborator, în scopul  
varierii temperaturii piesei în funcție de protocolul dat;

13 - fig. 2 ilustrează schema aceluiși ansamblu, în care camera de incubare a fost  
redușă prin rotirea și urcarea pistonului inferior, pentru a se adapta unui volum mai redus al  
15 țesutului de interes (de exemplu o secțiune frontală dintr-un creier de șobolan, cu dimen-  
siunea de aproximativ 1 cm x 1 cm x 0,5 cm). Această caracteristică favorizează utilizarea  
17 unui volum minim de fluid în timpul procesării țesutului (anticorpii necesari imunomarcării pot  
fi costisitori). În mod opțional, dispozitivul poate fi dotat cu un element Peltier de răcire **11**  
19 (prevăzut și el cu un radiator de disipare a căldurii), și cu un senzor de temperatură **12** care  
să asigure posibilitatea controlului real al temperaturii.

## 21 **Exemplu**

Exemplul de realizare a invenției este utilizabil pentru specimene din diverse organe,  
23 de orice specie, pe porțiuni cum sunt: creier, rinichi, ficat, splină, intestin, etc, sau secțiuni  
din acestea, cu dimensiuni de maxim 2 cm x 2 cm x 2 cm.

25 Procedul de prelucrare a specimenelor anatomice și anatomopatologice, conform  
invenției, cuprinde următoarele etape (toate se desfășoară în camera de incubare a dispo-  
27 zitivului, reglată pentru volumul minim de fluid recirculat în funcție de volumul specimenului,  
cu pompa de recirculare pornită; temperatura de 4°C este obținută fie prin plasarea dispo-  
29 zitivului într-un frigider de laborator sau prin existența unui element Peltier de răcire pe  
peretele lateral al camerei de incubare).

31 a. Se depigmentează și se blochează autofluorescența țesutului ales dintre unul  
dintre organele selectate pentru imunomarcare, care se fixează prin: (i) deshidratare în băi  
33 succesive de metanol de concentrație crescătoare 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, câte  
30 min, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (la temperatura camerei, TC); (ii)  
35 depigmentare în apă oxigenată 5% în metanol timp de 18 h, sub lumina UV dată de aranja-  
mentul de LED-uri (4°C); (iii) rehidratare în serii de metanol 80%, 60%, 40%, 20% în tampon  
37 fosfat salin 1M (1 x PBS) timp de câte 30 min, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-  
uri (TC), etapele acestei faze efectuându-se fără vid, cu pompa de recirculare pornită.

39 b. Se spală țesutul în 1 x PBS sau 1 x PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton),  
1 h (TC), fără vid, cu pompa de recirculare pornită.

41 c. Se imunomarchează țesutul prin incubare în vid cu cocktail de anticorpi primari,  
de exemplu anticorpi anti-vase de sânge, anti-vase limfatice, anti-neuroni, anti-celule  
43 tumorale etc., marcați cu fluorofori precum FITC, TexasRed, Alexa Fluor488, Alexa Fluor555,  
Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710, diluați în 3% albumină serică bovină/3%  
45 DMSO/0,2% Tween în 1 x PBS pentru 3 zile (TC), diluția stabilită de experimentator prin  
tatonări în funcție de concentrația, afinitatea și aviditatea fiecărui anticorp în parte (în cazul  
47 în care anticorpii primari nu sunt marcați fluorescent, după încă un pas de spălare în soluție  
1 x PBS/detergent, țesutul este incubat cu un cocktail de anticorpi fluorescenți anti-specia  
49 primului set de anticorpi), sub vid, cu pompa de recirculare pornită.

# RO 131896 B1

- d. Se spală țesutul din etapa anterioară în 1 x PBS sau 1 x PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton), 2 zile (TC), fără vid, soluțiile de anticorp nelegat părăsind încet, prin difuziune, proba de țesut, fără vid, cu pompa de recirculare pornită; 1  
3
- e. Se clarifică organul prin: (i) incubare în 50% tetrahidrofuran în 1 x PBS timp de 18 h (TC), apoi pentru câte 1 h în soluții crescătoare de tetrahidrofuran (70%, 90%, 97%, 100%, 100%); (ii) incubare în diclormetan timp de 1 h (TC); (iii) incubare în dibenzileter cu 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol timp de minimum 1 h TC (agentul reducător  $\beta$ -mercaptoetanol prelungeste semnificativ timpul de viață al fluoroforilor, cum ar fi FITC, TexasRed, Alexa Fluor488, Alexa Fluor555, Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710 cu care sunt etichetați direct sau indirect anticorpii din etapa de imunomarcare), sub vid, cu pompa de recirculare pornită. 5  
7  
9  
11
- f. Se vizualizează organul, clarificat în etapa anterioară, la un microscop cu iluminare în plan optic, prin introducerea acestuia în camera de vizualizare a microscopului, și imersat în mediul final de dibenzileter conținând 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol ca agent reducător, fluorescența anticorpilor marcați fiind păstrată și piesele/organele putând fi conservate în frigider la 4°C minimum 45 de zile. 13  
15
- În concluzie, în urma acestui procedeu rapid (clarificarea în sine durând numai 3 zile) se obțin preparate din fragmente de organe imunomarcate fluorescent pentru diferite ținte antigenice (de exemplu vase de sânge sau limfatice, elemente celulare individuale sau specifice tisulare), clarificate în scopul examinării în microscopia în plan de lumină, care, față de rezultatele celorlalte procedee existente, prezintă un grad redus de autofluorescență (suficient de redusă pentru a putea examina în microscopia în plan de lumină un preparat marcat cu un anticorp vizibil în linia fluoroforului FITC sau AlexaFluor488, acolo unde autofluorescența tisulară este maximă), posibilitatea utilizării unor fragmente mai mari, de până la aproximativ 2 cm x 2 cm x 2 cm, datorită unei imunomarcări mai profunde a fragmentelor (de exemplu un encefal complet de șobolan în vârstă de 4 luni) prin difuzia sub vid și, respectiv, recircularea soluțiilor de incubare, precum și printr-o stabilitate superioară în timp (minimum 45 de zile) a imunomarcajului. 17  
19  
21  
23  
25  
27

# RO 131896 B1

## Revendicări

1

3 1. Dispozitiv automat pentru clarificare și imunomarcare în bloc a speci-  
5 anatomice și anatomopatologice într-o cameră de incubare cu volum variabil, **caracterizat**  
7 **prin aceea că** este constituit dintr-un sistem automat și independent format dintr-o cameră  
9 de incubare cu volum variabil (1), ce se realizează prin înfiletarea unui piston (2) în partea  
11 inferioară a camerei propriu-zise, un capac din plexiglas (3) transparent la UV și rezistent la  
13 solvenți organici, ce se înfiletează în partea superioară a camerei, un circuit de conducte (4)  
15 ce poate recircula orice fluid introdus în cameră cu ajutorul unei minipompe electrice de recir-  
17 culare (5) rezistentă la solvenți organici cu un debit 1...5 ml/min, o conductă centrată pe  
capacul de plexiglas (6), prin care o pompă de vid de laborator rezistentă la chimicale (7)  
poate crea vacuum cu un nivel de vid minim de -670 mmHg, la un debit de ~ 10 l/min în  
camera de incubare, un sistem de iluminare LED UV de spectru larg (8), la 380 nm, 440 nm,  
460 nm, la minim 10 W, montat pe capacul de plexiglas împreună cu un reflector (9) care  
servește și ca radiator (10) pentru aranjamentul de LED-uri, un element Peltier de răcire,  
prevăzut și el cu un radiator de disipare a căldurii (11), și cu un senzor de temperatură (12)  
care să asigure posibilitatea controlului real al temperaturii în camera de incubare.

19 2. Procedeu de clarificare și imunomarcare în bloc a speci-  
21 anatomice și anatomopatologice care se desfășoară într-un dispozitiv definit în revendicarea 1, **caracte-**  
23 **rizat prin aceea că** are următoarele faze:

25 a. se depigmentează și se blochează autofluorescența țesutului ales dintre unul dintre  
27 organele selectate pentru imunomarcare, care se fixează prin: (i) deshidratare în băi  
29 succesive de metanol de concentrație crescătoare 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, câte  
30 min, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (la temperatura camerei, TC); (ii)  
depigmentare în apa oxigenată 5% în metanol timp de 18 h, sub lumina UV dată de  
aranjamentul de LED-uri (4°C); (iii) rehidratare în serii de metanol 80%, 60%, 40%, 20% în  
tampon fosfat salin 1M (1 x PBS) timp de câte 30 min, sub lumina UV dată de aranjamentul  
de LED-uri (TC), etapele acestei faze efectuându-se fără vid, cu pompa de recirculare  
pornită;

31 b. se spală țesutul în 1 x PBS sau 1 x PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton),  
1 h, (TC), fără vid, cu pompa de recirculare pornită;

33 c. se imunomarchează țesutul prin incubare în vid cu cocktail de anticorpi primari, de  
35 exemplu anticorpi anti-vase de sânge, anti-vase limfatice, anti-neuroni, anti-celule tumorale  
etc., marcați cu fluorofori precum FITC, TexasRed, Alexa Fluor488, Alexa Fluor555, Alexa  
37 Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710, diluați în 3% albumină serică bovină/3%  
DMSO/0,2% Tween în 1 x PBS pentru 3 zile (TC), diluția stabilită de experimentator prin  
39 tatonări, în funcție de concentrația, afinitatea și aviditatea fiecărui anticorp în parte (în cazul  
în care anticorpii primari nu sunt marcați fluorescent, după încă un pas de spălare în soluție  
1 x PBS/detergent, țesutul este incubat cu un cocktail de anticorpi fluorescenți anti-specia  
primului set de anticorpi), sub vid, cu pompa de recirculare pornită;

41 d. se spală țesutul din etapa anterioară în 1 x PBS sau 1 x PBS cu detergent 0,2%  
43 (Tween sau Triton), 2 zile (TC) fără vid, soluțiile de anticorp nelegat părăsind încet, prin  
difuziune, proba de țesut, fără vid, cu pompa de recirculare pornită.

45 e. se clarifică organul prin: (i) incubare în 50% tetrahidrofuran în 1 x PBS timp de 18 h  
47 (TC), apoi pentru câte 1 h în soluții crescătoare de tetrahidrofuran (70%, 90%, 97%, 100%,  
100%); (ii) incubare în diclormetan timp de 1 h (TC); (iii) incubare în dibenzileter cu 10 mM  
β-mercaptoetanol timp de minimum 1 h TC (agentul reducător β-mercaptoetanol prelungește



## RO 131896 B1

semnificativ timpul de viață al fluoroforilor, cum ar fi FITC, TexasRed, Alexa Fluor488, Alexa Fluor555, Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710, cu care sunt etichetați direct sau indirect anticorpul din etapa de imunomarcare), sub vid, cu pompa de recirculare pornită.	1 3
f. se vizualizează organul, clarificat în etapa anterioară, la un microscop cu iluminare în plan optic, prin introducerea acestuia în camera de vizualizare a microscopului cu iluminare în plan optic, și imersat în mediul final de dibenzileter conținând 10 mM $\beta$ -mercapto- etanol ca agent reducător, fluorescența anticorpilor marcați fiind păstrată și piesele/organele putând fi conservate în frigider la 4°C minimum 45 de zile.	5 7

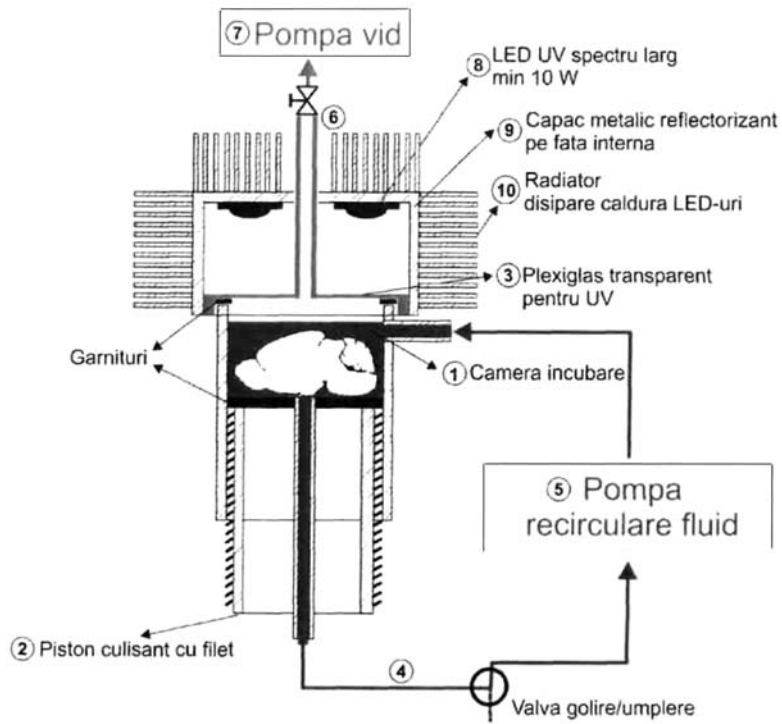


Fig. 1

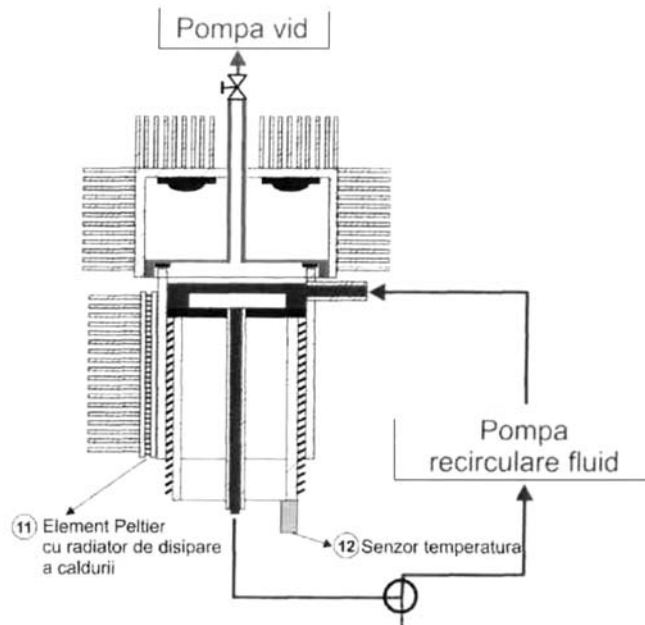


Fig. 2

