

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II – MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ**

VĂDUVA G. ADRIAN-OVIDIU



TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII PERSONALE LA IMPLEMENTAREA
ȘI DEZVOLTAREA MICROSCOPIEI CONFOCALE
ÎN CADRUL UNIVERSITĂȚII DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "VICTOR BABEȘ" DIN TIMIȘOARA**

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. DEMA ALIS LILIANA-CARMEN

**Timișoara
2017**

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VII
Lista abrevierilor	VIII
Indexul Figurilor	X
Indexul Tabelelor	XIV
Mulțumiri.....	XVI
INTRODUCERE	XVII

PARTEA GENERALĂ

1. Aplicații ale microscopiei confocale în cercetare	1
1.1. Scurt istoric al dezvoltării microscopiei confocale.....	1
1.2. Structura tipică a unui sistem actual de microscopie confocală ...	2
1.3. Tipuri de probe folosite în microscopia confocală.....	5
1.4. Modalități de vizualizare folosite în microscopie confocală.....	6
1.5. Tipuri de imagini obținute în microscopie confocală	7
1.6. Efectuarea măsurătorilor în microscopie confocală	10
2. Aplicații clinice ale microscopiei confocale	12
2.1. Utilizarea microscopie confocale <i>ex vivo</i> în practica clinică.....	12
2.2. Utilizarea microscopie confocale <i>in vivo</i> în practica clinică.....	14
2.3. Modalități de evaluare a stresului oxidativ în microscopie confocală.....	16
2.3.1. Speciile reactive de oxigen și de nitrogen. sistemele cu activitate antioxidantă	16
2.3.2. Surse de producere a ros.....	18
2.3.3. Modalități de detectare și cuantificare a stresului oxidativ .	19

PARTEA SPECIFICĂ

Studiul 1. Rolul monoaminoxidazelor în producerea stresului oxidativ la nivel cardiovascular în diabetul zaharat indus experimental	23
1.1. Scopul studiului.....	23
1.2. Motivația studiului	23
1.3. Material și metodă	23

1.3.1. Recoltarea fragmentelor de miocard	24
1.3.2. Protocolul de marcarea a izoenzimelor mao-a și mao-b pentru studii de imunofluorescență	24
1.3.3. Achiziția de imagini în microscopie confocală și măsurarea intensității fluorescențe	25
1.4. Rezultate	25
1.5. Discuții	30
1.6. Concluzie	30
 Studiul 2. Caracterizarea nivelelor de H₂O₂ în contextul stresului oxidativ la pacienții diabetici cu afecțiuni cardiace	
2.1. Scopul studiului	31
2.2. Motivația studiului	31
2.3. Material și metodă	31
2.3.1. Recoltarea materialului tisular	32
2.3.2. Protocolul de colorare cu 2'7'-dichlorofluorescein diacetate	32
2.4. Rezultate	33
2.4.1. Achiziția de imagini în microscopie confocală și măsurarea intensității fluorescențe	33
2.5. Discuții	38
2.6. Concluzii	39
 Studiul 3. Compartimentalizarea producției de specii reactive de oxigen în rinichiul de șobolan cu diabet indus experimental.....	
3.1. Scopul studiului	40
3.2. Motivația studiului	40
3.3. Material și metodă	40
3.3.1. Inducerea diabetului și evoluția acestuia	41
3.3.2. Recoltarea rinichilor și procesarea fragmentelor tisulare în vederea examinării în microscopie confocală.....	41
3.3.3. Examinarea în microscopie confocală și achiziția de imagini	42
3.3.4. Procesarea și analiza de imagini.....	42
3.3.5. Procesarea materialului tisular pentru examinare în microscopie optică	47
3.4. Rezultate	47

3.4.1. Statusul diabetic și greutatea corporală.....	47
3.4.2. Intensitatea semnalului fluorescent în colorația cu DHE ...	47
3.4.3. Nivelele dhe ajustate la greutate	49
3.4.4. Aspectele histologice ale rinichilor în microscopie optică ..	50
3.5. Discuții	51
3.6. Concluzii	53
Studiul 4. Rolul monoaminoxidazelor în creșterea nivelelor de ros la nivel vascular la șobolanii cu diabet zaharat indus experimental	54
4.1. Scopul studiului.....	54
4.2. Motivația studiului	54
4.3. Material și metodă	55
4.3.1. Recoltarea fragmentelor de aorta și procesarea acestora pentru examinarea în microscopie confocală	55
4.3.2. Protocolul de detecție automată a semnalului fluorescent în examinarea secțiunilor de aortă	56
4.4. Rezultate	60
4.5. Discuții	61
4.6. Concluzii	62
Studiul 5. Caracterizarea <i>in vivo</i> a nivelelor de specii reactive de oxigen generate în rinichiul de șobolan cu boală cronică de rinichi indusă experimental	63
5.1. Scopul studiului.....	63
5.2. Motivația studiului	63
5.3. Material și metodă	64
5.3.1. Inducerea bolii cronice de rinichi prin obstrucția ureterală unilaterală	65
5.3.2. Examinarea <i>in vivo</i> a rinichilor folosind microscopia confocală	68
5.3.3. Cuantificarea intensității fluorescenței DHE	70
5.3.4. Prelevarea, procesarea și analiza histologică a rinichilor evaluați în microscopie confocală	72
5.3.5. Interpretarea datelor și analiza statistică	72
5.4. Rezultate	72
5.4.1. Cuantificarea intensității integrate a fluorescenței.....	73

5.4.2. Cuantificarea semnalului fluorescent la nivel nuclear	75
5.4.3. Evaluarea morfologică macroscopică și microscopică a parenchimului renal	76
5.5. Discuții	78
5.6. Concluzii	80
Studiul 6. Dezvoltarea unui dispozitiv portabil pentru crioinclusiune și a metodei de lucru cu acesta	81
6.1. Scopul studiului	81
6.2. Motivația studiului	81
6.3. Material și metodă	83
6.3.1. Varianta conceptuală trimisă spre brevetare	83
6.3.2. Determinarea curbei de încălzire și măsurarea autonomiei aparaturii	86
6.3.3. Protocolul experimental pentru inducerea diabetului zaharat la șobolani wistar	86
6.4. Rezultate	87
6.4.1. Varianta constructivă a dispozitivului de crioinclusiune	87
6.4.2. Curba de încălzire și autonomia dispozitivului	89
6.4.3. Aspecte morfologice ale secțiunilor incubate cu DHE	90
6.5. Discuții	92
6.6. Concluzii	94
Concluzii	95
Bibliografie	97
ANEXE	I

REZUMAT

Prima descriere a unui dispozitiv optic de evaluare microscopică a probelor în sistem confocal a aparținut lui Marvin Minsky. Revigorarea interesului pentru sistemul confocal a apărut în anii '80, odată cu folosirea pe scară largă a tehnicilor de imunofluorescență. Printre primele prototipuri dezvoltate au fost cele descrise de Amos și White, respectiv Carlsson, iar primul set de imagini axiale cu detalii remarcabile ale aranjamentului cromatinei la nivel nuclear au fost publicate de Brakenhoff și colaboratorii.

Microscopia confocală este în mod uzual utilizată în biologie, medicină, sau studiul materialelor. Probele biologice folosite sunt variate, de la celule individuale cultivate *in vitro* până la organe vizualizate *in vivo* sau *ex vivo*. Viabilitatea materialului biologic depinde de tipul de procesare a materialului pentru studiile de microscopie: celule viabile în studiile *in vitro* și *in vivo*, fragmentele tisulare sau organe întregi menținute în medii nutritive, de exemplu în băi de organ, respectiv celule și țesuturi fixate în diverse tipuri de soluții fixatoare. Nu mai puțin importantă este procesarea la gheață, care mai poate păstra, în anumite circumstanțe, viabilitatea materialului biologic.

Markerii fluorescenței pot fi endogeni (sintetizați de celulele țintă, respectiv structuri autofluorescente) sau exogeni. Markerii exogeni sunt anticorpii marcați cu fluorofori sau substanțe cu fluorescență intrinsecă ori care prin metabolizare devin fluorescente.

Tipurile de examinări frecvent întâlnite în microscopia confocală sunt: evaluări bidimensionale (2D) și tridimensionale ale preparatelor (3D), evaluări bidimensionale sau tridimensionale ale preparatelor, cu achiziții periodice în timp (4D).

Imaginile obținute în microscopia confocală reprezintă un set de date care poate fi evaluat și prelucrat pentru a obține rezultate obiective. Astfel, pot fi efectuate măsurători de morfometrie: dimensiuni liniare, diametre, arii, distanțe între obiecte, densitatea obiectelor pe suprafețe, etc.

Din punct de vedere al tipului de examinare în context clinic, microscopia confocală abordează două situații: *in vivo* și *ex vivo*. Pentru fiecare dintre ele se pot folosi două principii distincte de vizualizare. Primul dintre ele folosește lumina reflectată de țesuturi, după stimulare cu o anumită lungime de undă specific determinată pentru tipul de țesut evaluat (reflectance confocal microscopy – RCM). A doua tehnică presupune folosirea unor fluorofori sau substanțe de contrast care pot fi stimulați prin iluminarea cu lungimea de undă caracteristică.

Materialul tisular excizat în cursul intervențiilor chirurgicale poate fi vizualizat în microscopie confocală în stare nativă, fără o fixare prealabilă. În diverse studii au fost utilizate substanțe de contrast sau fluorofori precum albastrul de toluidină sau albastrul de metilen. Datorită afinității pentru ADN, se folosește portocaliu de acridină pentru marcarea nucleilor.

Cea mai utilizată cale de examinare *in vivo* în microscopie confocală este cea endoscopică. Din punctul de vedere al structurii dispozitivelor, distingem două tipuri majore. Primul dintre ele integrează sistemul confocal în sistemul

optic intrinsec al endoscopului, lăsând liber canalul endoscopului pentru a fi folosit, de exemplu, pentru introducerea pensei de biopsie. Al doilea sistem folosește canalul de lucru al endoscopului pentru a introduce un dispozitiv-probă cu rol de cap de examinare microscopică confocală. Avantajul celui de al doilea sistem este faptul că poate fi montat pe orice tip de endoscop, în timp ce primul nu poate fi achiziționat ca unitate separată.

Sursa de energie a celulelor este reprezentată de degradarea oxidativă a diverselor substraturi la nivel mitocondrial. Efectele nefaste ale reacțiilor oxidative necontrolate sunt contracarate de un ansamblu de compuși și sisteme cu acțiune anti-oxidantă.

Stresul oxidativ a fost definit ca fiind o stare de dezechilibru între producția de radicali liberi și capacitatea antioxidantă a organismului, în sensul unei balanțe pozitive în favoarea primilor. Dean Jones a propus o altă definiție a stresului oxidativ, pornind de la analiza nivelelor serice a două sisteme redox: GSH/GSSG și Cys/CySS. Stresul oxidativ, potrivit lui Jones, se definește ca un dezechilibru în semnalizarea și controlul proceselor redox.

Pentru cuantificarea stresului oxidativ, au fost dezvoltate numeroase tehnici. Majoritatea studiilor care abordează detecția și caracterizarea stresului oxidativ utilizează tehnici pentru detecția activității oxidative (de exemplu generarea ROS) sau capacității antioxidante, mai rar fiind implicate ambele tipuri.

SCOPUL TEZEI

Scopul acestei teze de doctorat a fost de a dezvolta noi direcții de cercetare, prin implementarea și dezvoltarea tehnicilor de microscopie confocală în cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" Timișoara. În plus, am urmărit dezvoltarea infrastructurii necesare efectuării experimentelor.

Obiectivele urmărite au fost următoarele:

1. implementarea tehnicilor de imunofluorescență, folosind fragmente de țesut procesate la gheață;
2. implementarea tehnicilor de monitorizare a producției de specii reactive de oxigen, prin folosirea DCF pe țesuturi înghețate, respectiv DHE *in vivo* și pe probe procesate la gheață;
3. dezvoltarea unui model experimental de monitorizare în dinamică, *in vivo*, a producției ROS la șobolani cu obstrucție urinară unilaterală, ca prototip de boală cronică de rinichi;
4. implementarea tehnicilor de analiză a imaginilor obținute în microscopie confocală;
5. conceperea și construirea unui dispozitiv portabil nou pentru crioincluderea materialului tisular.

STUDIUL 1. ROLUL MONOAMINOXIDAZELOR ÎN PRODUCEREA STRESULUI OXIDATIV LA NIVEL CARDIOVASCULAR ÎN DIABETUL ZAHARAT INDUS EXPERIMENTAL

Scopul studiului de față a fost de a caracteriza expresia imunohistochimică a MAO A și B în inele aortice și la nivelul miocardului de șobolan.

Diabetul zaharat a fost indus experimental printr-o singură injecție intraperitoneală de streptozotocin (50mg/kg). Pentru grupul de control s-a injectat intraperitoneal soluție tampon citrat (0.01 ml/L, pH=4.5). După o perioadă de 2 luni de evoluție a diabetului zaharat, fragmente de miocard au fost recoltate și incluse rapid în mediu de înghețare OCT (TissueTek, Sakura). Au fost efectuate secțiuni cu grosimea de 6μm pentru a fi incubate cu anticorpi primari anti-MAO-A (Abcam ab126751, 1:50) și anti-MAO-B (Abcam ab125010, 1:50), respectiv anticorpi secundari marcați cu Texas Red (SantaCruz SC2780, 1:200). Contracolorarea nucleilor a fost efectuată cu 4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (SantaCruz sc3598). Montarea lamelelor pe lame a fost realizată folosind un mediu apos pentru fluorescență (Vectashield, Vector Labs). Secțiunile realizate conform protocolului anterior descris au fost examinate la un microscop confocal Olympus Fluoview FV1000. Imaginile obținute au fost apoi transferate în programul de analiză de imagini Icy. Am definit regiuni de interes liniare, iar pentru fiecare pixel aferent acestor linii au fost notate intensitățile luminoase, măsurate în unități arbitrare.

Expresia MAO-A a fost similară în lotul de control cu cea din lotul șobolanilor diabetici (641,21 UA, respectiv 628,37 UA). Intensitatea marcajului pentru MAO-B a fost mai crescută în lotul șobolanilor cu diabet zaharat indus experimental, în comparație cu lotul șobolanilor de control (321,9 UA , respectiv 728,79 UA).

Folosirea microscopiei confocale pentru a cuantifica în mod obiectiv nivelele de MAO-A și MAO-B la nivel cardiac, ne-a permis să demonstrăm, în premieră, supraexpresia izoformei B a acestei enzime, în condițiile diabetului zaharat experimental la șobolan.

STUDIUL II CARACTERIZAREA NIVELELOR DE H₂O₂ IN CONTEXTUL STRESULUI OXIDATIV LA PACIENȚII DIABETICI CU AFECȚIUNI CARDIACE

Scopul studiului de față a fost de a cuantifica nivelele de H₂O₂ din miocitele cardiace umane obținute de la pacienți cu afecțiuni coronariene și diabet zaharat asociat, folosind tehnici de microscopie confocală.

Studiul de față s-a realizat pe un lot de 30 de pacienți internați în Institutul de Boli Cardiovasculare Timișoara, programați pentru intervenții chirurgicale pe cord deschis. Pacienții au fost randomizați în 3 grupuri, după cum urmează:

1. grupul de control, care a inclus pacienți cu afecțiuni valvulare, fără istoric de boală coronariană;

2. grupul pacienților cu boală coronariană, fără diabet zaharat asociat;
3. grupul pacienților diabetici cu istoric de boală coronariană.

În timpul intervenției chirurgicale, după realizarea by-pass-ului cardiopulmonar, s-au recoltat fragmente mici de miocard de la nivelul auriculului drept. Fragmentele destinate evaluării în microscopie confocală au fost incluse în OCT și înghețate. Am efectuat secțiuni cu grosimea de 8μm, am incubat secțiunile de fibre miocardice, în cameră obscură, pentru 30 de minute la temperatura camerei, cu 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF),(Sigma-Aldrich, D6882). Secțiunile obținute conform protocolului descris mai sus le-am examinat imediat la un microscop confocal Olympus Fluoview FV1000, cu un obiectiv cu mărirea de 40x, NA=0.9. Pentru a determina parametrii optimi pentru obținerea celui mai bun raport semnal DCF/semnal autofluorescență, respectiv pentru a limita cantitatea de lumină emisă direct de țesut, fără marcaj, am parcurs un algoritm de deconvoluție spectrală. În programul de procesare de imagini /cy am construit un algoritm de analiză automată a imaginilor, care cuprinde următoarele etape:

- identificarea fișierelor cu extensia TIFF din directorul indicat;
- deschiderea fiecărui fișier în parte;
- aplicarea parametrilor de detecție cu formarea de regiuni de interes (ROI) corespunzătoare elementelor cu semnal pozitiv din imagine;
- suprapunerea ROI peste imaginea originală pentru determinarea ariilor care necesită cuantificarea semnalului fluorescent;
- calcularea parametrilor acestor zone și scrierea parametrilor determinați într-un fișier de tip Microsoft Excel (xls), care are denumirea similară cu a imaginii examinate;
- crearea unei imagini noi prin suprapunerea ROI peste imaginea originală și salvarea acesteia sub forma unui nou fișier TIFF, având sufixul *_processed*.

După centralizarea rezultatelor obținute, am remarcat că, deși diferențele dintre cele 3 grupuri sunt prezente, ele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic în testul ANOVA ($p=0.4142$). Astfel, valorile medii au fost următoarele: pentru grupul de control 341,6UA (SEM=24.95), pentru grupul pacienților cu boală coronariană 405,8UA (SEM=39,94), respectiv 400,1UA (SEM=13,31) pentru grupul pacienților diabetici cu boală coronariană asociată. Microscopia confocală a adus un plus de valoare rezultatelor obținute prin tehnici morfologice fluorescente permițând ajustarea corespunzătoare a parametrilor de achiziție de imagini.

STUDIUL 3. COMPARTIMENTALIZAREA PRODUCȚIEI DE SPECII REACTIVE DE OXIGEN ÎN RINICHIUL DE ȘOBOLAN CU DIABET ZAHARAT INDUS EXPERIMENTAL

Prin acest studiu am dorit să caracterizăm producția de ROS în diferitele compartimente ale parenchimului renal, și anume glomerular, vascular și tubulo-

interstițial, folosind un model experimental de boală cronică de rinichi indusă de diabetul zaharat.

Diabetul zaharat a fost indus experimental la un lot de 12 șobolani, prin injectarea unei doze unice de 50mg/kg streptozotocin, intraperitoneal. Fragmente reprezentative ale corticalei renale au fost recoltate, după 2 luni de evoluție a diabetului, și incluse imediat în OCT. Din acestea am efectuat criosecțiuni de 20μm grosime au fost incubate cu DHE pentru 30 de minute, în întuneric, la temperatura camerei. Lamele obținute au fost imediat examinate cu un microscop confocal Olympus Fluoview FV1000 (obiectiv de tip UPLSAPO, mărire 20x, NA 0.75, excitație cu laser cu lungime de undă 405nm, detecția emisiei începând de la 500nm, folosind un filtru barieră cu lărgimea de undă de 100nm, viteza de eșantionare de 4us/pixel). Am dezvoltat un algoritm automat de procesare de imagini în Icy, care să cuprindă următoarele etape:

- identificarea imaginilor de tip TIFF din directorul indicat;
- segmentarea nucleilor folosind blocul de operare HK-Means;
- folosirea ROI obținute prin segmentare pentru a extrage intensitățile de semnal pentru fiecare nucleu individual;
- inserarea valorilor intensităților într-un tabel de tip MS Excel.

La finalul experimentului, șobolanii au fost distribuiți în două grupuri de studiu: animale cu greutate până la 400g (G1), respectiv peste 400g (G2). Valorile medii ale intensității fluorescenței au depășit 900 UA doar la 2 din cei 6 șobolani (33%) G1, în timp ce cei din G2 au prezentat valori medii peste 900 UA. Testul ANOVA pentru variații între cele 3 compartimente ale parenchimului renal pentru fiecare dintre șobolani a decelat valori semnificative pentru doi din G1 ($p=0.01$, respectiv $p=0.04$), respectiv tot pentru doi din G2 ($p<0.001$). Testele de comparare multiplă Tukey pentru variații individuale au obiectivat diferențe semnificative între compartimentul glomerular și cel vascular, respectiv glomerular și tubulointerstițial, pentru 2 din cei 6 șobolani G2 (33%). 4 din 6 șobolani G1 au prezentat valori ale intensității fluorescenței mai mari la nivel glomerular decât la nivel vascular. 4 din 6 șobolani G2 au prezentat valori mai mari la nivel vascular decât la nivel glomerular, respectiv 5 din 6 au avut valori mai mari la nivel vascular decât tubulointerstițial. Testul ANOVA pentru compararea celor două grupuri a evidențiat un efect semnificativ pentru factorul greutate ($p=0.006$), în timp ce factorul compartiment nu a prezentat un efect de semnificație statistică ($p=0.8123$). Bazat pe rezultatele obținute, am definit un nou parametru, wROS – weight adjusted ROS, care se calculează prin împărțirea valorii medii a intensității fluorescenței DHE la greutatea animalului. Pentru compartimentul vascular și glomerular, valorile wROS au fost mai mari pentru șobolanii G2.

Studiul de față ne-a permis să evidențiem în microscopia confocală o relație între greutatea corporală și nivelele de ROS detectate. Compartimentele vascular și glomerular au prezentat modificările cele mai evidente în raport cu factorul greutate. Procesarea imaginilor de microscopie confocală a fost efectuată utilizând un algoritm nou dezvoltat, care a conferit uniformitate în analiză și viteză crescută în procesarea rapidă a întregului set de imagini.

STUDIUL 4 ROLUL MONOAMINOXIDAZELOR ÎN CREȘTEREA NIVELELOR DE ROS LA NIVEL VASCULAR LA ȘOBOLANII CU DIABET ZAHARAT INDUS EXPERIMENTAL

Scopul acestui studiu a fost de a caracteriza producția de ROS la nivel vascular, într-un model experimental de diabet zaharat indus la șobolan, urmărind dependența față de activitatea, respectiv inhibiția MAO.

Studiul a fost efectuat pe șobolani Wistar, cărora li s-a indus diabetul zaharat prin injecție intraperitoneală de streptozotocin. Pentru a studia contribuția MAO la producția de H_2O_2 , au fost pregătite următoarele 8 probe:

1. control
2. diabet zaharat
3. control + incubare cu inhibitori MAO (Clorgilină și Deprenil, 10uM)
4. control + H_2O_2
5. diabet + incubare cu inhibitori MAO (Clorgilină și Deprenil, 10uM)
6. control + MAO 0,1 U
7. control + MAO 10 U
8. control + MAO 1 U

Probele de mai sus au fost incluse în OCT (TissueTek) și înghețate în vederea secționării la o grosime de 20um și incubării cu DHE (30 de minute la temperatura camerei). Imediat după incubarea cu DHE, lamele obținute au fost examinate în microscopie confocală, folosind un microscop Olympus Fluoview FV1000. Parametrii de excitare au fost de 405nm pentru cuantificarea 2-hidroetididului și 488nm pentru etidina. Pentru detecție, am folosit aceleași setări pentru cele 2 situații, respectiv folosind un filtru-barieră cu lărgimea de undă de 100nm, poziționat la 500nm. Pentru fiecare probă, au fost achiziționate câte 3 seturi de imagini, pe două canale, pentru DAPI (componenta autofluorescentă dată de lamelele elastice) și DHE. Am dezvoltat protocolul automat de procesare a imaginilor, care include pașii următori:

- extracția de canal pentru procesare individuală;
- segmentarea semnalului pozitiv folosind pragul de intensitate (threshold), cu obținerea de ROI inițiale pentru fiecare canal în parte;
- operație booleană de tip XOR, cu scopul de a elimina din canalul DHE semnalul pozitiv din canalul DAPI, cu generarea unei ROI finale;
- folosirea regiunii de interes finală pentru extragerea intensităților de semnal din imaginea originală și exportarea datelor într-un fișier de tip MS Excel;
- crearea unui nou fișier imagine care să conțină suprapunerea ROI finale peste imaginea originală – imagine control pentru acuratețea detecției.

Am remarcat o creștere a nivelelor ROS în condițiile diabetului zaharat, incubării cu H_2O_2 sau MAO, respectiv o scădere în cazul folosirii inhibitorilor de MAO.

Studiul nostru a confirmat utilitatea tehnicilor de microscopie confocală pentru caracterizarea indirectă a activității MAO la nivel vascular, într-un model experimental de diabet indus prin injecție de streptozotocin, la șobolani Wistar.

STUDIUL 5. CARACTERIZAREA *IN VIVO* A NIVELELOR DE SPECII REACTIVE DE OXIGEN GENERATE ÎN RINICHIUL DE ȘOBOLAN CU BOALĂ CRONICĂ DE RINICHI INDUSĂ EXPERIMENTAL

Scopul studiului de față a fost de a dezvolta un model experimental viabil pentru cuantificarea *in vivo* a speciilor reactive de oxigen, folosind tehnici de microscopie confocală.

Am efectuat un studiu randomizat controlat pe 36 de șobolani masculi Wistar, care au fost distribuiți în 6 grupuri de studiu (GE): 3 grupuri de șobolani de control și 3 grupuri cu obstrucție ureterală unilaterală (UUO), realizată prin prin ligatura ureterului stâng. Cele 3 grupuri pentru fiecare lot intervențional au fost examinate la 2, 6 și 10 zile după momentul instituirii ligaturii ureterale unilaterale.

Examinarea *in vivo* a rinichiului stâng a fost efectuată la un microscop confocal inversat Olympus Fluoview FV1000 (excitație cu laseri cu lungime de undă de 405nm și 488nm, emisie detectată pe o plajă de 100nm, folosind un filtru barieră setat la 555nm, obiectiv Olympus Plan SuperApochromat, mărire 20x, apertură numerică NA=0.75). Am utilizat o placă de aluminiu cu un orificiu situat central cu rol de fereastră de vizualizare. Analiza imaginilor obținute s-a făcut pe două căi: calcularea intensității integrate a fluorescenței (IIF) pentru determinarea semnalului DHE global, respectiv determinarea intensității fluorescenței la nivel nuclear.

Am stabilit următoarele grupuri de analiză:

1. grupurile de analiză a rezultatelor dependent de stimulul de excitație și intervenție (GA):
 - a. control, excitație 405nm – C405
 - b. control, excitație 488nm – C488
 - c. ligatură, excitație 405nm – L405
 - d. ligatură, excitație 488nm – L488
2. grupurile de analiză a rezultatelor cu repartiție corespunzătoare protocolului de lucru (GE):
 - a. control, evaluat în ziua a 2-a – C2
 - b. control, evaluat în ziua 6 – C6
 - c. control, evaluat în ziua 10 – C10
 - d. ligatură, evaluat în ziua a 2-a – L2
 - e. ligatură, evaluat în ziua 6 – L6
 - f. ligatură, evaluat în ziua 10 – L10

Rezultatele cuantificării IIF

În toate grupurile de analiză am detectat nivele mai crescute ale intensității fluorescenței în ziua 6, comparativ cu cele din ziua 2, respectiv ziua 10. Analizând valorile medii individuale pentru grupurile GE, am remarcat valori mai

mari ale intensității fluorescenței pentru L405 față de C405, cu inversarea raportului pentru stimulul de excitație 488, respectiv intensități mai mari în grupul C488 față de L488. Compararea statistică folosind testul t – nepereche ne-a evidențiat diferențele prezentate în tabelul de mai jos:

Lungime de undă de excitație	Grupuri comparate	Nivel de semnificație
405	C2 vs C6	p=0.0013
	L2 vs L6	p=0.0128
488	C2 vs C6	p<0.0001
	L2 vs L6	p=0.017
	C6 vs C10	0.005
	C6 vs L6	0.0071

În vederea estimării contribuției aduse de efectuarea ligaturii la generarea ROS, am analizat diferența absolută a mediilor valorilor intensităților determinate dintre grupurile cu ligatură și cele de control. Astfel, am remarcat o creștere în ziua 10 față de ziua 6, în cazul folosirii determinării cu laser de 405nm.

Analiza intensității semnalului nuclear

Nivelele cele mai crescute ale intensității semnalului fluorescent le-am identificat în ziua a 6-a pentru ambele grupuri L405 și L488, pentru ca apoi acestea să scadă în ziua a 10-a. Analiza statistică folosind testul ANOVA a relevat diferențe foarte semnificative în cadrul acestor grupuri de analiză ($p<0.0001$), în timp ce testul de comparație multiplă Tukey a demonstrat diferențe semnificative între zilele 2 și 6, respectiv 6 și 10, indiferent de tipul de excitație folosit (405 sau 488nm).

În cazul grupurilor de șobolani de control, variația în timp a fost similară, atingând nivele maxime în ziua a 6-a, cu scăderea intensității semnalului în ziua a 10-a, atât pentru stimulul de 405nm, cât și pentru cel de 488nm. Testul ANOVA a evidențiat diferențe foarte semnificative în cadrul acestor grupuri de analiză ($p<0.0001$), în timp ce testul de comparație multiplă Tukey a demonstrat diferențe semnificative între zilele 2 și 6, respectiv 2 și 10, indiferent de tipul de excitație folosit (405 sau 488nm).

Compararea intensităților de semnal între grupurile de control și cele cu ligatură au evidențiat tendințe similare în dinamică, pe parcursul intervalelor de timp evaluate. Diferențe semnificative între grupuri au fost identificate doar în ziua a 10-a, atât în cazul stimulării cu laser de 405nm ($p=0.0052$), cât și în cazul folosirii excitației cu lungime de undă de 488nm ($p=0.0021$). De menționat faptul că în ambele circumstanțe de stimulare, nivelele de ROS au fost mai crescute în ziua 10 pentru lotul de animale cu ligatură comparativ cu cel de control.

Nivelele de ROS determinate în dinamică și atribuite factorului ligatură par să indice faptul ca stresul oxidativ în contextul ligaturii ureterale unilaterale prezintă întâi o fază de platou inițială, în primele zile post intervenție, pentru ca mai apoi să prezinte valori crescute în a 10-a zi.

Studiul de față a pus bazele unei evaluări mai complexe și mai fidele a generării ROS la nivel tisular, prin folosirea tehnicilor de microscopie confocală *in vivo*. Modelul experimental implementat poate constitui un punct de plecare pentru alte studii care pot evalua modularea stresului oxidativ prin substanțe farmacologic active.

STUDIUL 6. DEZVOLTAREA UNUI DISPOZITIV PORTABIL PENTRU CRIOINCLUDERE ȘI A METODEI DE LUCRU CU ACESTA

Scopul prezentului studiu a fost de a dezvolta un dispozitiv portabil, ușor de manipulat, cu o construcție simplă, pentru a facilita înghețarea materialului tisular la distanță față de locul de procesare și transportul probei în condiții de siguranță către un centru de prelucrare.

Am realizat un prototip al dispozitivului imaginat și apoi prezentat în cererea de brevet de invenție RO130705(A3). Am folosit o bară de aluminiu de 20x5x3,7cm, în care am frezat 4 cavități tronconice de 2,5cm diametru la bază și 1cm adâncime. Învelișul termoizolant a fost compus din 2 straturi suprapuse, unul interior de poliuretan, de 4cm grosime, și unul exterior, din polistiren, de 2 cm grosime. Porțiunea inferioară a învelișului, sub formă de cuvă, acoperă 5 din cele 6 suprafețe ale blocului de aluminiu, excepție făcând fața cu cavitățile tronconice frezate. Distanța liberă dintre suprafața blocului de aluminiu liberă, neacoperită, și marginea superioară a cuvei termoizolante este de 3,5 cm. Acest spațiu liber desemnează în fapt camera de lucru în care vor fi înghețate probele de țesut. Deasupra ansamblului cuvă – bloc de aluminiu am plasat un capac termoizolant de 28x13x6cm. Acesta este format din 2 straturi de poliuretan, unul extern de 3,5cm grosime, și unul intern de 2,5cm. Stratul intern are dimensiunile corespunzătoare pentru a fi introdus în camera de lucru. În acest capac am făcut 4 orificii de 2cm diametru, cu dispoziție coaxială față de cavitățile tronconice din bara de aluminiu. În acest fel, după montarea capacului izolat, în interiorul camerei de lucru rămâne suficient loc pentru a găzdui 4 port-obiecte tipice, așezate deasupra cavităților tronconice. Întregul ansamblu bară de aluminiu – cuvă și capac termoizolant au fost apoi introduse într-o cutie de scule generică (Stanley 16 inch toolbox). Pe o laterală a cutiei, am creat un canal care a traversat învelișul izolator și parțial blocul de aluminiu, astfel încât prin ea să fie introdusă tija termometrului bimetalic (Durac), care poate măsura temperaturi în plaja de valori cuprinsă între -100°C și 40°C, cu acuratețe de 1%. Greutatea finală a dispozitivului este de 2,2 kg.

Monitorizând încălzirea dispozitivului răcit în congelatorul ULT și adus în mediul cu temperatură constantă de 23°C, am observat că acesta se încălzește cu o rată de 1°C la fiecare 5 minute, necesitând în total de 215 minute pentru a ajunge la temperatura finală de -30°C.

Efectuând testul pentru determinarea autonomiei variantei constructive descrise mai sus, am notat următoarele aspecte:

- temperatura de pornire a experimentului: -76°C;

- temperatura după 45 de minute, înainte de formarea blocurilor de OCT: -66°C;
- formarea celor 4 blocuri de OCT a încălzit dispozitivul de la -66 °C la -44°C;
- temperatură finală a dispozitivului, după alte 45 de minute, a fost de -38°C.

În microscopie confocală, am remarcat o mai bună păstrare, atât a morfologiei nucleare, cât și a modului de pozitivare a DHE la nivel citoplasmatic, în cazul fragmentelor de parenchim renal congelat folosind noul dispozitiv descris în acest studiu. Comparând cu imaginile obținute în studiul 5 din prezenta teză, imagini obținute prin examinare *in vivo* a marcajului cu DHE a parenchimului renal, putem obiectiva că prin folosirea noului dispozitiv, morfologia tisulară este mai bine conservată.

Am construit un dispozitiv portabil pentru crioincludere la distanță, ieftin și ușor de produs, care poate fi folosit de orice persoană cu un minim instructaj în utilizare. Acest dispozitiv își poate găsi utilitate atât în activitatea clinică curentă cât și în cea de cercetare, avantajul său major fiind reprezentat de posibilitatea de a construi blocuri de material tisular înghețat în locații care nu prezintă în dotare aparate pentru congelare.

Contribuții personale:

1. Dezvoltarea de protocoale dedicate pentru procesarea automată a imaginilor obținute prin intermediul microscopului confocal.
2. Demonstrarea, în premieră, a supraexpresie izoforme B a MAO în condițiile diabetului zaharat indus experimental, la șobolan.
3. Demonstrarea compartimentalizării producției ROS în rinichiul de șobolan cu diabet zaharat indus experimental.
4. Implementarea unui model experimental *in vivo* de monitorizare în dinamică a producției ROS cu evaluarea în microscopie confocală.
5. Conceperea și construirea unui dispozitiv portabil nou pentru crioincluderea materialului tisular.