



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00686

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

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

(71) Solicitant:

• 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;
• MOGOANȚA LAURENȚIU, CALEA BUCUREȘTI NR. 30, BL. C 9, SC. 2, ET. 4, AP. 9, CRAIOVA, DJ, RO;
• MĂRGĂRIȚESCU 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;
• MOGOANȚA LAURENȚIU, CALEA BUCUREȘTI NR. 30, BL. C 9, SC. 2, ET. 4, AP. 9, CRAIOVA, DJ, RO;
• MĂRGĂRIȚESCU 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv automat și la un procedeu de clarificare și imunomarcare în bloc a speciemenelor anatomice și anatomopatologice, cu ajutorul acestui dispozitiv. Dispozitivul conform invenției este constituit dintr-o cameră de incubare (1) cu volum variabil, care se realizează prin înfiletarea unui piston (2) în partea inferioară a camerei propriu-zise, iar la partea superioară este înfiletat un capac (3) de plexiglas, transparent la radiații UV, și rezistent la solvenți organici, în interiorul camerei fiind prevăzut un circuit de conducte (4) care poate recircula orice fluid introdus în cameră, cu ajutorul unei minipompe (5) electrice de recirculare, pe capacul (3) de plexiglas fiind centrată o conductă (6) prin care o pompă de vid (7) de laborator, rezistentă la chimicale, poate crea vacuum cu un nivel de -670 mmHg, la un debit de aproximativ 10 l/min în camera de incubare (1), dintr-un sistem de iluminare (8) cu leduri UV de spectru larg, montat pe capacul (3) de plexiglas împreună cu un reflector (9) care servește și ca radiator pentru sistemul cu leduri, dintr-un element Peltier (11) de răcire, prevăzut, la rândul lui, cu un radiator de disipare a căldurii, și dintr-un senzor (12) de temperatură care să asigure posibilitatea controlului real al temperaturii în camera de incubare (1). Procedeu conform invenției constă dintr-o succesiune de etape de pregătire a speciemenelor tisulare de interes, în vederea eliminării autofluorescenței tisulare prin iradiere UV și incubare în apă oxigenată, a imunomarcării prin difuzie forțată în vid a anticorpilor în țesut, și a clarificării într-un solvent organic, într-un amestec cu agent reducător, ceea ce permite utilizarea acestor preparate în scop didactic, de diagnostic, dar și de cercetare, cu menținerea stabilității preparatului un timp îndelungat.

Revendicări: 2
Figuri: 2

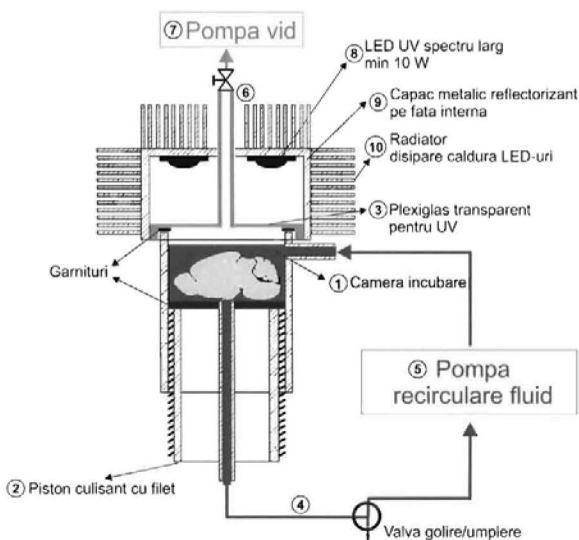
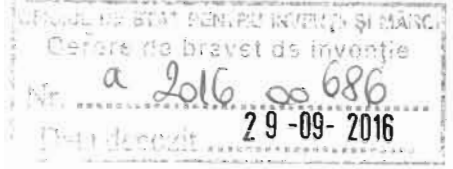


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIEREA INVENȚIEI

„DISPOZITIV AUTOMAT ȘI PROCEDEU DE CLARIFICARE ȘI IMUNOMARCARE ÎN BLOC A SPECIMENELOR ANATOMICE ȘI ANATOMOPATOLOGICE”

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

Investigarea probelor histologice sau anatomopatologice sub microscop reprezintă elementul central al tuturor aplicațiilor ce vizează evaluarea în scop diagnostic sau didactic 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 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 secțiunilor 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 mm³.

Chiar și tehnici imagistice multimodale, precum RMN și PET-CT, nu se pot adresa problemelor de expresie multiproteică la rezoluție celulară, singura abordare care asigură 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 Microsc, 1988; Rumble și colab., PLoS.One., 2013; Papp și colab., Neuroimage., 2014). În vreme ce stereologia are avantajul de a permite și imunomarcarea țesutului (IHC), această abordare aproximează numai proporțiile volumetrice, și pierde continuitatea absolută a țesutului, făcând imposibilă evaluarea proporțională a modificărilor volumetrice tisulare. 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 și epuizării moleculelor de fluorofor (Hoover și Squier, Nat.Photonics., 2013).

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 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 lumina (light sheet microscopy), aceste

*Fișă de lucru
Aici
cu un tabel
Daniel
mi*

*Alina
Alexandra
An
Bogdan
Tudor*

*1 Bogdan
cătălin
Dafin Fior Muresanu
Lupa
Mioara
Koumbarova*

50

tehnici fiind compatibile și cu imunomarcarea simplă/multiplă a unor ținte antigenice (Dodt si colab., Nat.Methods, 2007; Hama si colab., Nat.Neurosci., 2011; Becker si colab., PLoS.One., 2012; Erturk si colab., Nat Protoc, 2012; Chung si Deisseroth, Nat.Methods, 2013; Ke si colab., Nat.Neurosci., 2013; Kuwajima si colab., Development, 2013; Renier si colab., Cell, 2014; Susaki si colab., Cell, 2014; Yang si colab., Cell, 2014).

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

Buc. Jirca
Buc
Irina Miodor
Domitru

Popa
catali
Bor

Belen Tiber
Adina
ca

2
Măgariu
Irina
Arutu

Dalim Fior Muresanu
Jofe

Pe de alta parte, în microscopia cu fluorescență clasică problema autofluorescenței există de mult timp, fiind cunoscut faptul că flavonoizii, lipofuscina, colagenul, elastina, forma redusă a nicotinamid adenin dinucleotidei (NADH), și chiar fixarea cu formaldehidă în sine sunt surse de autofluorescență în țesuturi (Viegas si 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 CuSO₄ sau NaBH₄ (Schnell si colab., J Histochem Cytochem, 1999; Baschong si 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 250-400nm (Viegas si colab., Eur J Histochem, 2007), chiar și cu surse LED (Duong si Han, J Neurosci Methods, 2013). Tehnica expunerii la ultraviolete se preteaza aplicării nu numai fragmentelor tisulare destinate includerii în parafina, ci și 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 β-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 si 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 speciimenelor 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.

Bojan
caldin
Bata
Albystan
Caldin
Caldin
Adrian
Tudor
3 negocianta
Laurian
Caldin
Pierluigi
Dan
Pierluigi Nicolae
Dan
Salvatore Fior
Muresanu
Caldin

Procedeeul propus, conform invenției, înlătură multiplele dezavantaje cunoscute din stadiul tehnicii, prin aceea că se bazează pe un protocol rapid de deshidratare și clarificare a specimenelor, cu blocarea autofluorescenței prin supraexpunere la lumină UV, cu creșterea penetrării în țesut a anticorpilor utilizați ca markeri prin difuzie forțată sub vid și prin circularea continuă a soluțiilor de incubare printr-o pompă de fluid, cu prelungirea duratei de viață a specimenelor finale imunomarcate prin adaugarea unui agent reducător în soluția finală de clarificare, și prin automatizarea întregului procedeu într-un instrument simplu și cu costuri de utilizare reduse.

Protocolele prezentate mai jos fac referire la o serie de compuși utilizați în mod clasic în imunohistochimie, precum soluția tampon fosfat salin cu 8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,42g/l Na₂HPO₄, 0,24g/l KH₂PO₄ și pH=7,4 (1×PBS); detergenții Tween și Triton; dimetilsulfoxid (DMSO); și diferiți reporteri fluorescenți ce permit vizualizarea anticorpilor în microscopia în fluorescență [fluorescein izotiocianat – FITC; clorura acida a sulforodaminei 101 – TexasRed; sau compușii sulfonați din seria Alexa (Panchuk-Voloshina, N. și colab, J.Histochem.Cytochem, 1999)].

Dispozitivul automat pentru clarificare și imunomarcare în bloc a specimenelor anatomice și anatomopatologice realizat conform invenției constă într-o cameră de incubare cu volum variabil (1) ce se obține 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 în partea superioară a camerei, un circuit de conducte (4) ce poate recircula orice fluid introdus în cameră cu ajutorul unei minipompe electrice de recirculare (5) rezistentă la solvenți organici și cu un debit 1-5ml/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 670mmHg, la un debit de ~10 l/min în camera de incubare, un sistem de iluminare LED UV de spectru larg (8), cu varfuri de emisie la 380nm, 440nm, 460nm, la minim 10W, 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.

Procedeeul de clarificare și imunomarcare în bloc a specimenelor anatomice și anatomopatologice care se desfășoară într-un dispozitiv definit anterior în invenție, **are loc prin următoarele faze:**

Bozdu Pulesli Bari
Bolcu Tudor
4
Mosante
Leunabu
Clayalbu Clades
August
Dalin Fior Muresanu
Pizici Jovica
Azici
Pizici Medea
Dimitri
Dafne de

- a. Se depigmentează și se blochează autofluorescența țesutului ales dintre unul dintre organele selectate pentru imunomarcare, care se fixează prin: (i) deshidratare în bai succesive de metanol de concentrație crescătoare 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, câte 30 de minute, sub lumina UV data de aranjamentul de LED-uri (la temperatura camerei, TC); (ii) depigmentare în apa oxigenată 5% în metanol pentru 18h, sub lumina UV data de aranjamentul de LED-uri (4°C); (iii) rehidratare în serii de metanol 80%, 60%, 40%, 20% în tampon fosfat salin 1M (1×PBS) pentru câte 30 de minute, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (TC), etapele acestei faze efectuându-se fără vid, cu pompa de recirculare pornită;
- b. Se spală țesutul în 1×PBS sau 1×PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton), 1h, (TC), fără vid, cu pompa de recirculare pornită;
- 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 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% DMSO / 0,2% Tween în 1×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 1×PBS/detergent țesutul este incubat cu un cocktail de anticorpi fluorescenți anti-specia primului set de anticorpi), sub vid, cu pompa de recirculare pornită
- d. Se spală țesutul din etapa anterioară în 1×PBS sau 1×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;
- e. Se clarifică organul prin: (i) incubare în 50% tetrahidrofuran în 1×PBS timp de 18h (TC), apoi pentru câte 1h în soluții crescătoare de tetrahidrofuran (70%, 90%, 97%, 100%, 100%); (ii) incubare în diclormetan timp de 1h (TC); (iii) incubare în dibenzileter cu 10 mM β-mercaptoetanol timp de minimum 1h TC (agentul reducător β-mercaptoetanol prelungește 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;

Bojda
Catalin
Batu
Alexandra
Claus
Alex
5
Mogorosi
Lavinia
Sunt
Pieric Ionescu
Diana
Pieric Ionescu
Diana
Salim Fior Muresanu
Tafa

- 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 β -mercaptoetanol ca agent reducător, fluorescența anticorpilor marcați fiind păstrată și piesele/organele putând fi conservate în frigider la 4°C minim 45 de zile.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Utilizează un protocol general de clarificare de organ simplu și rapid, eficient chiar și pentru volume mari, derivat dintr-un protocol deja confirmat în literatura (iDISCO, (Renier și colab., Cell, 2014));
- Introduce utilizarea unei surse LED cu emisie UV în spectru larg (380nm, 440nm, 460nm) în scopul eliminării autofluorescenței;
- Autofluorescența indusă de suprafixarea țesutului, frecvent întâlnită în cazul unor preparate vechi, arhivate (frecvent în formol), poate fi eliminată prin expunerea la lumina UV;
- Introduce utilizarea β -mercaptoetanolului (10mM) în soluția finală de clarificare, în scopul creșterii timpului de viață al speciemenelor imunomarcate;
- Introduce utilizarea vacuum-ului în scopul impregnării piesei în timpul prelucrării, dar și în scopul facilitării difuziei anticorpilor vizând diverse ținte antigenice;
- Secvența tehnologică folosită este deosebit de simplă;
- Procedul se poate aplica pentru orice specimen fixat în prealabil în fixatori pe baza de apă sau alcool;
- Secvența tehnologică propusă a fost deja testată de autori în laborator, confirmând reducerea autofluorescenței și menținerea viabilității unor fluorofori precum FITC, TexasRed, Alexa Fluor488, Alexa Fluor555, Alexa Fluor596, Alexa Fluor610, și Alexa Fluor710;
- Introduce un dispozitiv de automatizare unic în domeniu, flexibil, simplu, eficient și accesibil ca preț ce permite repetabilitatea protocolului cu exact aceleași condiții de prelucrare a pieselor;

Papuc Iovica
Bici
Lavinia Nicolae
Dimitrie

Dalim Fior Muresanu

Bojdu Catalin
Bici
Alexandru Claudiu
Căp

Mozsanu
Laurința
Anuța

- Dispozitivul de automatizare propus poate fi utilizat atât în scopul automatizării procedurii de clarificare propus, cât și a secvențelor de imunomarcare sau a altor procedee de clarificare de organ existente în literatură;
- Dispozitivul de automatizare, prin utilizarea unei camere de incubație cu volum variabil, reduce la minimum necesar reactivii folosiți în timpul tuturor etapelor de prelucrare;
- Dispozitivul de automatizare elimină necesitatea altor containere, agitatoare mecanice, reducând astfel timpul de implicare al personalului uman, și instrumentarul necesar prelucrării pieselor.

Se redă mai jos un exemplu de realizare a invenției în legătură și cu figurile 1 și 2, care prezintă schemele de realizare ale dispozitivului de automatizare, iar mai jos și procedeul de imunomarcare și clarificare, care în medicină are denumirea specifică de protocol de imunomarcare și clarificare. Se face precizarea că dispozitivul conceput este specific realizării protocolului de imunomarcare și clarificare prezentat în invenție.

- **Figura 1:** Organul supus procesării (un creier de șobolan întreg în cazul de față cu dimensiuni de 1cm × 1cm × 2cm) este introdus într-o cameră de incubare cu volum variabil (1) ce se obține prin înfiletarea pistonului culisant inferior (2) în camera propriu-zisă. Camera se închide apoi prin înfiletarea în partea superioară a unui capac de plexiglas transparent la 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 minipompe electrice de recirculare rezistentă la solvenți organici (5) (debit 1-5ml/min), fluid care la nevoie poate fi evacuat și înlocuit printr-o valvă de golire/umplere. Capacul de plexiglas transparent la UV conține o conductă centrală (6) legată la o pompă de vid de laborator rezistentă la chimicale (7) (nivel vid minim -670mmHg, debit ~10l/min) și un robinet ce poate permite deconectarea pompei după obținerea vidului. Același capac este acoperit de un aranjament de LED-uri UV de spectru larg (8) (380nm, 440nm, 460nm, minim 10W) 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 compact ce poate fi introdus și electroalimentat cu ușurință

Bozda Catalin Bani clajatu clajatu clajatu
7
Mozzanta Leucaciu Anghel
Dafin Flor Muresan
Pieric Iulia
Zic
Iucii Mirela
Dandru
Ife

într-un frigider de laborator, în scopul varierii temperaturii piesei în funcție de protocolul dat.

- **Figura 2:** Ilustrează schema aceluiași ansamblu în care camera de incubare a fost redusă prin rotirea și urcarea pistonului inferior, pentru a se adapta unui volum mai redus al țesutului de interes (de exemplu o secțiune frontală dintr-un creier de șobolan, cu dimensiunea de aproximativ $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 0,5\text{cm}$). Această caracteristică favorizează utilizarea 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) (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.

Exemplul de realizare a invenției care se dă mai sus cu referire și la fig.1 și 2 prezentate anterior, este utilizabil pentru specimene din diverse organe, de orice specie, cum sunt: creier, rinichi, ficat, splină, intestin, etc., sau secțiuni din acestea, cu dimensiuni de maxim $2\text{cm} \times 2\text{cm} \times 2\text{cm}$.

Procedeul de prelucrare a speciemenelor anatomice și anatomopatologice, conform invenției, cuprinde următoarele etape (toate se desfășoară în camera de incubare a dispozitivului reglată pentru volumul minim de fluid recirculat în funcție de volumul speciemenului, cu pompa de recirculare pornită; temperatura de 4°C este obținută fie prin plasarea dispozitivului într-un frigider de laborator sau prin existența unui element Peltier de răcire pe perețele lateral al camerei de incubare):

- a. Se depigmentează și se blochează autofluorescența țesutului ales dintre unul dintre organele selectate pentru imunomarcare, care se fixează prin: (i) deshidratare în bai succesive de metanol de concentrație crescătoare 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, câte 30 de minute, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (la temperatura camerei, TC); (ii) depigmentare în apa oxigenată 5% în metanol pentru 18h, 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 ($1 \times \text{PBS}$) pentru câte 30 de minute, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (TC), etapele acestei faze efectuându-se fără vid, cu pompa de recirculare pornită;

Pizici Iovica
Buc
Anca Nicolae David

Bojlu
Căpă
Buc
Clayton Cladus
Alu

Maganda
Lavinia
Stiganta
Dafin Fior Nuresanu
Lafe

- b. Se spală țesutul în 1×PBS sau 1×PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton), 1h, (TC), fără vid, cu pompa de recirculare pornită;
- 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 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% DMSO / 0,2% Tween în 1×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 1×PBS/detergent țesutul este incubat cu un cocktail de anticorpi fluorescenți anti-specia primului set de anticorpi), sub vid, cu pompa de recirculare pornită
- d. Se spală țesutul din etapa anterioară în 1×PBS sau 1×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;
- e. Se clarifică organul prin: (i) incubare în 50% tetrahidrofuran în 1×PBS timp de 18h (TC), apoi pentru câte 1h în soluții crescătoare de tetrahidrofuran (70%, 90%, 97%, 100%, 100%; (ii) incubare în diclormetan timp de 1h (TC); (iii) incubare în dibenzileter cu 10 mM β-mercaptoetanol timp de minimum 1h TC (agentul reducător β-mercaptoetanol prelungește 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;
- 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 β-mercaptoetanol ca agent reducător, fluorescența anticorpilor marcați fiind păstrată și piesele/organele putând fi conservate în frigider la 4°C minim 45 de zile.

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 (ca de exemplu vase de sânge sau limfatice, elemente celulare individuale sau

Bogdan
Căpitan
Bănu

Clăduța Clăduța
Clăduța

Alexandra Tudor
Alexandra

Ioana
Ioana
Ioana

Dafina Fier
Dafina Fier
Dafina Fier

Maria Jovica
Maria
Micaela
Diana
Diana

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 2cm × 2cm × 2cm datorită unei imunomarcări mai profunde a fragmentelor (de exemplu un encefal complet de șobolan în varstă de 4 luni) prin difuzia sub vid și respectiv recircularea soluțiilor de incubare, precum și printr-o stabilitate superioară în timp (minim 45 de zile) a imunomarcajului.

Bogdan
Cuteri
Babi

Bogdan Prodan
Alina

Clayton
Claus
Cau

Mozart
Leonida
Mozart

Pieru Louisa
Bici
Pieru Nicolae Dorinel
Pieru

Dafin Flor Neuresanu
Ife Tala

REVENDICARI

1. Dispozitiv automat pentru clarificare și imunomarcare în bloc a speciimenelor anatomice și anatomopatologice într-o cameră de incubare cu volum variabil, caracterizat prin aceea că este constituit dintr-un sistem automat și independent format dintr-o camera de incubare cu volum variabil (1) ce se realizează prin infiletarea 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 infiletează în partea superioară a camerei, un circuit de conducte (4) ce poate recircula orice fluid introdus în camera cu ajutorul unei minipompe electrice de recirculare (5) rezistența la solvenți organici cu un debit 1-5ml/min, o conductă centrată pe capacul de plexiglas (6) prin care o pompa de vid de laborator rezistentă la chimicale (7) poate crea vacuum cu un nivel de vid minim de -670mmHg, la un debit de ~10 l/min în camera de incubare, un sistem de iluminare LED UV de spectru larg (8), la 380nm, 440nm, 460nm, la minim 10W, 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.

2. Procedeu de clarificare și imunomarcare în bloc a speciimenelor anatomice și anatomopatologice care se desfășoară într-un dispozitiv definit în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că are următoarele faze:

- a. Se depigmentează și se blochează autofluorescența tesutului ales dintre unul dintre organele selectate pentru imunomarcare, care se fixează prin: (i) deshidratare în bai succesive de metanol de concentrație crescătoare 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100%, câte 30 de minute, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (la temperatura camerei, TC); (ii) depigmentare în apa oxigenată 5% în metanol pentru 18h, 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×PBS) pentru cate 30 de minute, sub lumina UV dată de aranjamentul de LED-uri (TC), etapele acestei faze efectuându-se fără vid, cu pompa de recirculare pornită;
- b. Se spală țesutul în 1×PBS sau 1×PBS cu detergent 0,2% (Tween sau Triton), 1h, (TC), fără vid, cu pompa de recirculare pornită;

Bojda
Căpă
Bari

elaborat de Oana

Bojda
Căpă
Bari

11

Bojda
Căpă
Bari

Piric Jovica
Piric
Dafin Flor Muresanu

Bojda
Căpă
Bari

- 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 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% DMSO / 0,2% Tween în 1×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 1×PBS/detergent țesutul este incubat cu un cocktail de anticorpi fluorescenți anti-specia primului set de anticorpi), sub vid, cu pompa de recirculare pornită
- d. Se spală țesutul din etapa anterioară în 1×PBS sau 1×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;
- e. Se clarifică organul prin: (i) incubare în 50% tetrahidrofuran în 1×PBS timp de 18h (TC), apoi pentru câte 1h în soluții crescătoare de tetrahidrofuran (70%, 90%, 97%, 100%, 100%); (ii) incubare în diclormetan timp de 1h (TC); (iii) incubare în dibenzileter cu 10 mM β-mercaptoetanol timp de minimum 1h TC (agentul reducător β-mercaptoetanol prelungește 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;
- 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 β-mercaptoetanol ca agent reducător, fluorescența anticorpilor marcați fiind păstrată și piesele/organele putând fi conservate în frigider la 4°C minim 45 de zile.

Bogdan Patoli
Ber
Majandra
Balazs Todor
Alexandra
Mariana
Kamilla
Dafin Flor Huresanu
Diana Nicolai David
Dafin Flor Huresanu

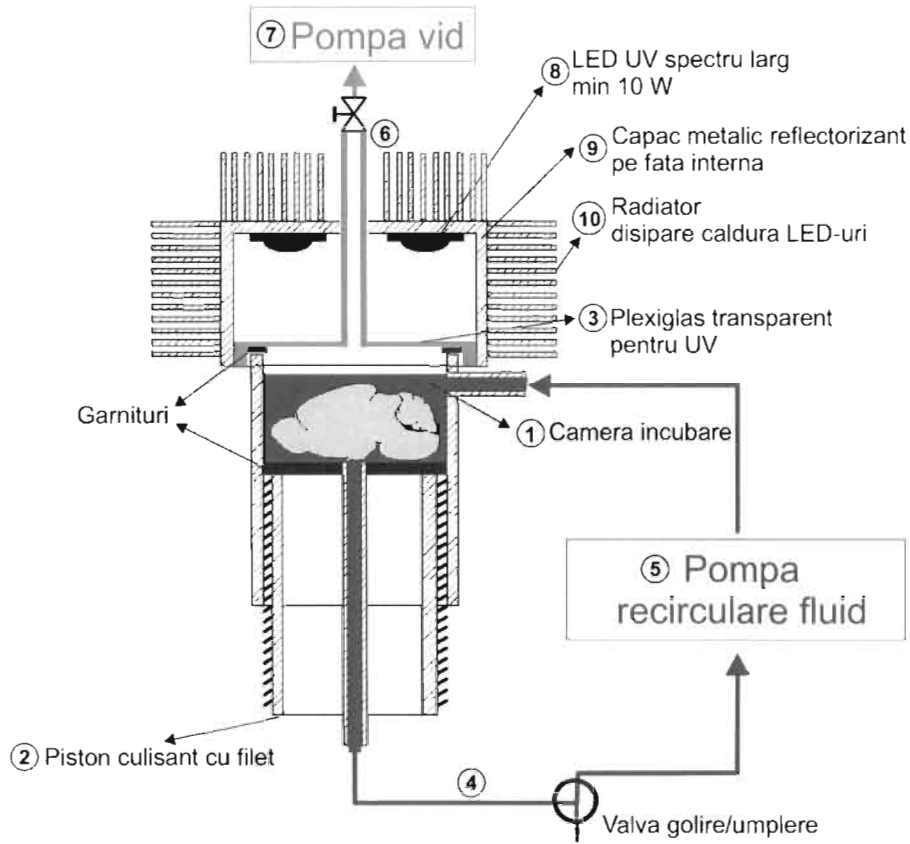


Figura 1

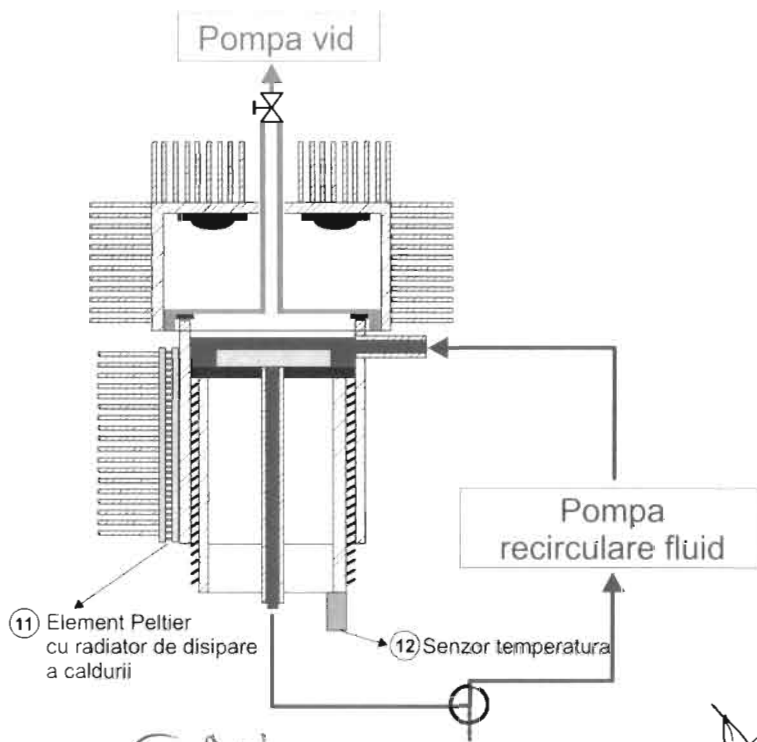


Figura 2

*Bogdan
Cătu
Băni
Mădălina
Cădu
Cădu*

*Petric, Iovica
Dău
Petric, Madalena
Dău
Dău, Florin, Kureșanu
Mădălina
Cădu*