

Katedra Patomorfologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Lek. stom. Agnieszka Maria Pernak

ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH
W DIAGNOSTYCE HISTOPATOLOGICZNEJ
WYBRANYCH NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor:

prof. dr hab. n. med. Przemysław Majewski



- Poznań 2011 -

*Mojemu Promotorowi
Panu prof. dr hab. n. med. Przemysławowi Majewskiemu
za opiekę naukową, cenne uwagi i dyskusje
oraz nieocenioną pomoc na każdym etapie
realizacji niniejszej pracy,
Składam serdeczne podziękowania.*

*Równie serdecznie pragnę podziękować
Pani dr n. med. Katarzynie Iwanik z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
oraz Panu dr Józefowi Węglewskiemu z Politechniki Poznańskiej
za ich wkład oraz okazaną życzliwość
podczas realizowania kolejnych etapów niniejszej pracy.*

*Dziękuję również Koleżankom i Kolegom
z Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
za wszechstronną pomoc oraz wszelkie gesty sympatii.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ	4
1 WSTĘP	6
2 WPROWADZENIE	9
2.1. PODZIAŁ NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI	9
2.2. UTRWALANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO	16
2.2.1. Metody utrwalania	19
2.2.1.1. Fizyczne metody utrwalania	20
2.2.1.1.1. Utrwalanie termiczne klasyczne i mikrofalowe	20
2.2.1.1.2. Liofilizacja i zamrażanie	21
2.2.1.2. Chemiczne metody utrwalania	22
2.2.2. Czynniki wpływające na utrwalanie	23
2.2.2.1. Czas utrwalania oraz wielkość preparatu	23
2.2.2.2. Temperatura fiksacji	24
2.2.2.3. Stężenie utrwalacza	24
2.3. CIECZE JONOWE	26
2.3.1. Historia	26
2.3.2. Nazewnictwo i budowa	27
2.3.3. Synteza	32
2.3.4. Właściwości	35
2.3.4.1. Temperatura topnienia	35
2.3.4.2. Gęstość	38
2.3.4.3. Lepkość	40
2.3.4.4. Stabilność termiczna	41

2.3.4.5.	Aktywność powierzchniowa	42
2.3.5.	Toksykologia	43
2.3.6.	Zastosowanie	49
3	CEL PRACY	54
4	MATERIAŁ I METODA	55
4.1.	CIECZE JONOWE	55
4.1.1.	Synteza eteru chlorometylowoalkilowego	55
4.1.2.	Synteza 1-butyloimidazolu	57
4.1.3.	Synteza chlorku 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowego	58
4.1.4.	Synteza tetrafluoroboranu 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowego	58
4.1.5.	Aktywność biologiczna	60
4.1.5.1.	Określenie wartości MIC	63
4.1.5.2.	Określenie wartości MBC	63
4.2.	NOWOTWORY GŁOWY I SZYI	65
4.2.1.	Materiał badawczy	65
4.2.2.	Metodologia pracy badawczej	67
5	OMÓWIENIE WYNIKÓW	70
5.1.	SYNTEZA CIECZY JONOWYCH	70
5.1.1.	Wybór cieczy jonowej	74
5.2.	AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA TETRAFLUOROBORANÓW 3-ALKOKSYMETYLO-1-BUTYLOIMIDAZOLIOWYCH	75
5.3.	WŁAŚCIWOŚCI BALSAMUJĄCE	78
5.4.	BADANIA PATOMORFOLOGICZNE NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI	81
5.4.1.	Typy histologiczne zmian	81

5.4.2.	Badania porównawcze materiału utrwalonego w cieczy jonowej i formalinie	83
5.4.2.1.	Opis wybranych przypadków nowotworów głowy i szyi	83
5.4.2.2.	Zestawienie różnic w reakcji na zastosowany utrwalacz	104
6	WNIOSKI	106
7	PIŚMIENNICTWO	108
8	WYKAZ TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII	123
	STRESZCZENIE	125
	ABSTRACT	127
	ANEKS 1	129
	ANEKS 2	130

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

AJCC (ang. *American Joint Committee on Cancer*)

BA – kation benzalkoniowy

BF₄ – tetrafluoroboran

c. – carcinoma

CK – cytokeratyna

DDA – kation didecyldimetyloamoniowy

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

EBV (ang. *Epstein-Barr Virus*) – ludzki herpeswirus

HPV (ang. *Human Papilloma Virus*) – wirus brodawczaka ludzkiego

H&E – hematoksylina i eozyna

IL (ang. *Ionic Liquid*) – ciecz jonowa

ISO – International Standardization Organization

LD₅₀ – medialna dawka śmiertelna

MBC (ang. *Minimal Bacterial Concentration*) – minimalne stężenie bakteriobójcze

MFC (ang. *Minimal Fungal Concentration*) – minimalne stężenie grzybobójcze

MHB (ang. *Mueller-Hinton Bouillon*) – podłoże Mueller'a-Hinton'a

MIC (ang. *Minimal Inhibitor Concentration*) – minimalne stężenie hamujące

NBF (ang. *Neutral Buffered Formalin*) – roztwór buforowanej formaliny

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy

RNA – kwas rybonukleinowy

rtg – zdjęcie radiologiczne

RTIL (ang. *Room Temperature Ionic Liquids*) – ciekłe ciecze jonowe w temperaturze pokojowej

TGA (ang. *Thermal Gravimetric Analysis*) – analiza termiczna

TNM (ang. *Tumor, Nodus, Metastasis*) – guz, węzeł, przerzut

T_t – temperatura topnienia

T_w – temperatura wrzenia

UICC (ang. *Union for International Cancer Control*) – międzynarodowa unia do walki z rakiem

USG – badanie ultrasonograficzne

WHO (ang. *World Health Organization*) – światowa organizacja zdrowia

1. WSTĘP

W patomorfologii, w celu utrwalenia materiału do diagnostyki histopatologicznej i cytologicznej, stosuje się agresywne, lotne i toksyczne związki chemiczne. W 1868 roku niemiecki chemik, Hoffman odkrył rozpuszczalny w wodzie gaz – formaldehyd (rys. 1), którego roztwór wodny zwany jest formaliną. Obecnie 10% wodny roztwór buforowanej formaliny jest najpopularniejszym utrwalaczem.



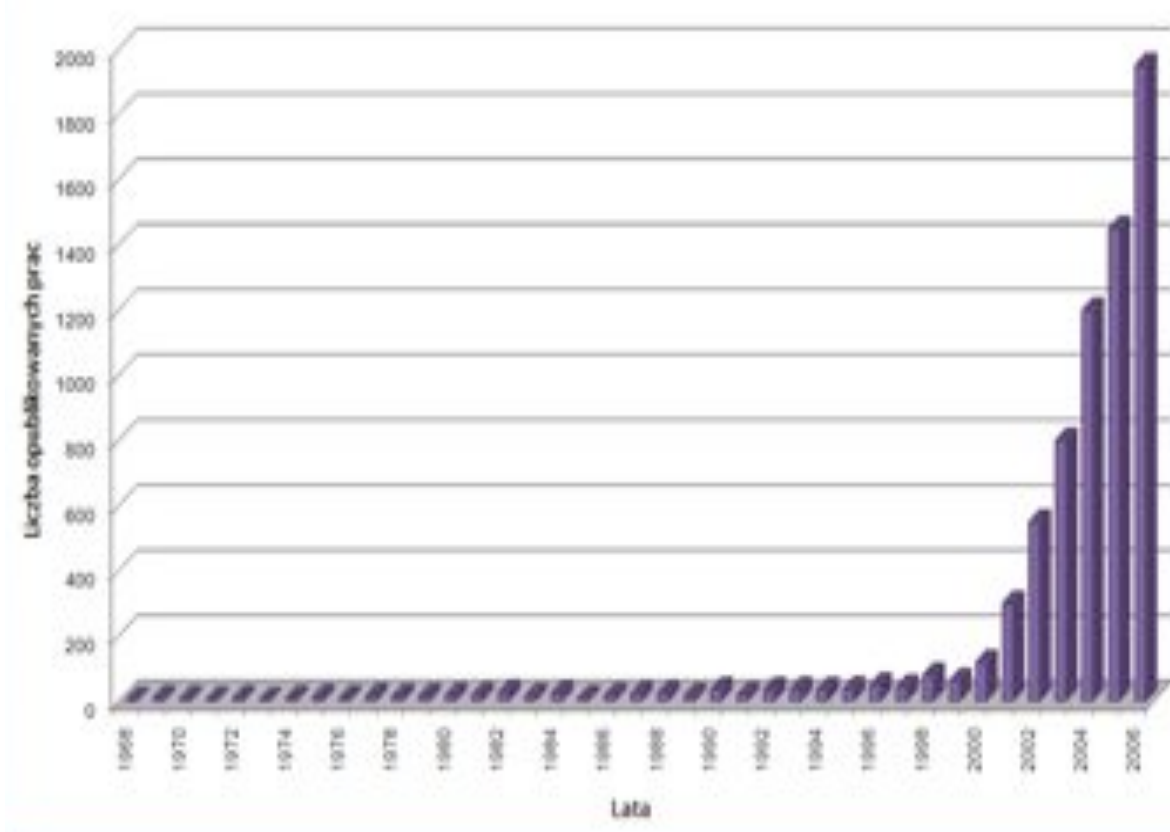
Rysunek 1. Trójwymiarowa, kulowa struktura formaldehydu z zaznaczonym rozkładem ładunku elektrycznego.

Coraz większa świadomość konieczności ochrony zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska stała się motorem w poszukiwaniu bezpiecznych i mniej toksycznych substancji. W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania „zieloną chemią” (ang. *green chemistry*), w której istotną rolę odgrywają ciecze jonowe (ang. *Ionic Liquids* – ILs). Są to związki organiczne, zbudowane z kationu i anionu.



Sole te mają temperaturę topnienia niższą niż temperatura wrzenia wody, a w temperaturze pokojowej najczęściej są ciekłe dzięki niskiej energii sieciowej. Posiadają budowę jonową, dlatego nie parują; są niepalne i uznawane za „zielone rozpuszczalniki”.

Wiele ośrodków naukowych i przemysłowych na całym świecie prowadzi intensywne badania nad zastosowaniem tych niezwykłych i wszechstronnych związków, o czym świadczy stale wzrastająca liczba publikowanych prac na ich temat [1, 2], co zestawiono na schemacie 1. W 2006 roku ukazało się prawie 2 tysiące prac, a liczba ta w kolejnych latach nadal wzrasta.



Schemat 1. Wykres przedstawia liczbę opublikowanych prac na temat cieczy jonowych w latach od 1968 do roku 2006.

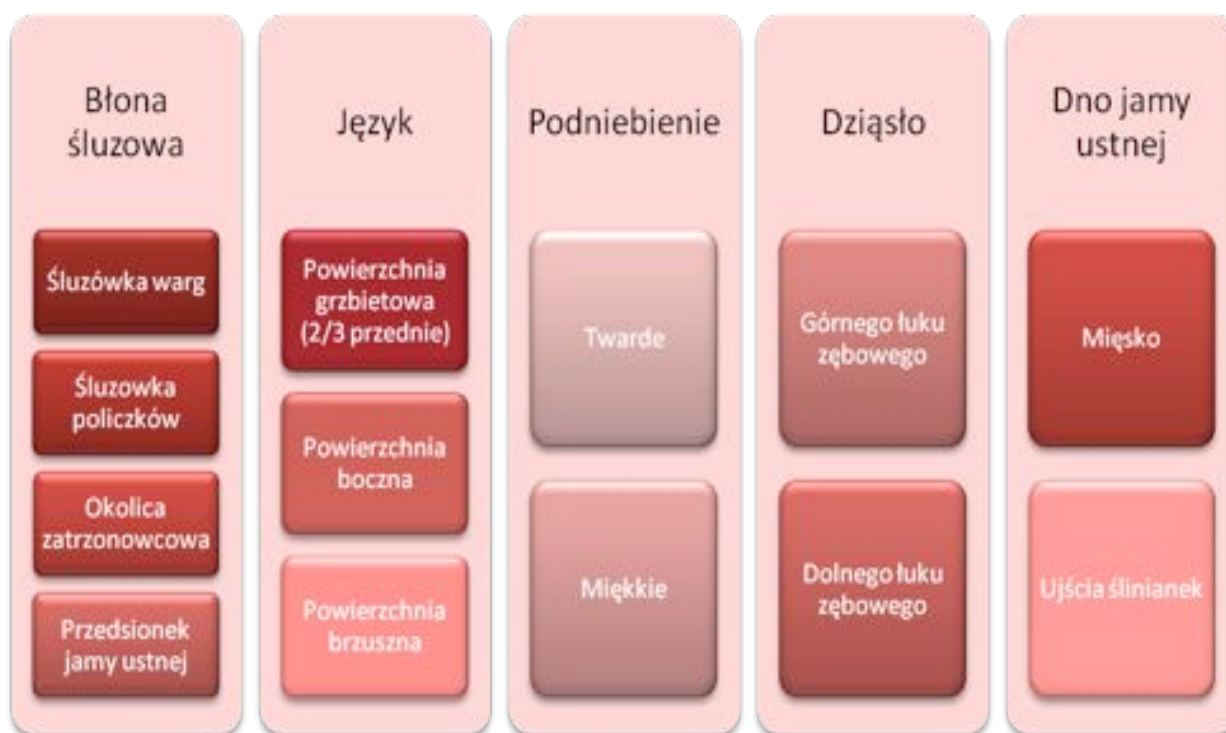
Ciecze jonowe są przede wszystkim stosowane, jako alternatywne rozpuszczalniki w syntezie organicznej, reakcjach katalitycznych czy biokatalitycznych. Są wykorzystywane również w chromatografii cieczowej i gazowej, w elektrochemii czy w technikach elektromigracyjnych. W medycynie po raz pierwszy zostały zastosowane przez zespół prof. Majewskiego jako alternatywny utrwalacz – zamiennik 10% roztworu buforowanej formaliny.

To, co czyni te związki tak wszechstronnymi, to możliwość „zaprojektowania” ich właściwości przez odpowiedni dobór kationu i anionu. Szacuje się, że ilość kombinacji kation-anion jest olbrzymia i może ona osiągać nawet wartość 10^{18} .

2. WPROWADZENIE

2.1. PODZIAŁ NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI

Guzem nazywa się każde obrzmienie tkanki, narządu lub jego części, o różnej etiologii. Terminem tym określa się więc wszelkiego rodzaju guzowate zmiany o charakterze wrodzonym, zapalnym, pourazowym i nowotworowym. Stwierdzenie obecności zgrubienia czy guza w obrębie tkanek głowy i szyi jest zawsze objawem niepokojącym i wymaga przeprowadzenia szczegółowej diagnostyki różnicowej oraz leczenia adekwatnego do rozpoznania.



Schemat 2. Podział topograficzny okolic występowania raków jamy ustnej.

Światowa Organizacja Zdrowia WHO (ang. *World Health Organization*) podzieliła guzy głowy i szyi ze względu na ich lokalizację i cechy histologiczne (schemat 2). Po ustaleniu lokalizacji guza wykonuje się badanie palpacyjne oraz

wziernikowanie lub przeprowadza się badanie endoskopowe. Następnie ocenia się wielkość guza, a jego rozległość naciekania tkanek sąsiednich diagnozuje się przy pomocy tomografii komputerowej oraz rezonansu magnetycznego i badania ultrasonograficznego (USG) w przypadku węzłów chłonnych. Wykorzystanie efektu Dopplera w badaniu USG pozwala ocenić drożności naczyń krwionośnych przebiegających w obrębie lub sąsiedztwie guza. Te informacje pozwalają ustalić prawdopodobny rodzaj guza i wykonać zabieg chirurgiczny z zachowaniem odpowiedniego marginesu zdrowych tkanek.

Pobrany od pacjenta materiał z odpowiednio przygotowanym załącznikiem trafia do zakładu patomorfologii w celu ustalenia rozpoznania typu histologicznego, stopnia zróżnicowania (stopnia złośliwości histologicznej) i stopnia zaawansowania nowotworu. W celu ustalenia diagnozy histopatologicznej często, oprócz rutynowego badania histologicznego, konieczne jest wykonanie badań histochemicznych i immunohistochemicznych.

Analiza mikroskopowa materiału tkankowego pozwala na określenie stopnia zróżnicowania (złośliwości histologicznej) nowotworu. Stosowane podziały uwzględniają najczęściej trzy lub cztery stopnie złośliwości, oznaczone cyframi rzymskimi I, II, III lub GI, GII, GIII. Wyższy stopień złośliwości w praktyce klinicznej oznacza gorsze rokowanie, ale lepszą promienioczułość nowotworu. Określenie stopnia złośliwości nowotworu ma znaczenie dla prognozowania przebiegu pooperacyjnego oraz wyboru metody leczenia. Histologiczna ocena złośliwości raka płaskonabłonkowego opiera się na trzech kryteriach:

- 1) stopniu zróżnicowania,

- 2) wskaźniku wzrostu,
- 3) wielopostaciowości komórek i jąder komórkowych.

Miarą stopnia zróżnicowania raka jest jego podobieństwo do wielowarstwowego nabłonka płaskiego. Zgodnie z tym założeniem, np. wysoko zróżnicowany rak płaskonabłonkowy GI to nowotwór, którego komórki tworzą keratynę i posiadają mostki cytoplazmatyczne - *carcinoma planoepitheliale keratodes*).

Wskaźnik wzrostu opiera się na ocenie liczby figur podziału komórkowego w polu widzenia mikroskopu świetlnego. Ta cecha najsilniej jest wyrażona w obwodowej strefie nowotworu, a więc w obszarze intensywnego naciekania otoczenia. Najbardziej miarodajną ocenę wskaźnika wzrostu uzyskujemy stosując tzw. niezależne markery proliferacyjne, z użyciem znakowanej tymidyny lub jej analogu. Dodatnią wartość wskaźnika wzrostu obserwujemy w reakcjach immunohistochemicznych wykazujących białka będące kofaktorami polimeraz DNA. Zawartość tych białek narasta zwłaszcza w fazie S cyklu komórkowego.
















Wielopostaciowość komórek nowotworowych cechuje najwydatniej nowotwory o wysokim stopniu złośliwości (np. *carcinoma planoepitheliale akeratodes*, GIII) i polega na różnorodności rozmiarów i kształtu jądra komórkowego oraz jego nadbarwliwości. Cytoplazma tych komórek jest o różnej obfitości, uboga w organella komórkowe. Zatracone są zupełnie więzi międzykomórkowe [3].

Histologiczna ocena stopnia złośliwości opiera się na badaniu wycinków pobranych z różnych obszarów guza. W przypadku niejednorodności utkania pod względem stopnia złośliwości bierzemy pod uwagę cechy najbardziej ujemne. Bowiem te obszary zadecydują o dalszym przebiegu badanego nowotworu.

W celu określenia stopnia zaawansowania nowotworu stosuje się podział TNM (ang. *Tumor, Nodus, Metastasis*), gdzie T oznacza guz nowotworowy, N stan węzłów chłonnych a M obecność przerzutów odległych. Każdej z trzech liter towarzyszy liczba lub litery wskazujące odpowiednio na wielkość guza, jego miejsce i zasięg. Odpowiednie sklasyfikowanie cech nowotworu i ich wzajemne zestawienie pozwalają na ustalenie stopnia jego zaawansowania. Przykładowe zastosowanie podziału TNM do określenia stadium zaawansowania procesów nowotworowych przedstawiono na schemacie 3.

W obrębie klasyfikacji TNM można wyróżnić pięć różnych rodzajów, które zestawiono w tabeli 1.

Mnogość tkanek występujących w okolicy głowy i szyi wpływa na różnorodność nowotworów rozwijających się w tej okolicy. Najczęstszym nowotworem złośliwym jest rak, guz pochodzenia nabłonkowego, stanowiący 90% wszystkich nowotworów złośliwych tego regionu. Raki płaskonabłonkowe głowy i szyi stanowią około 6% wszystkich nowotworów złośliwych i występują zwykle w 6–7 dekadzie życia. Raki są nowotworami o udowodnionym podłożu egzogennym. Czynnikiemami zewnętrznymi są przede wszystkim kancerogeny (papierosy, rzadziej narkotyki), kokancerogeny (alkohol) oraz wirusy onkogenne (HPV i EBV).

					
brak objawów lub niebadalny guz pierwotny	do 2cm	od 2-4cm	od 4cm	przerzuty do kości, chrząstki, mięśni... zmiana usuwalna	przerzuty do kości, chrząstki, mięśni... zmiana nieusuwalna
					
brak przerzutów lub niebadalne węzły	do 3cm w pojedynczym węźle po stronie zmiany	od 3-4cm w pojedynczym węźle po stronie zmiany	do 6 cm w mnogich węzłach przerzutowych po stronie zmiany	do 6 cm w mnogich węzłach przerzutowych obustronnych lub kontralateralnych	od 6cm
					
brak przerzutów odległych	obecne przerzuty odległe		niebadalne przerzuty odległe		
M0	M1		MX		

Schemat 3. Klasyfikacja TNM wargi i jamy ustnej wg AJCC z 2002 roku.

<i>Rodzaj klasyfikacji</i>	<i>Pochodzenie danych</i>	<i>Wykorzystanie danych</i>
TNM (kliniczna)	Dane diagnostyczne, w tym objawy, badanie fizykalne, obrazowanie, endoskopia, biopsja; resekcja jednego węzła z klinicznym T; badanie chirurgiczne bez resekcji oraz inne stosowne badania	Prognoza wstępna i leczenie początkowe Porównania populacyjne
pTNM (patologiczna)	Dane diagnostyczne i chirurgiczne usuniętego guza oraz dane po ocenie patologicznej	Najbardziej dokładna ocena prognozy Określenie sposobu leczenia
yc/ypTNM (postterapeutyczna)	Dane kliniczne i patologiczne po radioterapii lub leczeniu układowym przed operacją „yc” - kliniczna, „yp” – patologiczna	Określenie dalszego sposobu leczenia Ustalenie stopnia odpowiedzi na leczenie
rTNM (po wznowie)	Dane kliniczne i patologiczne w momencie ponownego leczenia nawrotu lub progresji	Określenie sposobu leczenia
aTNM (autopsyjna)	Dane kliniczne i patologiczne uzyskane w trakcie badania pośmiertnego	Identyfikacja i ocena stopnia procesu nowotworowego wykrytego w trakcie badania pośmiertnego

Tabela 1. Zestawienie rodzajów klasyfikacji TNM opublikowanej przez AJCC w 2009 r.

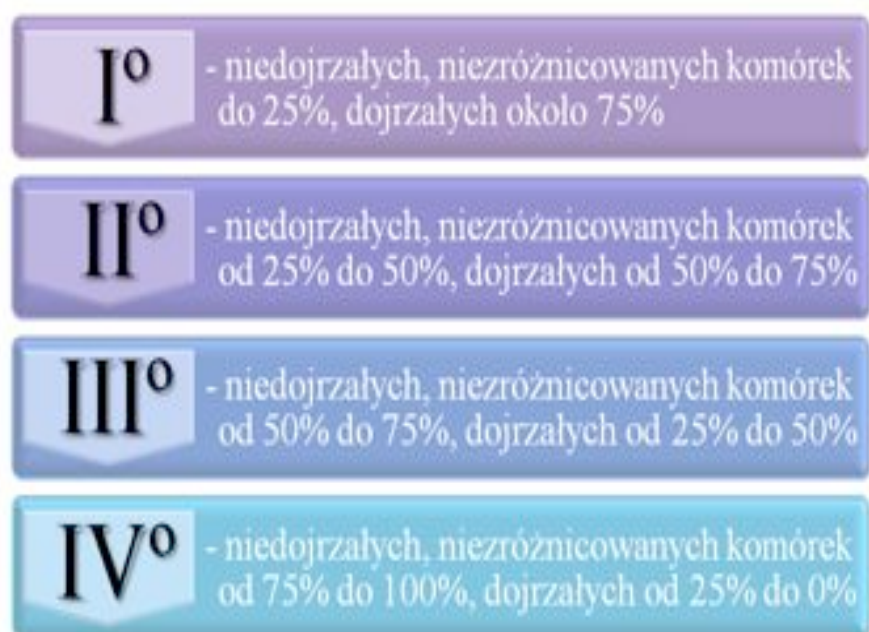
Drugą grupę stanowią słabiej poznane czynniki endo i egzogenne, do których zaliczyć należy uwarunkowania genetyczne, upośledzenie funkcji układu odpornościowego, czynniki hormonalne, środowisko pracy i życia oraz inne.

Cechy guzów złośliwych:

- 1) wzrost - naciekający i niszczący tkanki, brak otorbienia,
- 2) szybkość wzrostu - szybki wzrost z wieloma figurami podziałów,
- 3) przebieg wzrostu - stale postępujący,
- 4) zmiany wsteczne - często rozpad i owrzodzenie powierzchni guza,

- 5) nawroty - częste,
- 6) przerzuty - występują.

Opierając się na porównaniu obrazu mikroskopowego z przebiegiem klinicznym, w 1920 roku Broders zaproponował 4-stopniowy podział złośliwości raków płaskonabłonkowych na podstawie procentowego stosunku pomiędzy komórkami dojrzałymi i niedojrzalymi, co przedstawia schemat 4.



Schemat 4. Stopnie histologiczne złośliwości raków.

Na podstawie klasyfikacji stworzonej przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (UICC) nowotwory zostały zaszeregowane według ich przynależności tkankowej. Stworzono trzy grupy:

I. Grupa guzów złośliwych wywodzących się z tkanki nabłonkowej:

- 1) rak płaskonabłonkowy (*carcinoma planoepitheliale*) o różnym stopniu zróżnicowania,

- 2) rak rogowaciejący, zaliczany do grupy I wg WHO,
- 3) rak brodawczakowaty (*carcinoma verrucosum*),
- 4) rak niezróżnicowany (dawniej *transitional cell carcinoma*), obecnie okreśłany jako grupa III wg WHO.

II. Grupa nabłonkowych guzów wywodzących się z tkanek zębów i zębopochodnych: szkliwiak złośliwy (*ameloblastoma malignum*), pierwotny rak śródkostny zębopochodny (*carcinoma intraosseum primum odontogenes*) oraz rak wywodzący się z nabłonka torbieli zębopochodnej.

III. Grupa guzów wywodzących się z tkanki gruczołowej małych i dużych gruczołów ślinowych:

- 1) rak gruczołowato-torbielowaty (*carcinoma adenoides cysticum, cylindroma*),
- 2) rak śluzowo-naskórkowy (*carcinoma mucoepidermalis*),
- 3) gruczolakorak śliniankopochodny (*adenocarcinoma sialogenes*).

2.2. UTRWALANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Utrwalenie materiału biologicznego, w celu zrozumienia jego funkcji i struktury, w ciągu ostatniego stulecia doprowadziło do stworzenia wielu utrwalaczy. Mechanizmy i zasady, na podstawie których działają poszczególne utrwalacze tak, aby zachować strukturę tkanek i zmniejszyć utratę ich substancji, dzielą się na ogólne kategorie. Należą do nich: tworzenie grup kowalencyjnych, wiązania krzyżowe, odwodnienie, wytrawianie kwasami, wysalanie oraz utrwalanie termiczne.

Złożone utrwalacze działają dzięki wykorzystaniu kilku z powyższych mechanizmów.

Każdy utrwalacz ma zalety i wady. Do najczęstszych wad zaliczamy utratę cząsteczek utrwalanej tkanki, jej obkurczenie lub spęcznienie. Innymi spotykanymi problemami są zmiany, jakości w barwieniach histochemicznych i immunohistochemicznych, utrudnione przeprowadzenie dokładnej analizy biochemicznej oraz różnice w strukturach organelli komórkowych.

Jednym z głównych problemów związanych z utrwalaniem materiału w formaldehydzie i zatapianiem go w bloczkach parafinowych była utrata antygenów immunorozpoznawalnych [4, 5]. Podobnie przeprowadzenie analizy mRNA i DNA z materiału utrwalanego w formalinie i zatopionego w parafinie było skomplikowane [6-8].

Wszystkie powszechnie używane utrwalacze są stosowane na drodze kompromisu. Chodzi bowiem oto, aby pozytywne cechy utrwalonego materiału równoważyły te mniej pożądane.

Główny cel utrwalania tkanek w patologii to utrzymanie wyraźnych i zgodnych morfologicznych cech [4, 6]. Rozwojowi większości utrwalaczy towarzyszył przypadek, a zrozumienie sposobu ich działania było oparte na informacjach uzyskanych z produkcji szczepionek czy barwienia skór. Aby można było oglądać komórki w mikroskopie, barwione odcinki tkanki muszą zachować prawidłowe struktury takie jak cytoplazma czy jądra komórkowe. Poza tym istotne jest również zachowanie prawidłowej struktury zewnątrzkomórkowej wraz ze składem chemicznym badanej tkanki. Wiele składników tkanek jest rozpuszczalnych w jej

wodnym środowisku i dlatego istotne jest maksymalne zmniejszenie możliwości utraty składników komórkowych w trakcie utrwalania.

Do chwili obecnej uniwersalny czy idealny utrwalacz nie został jeszcze opracowany. Utrwalacze są wybrane tak, aby można było ocenić konkretne struktury komórkowe odpowiedniej tkanki. W diagnostyce patomorfologicznej utrwalaczem z wyboru dla większości patologów jest 10% roztwór buforowanej formaliny [9].

Najważniejszą cechą utrwalacza jest uzyskanie wysokiej, jakości obrazu mikroskopowego barwionego hematoxyliną i eozyną (H&E) zarówno początkowo, jak i w trakcie przechowywania materiału w bloczku parafinowym przez co najmniej 10 lat jak to wymagają obowiązujące w Polsce przepisy. Utrwalacz musi posiadać umiejętność zabezpieczenia, krótko jak i długoterminowego materiału przed utratą rozpuszczalnych w wodzie substancji komórkowych oraz zahamować zdolności kataboliczne enzymów. Inną równie ważną cechą dobrego utrwalacza jest zniszczenie czynników zakaźnych, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie integralności tkanek i komórek. Ponadto środki utrwalające powinny umożliwić odzyskanie makrocząsteczek w tym białek, RNA i DNA bez zmian biochemicznych w materiale zatopionym w parafinie.

Kolejną ważną cechą idealnego utrwalacza jest przydatność w utrwalaniu różnych tkanek, w tym tkanki tłuszczowej, limfatycznej czy tkanki nerwowej. Powinien zachowywać małe i duże fragmenty tkanek oraz umożliwiać wykonanie badań histochemicznych, immunohistochemicznych, hybrydyzacji *in situ* oraz innych procedur specjalistycznych. Powinien penetrować i utrwalać tkanki maksymalnie jak najszybciej oraz zachowywać kompatybilność z automatycznymi procesorami tkankowymi. Jego przydatność nie powinna być krótsza niż rok i

powinien być cenowo dostępny. Obecnie dodatkowo zwraca się uwagę na toksyczność wobec człowieka i środowiska naturalnego, jak i łatwą degradowalność utrwalacza [10].

2.2.1. Metody utrwalania

Utrwalanie tkanek można osiągnąć poprzez stosowanie metod fizycznych i/lub chemicznych. Metody fizyczne, takie jak podgrzewanie klasyczne czy mikrofalowe oraz liofilizacja, są niezależnymi procesami i nie są wykorzystywane powszechnie w badaniach patomorfologicznych. Większość metod fiksacji używanych w utrwalaniu tkanek do celów histopatologicznych polega na utrwalaniu chemicznym przeprowadzanym przez ciecz utrwalającą. Najważniejszym wymogiem stawianym przed utrwalaczami do diagnostyki patomorfologicznej jest powtarzalność obrazów mikroskopowych barwionych H&E i oddalonych od siebie w czasie. Metody utrwalania używane w protokołach badawczych mogą być różnorodne, zaczynając od utrwalania przy użyciu oparów czy utrwalania całych zwierząt poprzez perfuzję układu naczyniowego zwierzęcia związkami utrwalającymi [4, 5].

Wiele substancji chemicznych lub ich kombinacji może działać równie dobrze, jako dobry utrwalacz i będzie realizować stawiane przed nimi złożone wymagania. Niektóre utrwalacze mają dodane reaktywne grupy kowalencyjne, które mogą wywoływać reakcje krzyżowe pomiędzy białkami, pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami białek w kwasach nukleinowych oraz pomiędzy kwasami nukleinowymi a białkami [4, 5, 11-13]. Najlepszym przykładem takich utrwalaczy

(*cross-linking fixatives*) są formaldehyd oraz aldehyd glutarowy. Innym podejściem do utrwalania może być wyodrębnienie utrwalaczy, które usuwają wolną wodę z tkanki przyspieszając utrwalanie i powodując koagulację białek. Do substancji odwadniających tkanki zaliczamy etanol, metanol i aceton. Natomiast utrwalacze, takie jak kwas octowy, kwas trichlorooctowy, chlorek rtęci oraz octan cynku, działają na drodze denaturacji białek i kwasów nukleinowych poprzez zmianę pH lub poprzez tworzenie soli. W tym miejscu należy również wymienić utrwalacze złożone, które są mieszaninami odczynników. I tak na przykład działanie alkoholowego roztworu formaldehydu utrwała tkankę za sprawą dodania kowalencyjnych grup hydroksymetylowych, reakcją krzyżową oraz przez koagulację i odwodnienie.

2.2.1.1. Fizyczne metody utrwalania

2.2.1.1.1. Utrwalanie termiczne klasyczne i mikrofalowe

Najprostszym utrwalaczem tkanek jest wysoka temperatura. Gotowanie lub precypitacja jajka powoduje ścięcie się białka i żółtka, dzięki czemu można łatwo badać te elementy oddzielnie. Każdy składnik jajka, po jego termicznym utrwaleniu, jest mniej rozpuszczalny w wodzie aniżeli taki sam składnik świeżego materiału. Po umieszczeniu, na podgrzanym szkiełku podstawowym, skrawka mrożeniowego dochodzi do jego umocowania i częściowego utrwalenia poprzez ciepło oraz odwodnienie. Ciepło jest wykorzystywane przede wszystkim do przyspieszenia utrwalania, pomimo uzyskania, w badaniu histopatologicznym, odpowiedniej morfologii tkanki przez jej gotowanie w soli fizjologicznej.

Ogrzewanie mikrofalami przyspiesza utrwalanie i redukuje czas potrzebny do utrwalenia dużych preparatów i skrawków histologicznych, z 12 godzin do mniej, niż 20 minut [14-16]. Podgrzewanie tkanki utrwalanej w formalinie powoduje uwolnienie się dużej ilości niebezpiecznych oparów, które w przypadku nieprawidłowego zabezpieczenia mogą stanowić poważne zagrożenie bezpieczeństwa. Ostatnio, firma Glyoxal wprowadziła utrwalacze, które nie produkują niebezpiecznych oparów przy podgrzewaniu mikrofalowym utrwalonego w nich materiału, w temperaturze 55°C.

2.2.1.1.2. Liofilizacja i zamrażanie

Liofilizacja jest przydatną metodą w ocenie rozpuszczalnych cząstek i molekuł tkankowych. Badany materiał jest skrawany na cienkie skrawki, które następnie zanurzane są w ciekłym azocie, a woda jest usuwana w komorze próżniowej, przy temperaturze -40°C. Tkanki następnie mogą być utrwalone przy użyciu oparów.

Zamrażanie polega na umieszczaniu tkanki w schłodzonych (do -40°C) utrwalaczach, takich jak aceton czy alkohol o niskiej masie molowej. Te schłodzone utrwalacze powoli usuwają wodę przez rozpuszczenie kryształów lodu, przy czym białka nie ulegają denaturacji. Następnie stopniowe podwyższenie temperatury do 4°C kończy proces utrwalania [17].

2.2.1.2. Chemiczne metody utrwalania

Utrwalenie chemiczne wykorzystuje organiczne i nieorganiczne związki w celu otrzymania odpowiedniego efektu konserwującego morfologię tkanki. Utrwalacze chemiczne można podzielić na trzy grupy: koagulanty, *cross-linking* oraz utrwalacze złożone.

Organiczne i nieorganiczne roztwory mogą koagulować białka, czyniąc je nierozpuszczalnymi. Struktura komórkowa jest utrzymywana głównie przez lipoproteiny i przez włókna kolagenowe. W mikroskopii świetlnej obraz strukturalny komórki jest wystarczający dla celów histologicznych, jednakże w przypadku analizy ultrastrukturalnej będzie niewystarczający, ponieważ dochodzi do niedostatecznego zachowania struktury mitochondriów czy ziarnistości wydzielniczych.

Najczęściej stosowanymi utrwalaczami koagulującymi są alkohole (np. etanol, metanol) oraz aceton. Istotna jest różnica pomiędzy metanolem a etanolem. Etanol przy stężeniu 50-60% rozpoczyna koagulację, a metanol dopiero przy stężeniu powyżej 80% [18].

Do utrwalaczy koagulujących zaliczamy również kwasy, takie jak: kwas pikrynowy, octowy czy trichlorooctowy.

Utrwalacze złożone to mieszaniny różnych związków posiadające różne właściwości fizykochemiczne np. formalina zawierająca jony metali. Najczęściej stosowane jony metali to: Hg^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} i Zn^{2+} lub kompleksy $[\text{UO}_2]^{2+}$ i $[\text{PtCl}_6]^{2-}$. Rtęć, lit i cynk są obecnie najczęściej używanymi metalami. Formaldehyd zawierający jony cynku jest uważany za lepszy utrwalacz dla celów

immunohistochemicznych niż czysty formaldehyd [4, 19]. Utrwalacze złożone na bazie formaliny, charakteryzują się powtarzalnością i dobrą, jakością obrazu histomorfometrycznego.

Osmolarność bufora i utrwalacza jest ważna, ponieważ hipertoniczność i hipotoniczność wpływa na skurcz lub obrzęk utrwalanego materiału. Najlepsze rezultaty uzyskuje się przy użyciu roztworów nieznacznie hipertonicznych (400 - 450 mOsm), jednakże osmolarność dla 10% NBF wynosi około 1500 mOsm. Podobnie, zachowują się niektóre jony (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), które mogą wpływać na kształt i strukturę komórek niezależnie od efektu osmotycznego. Jonowy skład utrwalaczy powinien być możliwie jak najbardziej izotoniczny.

Kwasy octowe i inne kwasy działają głównie przez obniżenie pH i zakłócanie trzeciorzędowej struktury białek. Bufory są używane, aby utrzymać pH przy optimum. Wybór konkretnego buforu zależy od typowego przykładu utrwalacza i analitu. Powszechnie używane bufory to fosforan, kakodylat, diwęglan, Tris i octan.

2.2.2. Czynniki wpływające na utrwalanie

2.2.2.1. Czas utrwalania oraz wielkość preparatów

Czynniki, które rządzą dyfuzją utrwalacza do tkanki zostały zbadane przez Medawara i opisane w 1941 roku [20]. Stwierdził on, że głębokość penetracji utrwalacza – d jest wprost proporcjonalny do pierwiastka kwadratowego czasu fiksacji – t i związek ten można wyrazić wzorem:

$$d = k \sqrt{t}$$

Stała – k to współczynnik dyfuzji, który jest charakterystyczny dla każdego utrwalacza. Współczynnik ten wynosi 0,79 dla roztworu 10% buforowanej formaliny, a 1,0 dla 100% etanol i 1,33 dla 3% dichromianu(VI) potasu [21]. Czas utrwalania jest równa kwadratowi odległości, na jaką utrwalacz ma spenetrować. Większość utrwalaczy, takich jak NBF, wolno penetruje tkankę na głębokość około 1 mm.

2.2.2.2. Temperatura fiksacji

Dyfuzja cząsteczek wraz ze wzrostem ich temperatury z powodu szybszego ruchu i wibrowania, powoduje szybsze penetrowanie na przykład formaldehydu w głąb tkanki. Mikrofałe zostały użyte, by przyśpieszyć fiksację formaldehydu przez zarówno podnoszenie temperatury jak i molekularne ruchy. W trakcie podgrzewania mikrofalowego uwalniające się opary są poważnym problemem związanym z bezpieczeństwem na stanowisku pracy [9, 22]. Podwyższenie temperatury zwiększa szybkość reakcji chemicznej, dlatego formaldehyd reaguje szybciej [23].

2.2.2.3. Stężenie utrwalacza

Skuteczność utrwalania zależy od jego stężenia. Stężenia formaliny wyższe niż 10% powodują zwiększone obkurczenie utrwalanej tkanki [24]. Natomiast stężenie etanolu poniżej 70% nie usuwa skutecznie wolnej wody z tkanek.

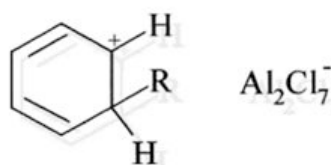
Dodanie do utrwalaczy elektrolitów bądź związków niebędących elektrolitami poprawia morfologię utrwalonej tkanki. Stosowanymi dodatkami są:

chlerek wapnia, rodanek potasu, siarczan(VI) amonu i diwodorofosforan(V) potasu. Elektrolity mogą reagować bezpośrednio z białkami (powodując ich denaturację) lub indywidualnie z utrwalaczem i elementami komórkowymi [25]. Do utrwalenia tkanki można wybrać różne elektrolity w zależności odżądanego efektu. Dodatkowo stwierdzono, iż dodanie związków chemicznych (takich jak sacharoza i dekstryna) czy związków powierzchniowo czynnych również poprawia właściwości utrwalające [25].

2.3. CIECZE JONOWE

2.3.1. Historia

Intensywne badania nad cieczami jonowymi trwają zaledwie od kilku lat. Historia tych związków sięga XIX wieku, kiedy to po raz pierwszy otrzymano „czerwony olej” w reakcji Friedel’a-Crafts’a. Struktura tego oleju została zidentyfikowana dopiero niedawno, ponieważ wcześniej nie posiadano odpowiednich metod analitycznych.



Było to możliwe dopiero wtedy, kiedy spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) stała się ogólnie dostępna [26].

W 1911 roku Ray i Rakshit [27] otrzymali azotany(III) etyloamoniowy, dimetyloamoniowy oraz trimetyloamoniowy. Sole te, jako pierwsze ciecz jonowe, były jednak nietrwałe i spontanicznie się rozkładały. Użyteczną ciecz jonową – azotan(V) etyloamoniowy otrzymał natomiast, w 1914 roku, P. Walden, przeprowadzając reakcję etyloaminy ze stężonym kwasem azotowym(V) [28]. Jest to pierwsza opisana stabilna protonowa ciecz jonowa.

Major dr Lowell A. King z Air Force Academy w Colorado Springs w 1963 roku zainicjował projekt badawczy mający na celu znalezienie nowych elektrolitów zastępujących stopione sole w bateriach cieplnych. Okazały się nimi chlorogliniany

w formie eutektycznej mieszaniny $\text{AlCl}_4/\text{Al}_2\text{Cl}_7$. Efektem tych badań są patenty z 1948 roku [29]. Hurley i Wier otrzymali ciecze jonowe w reakcji trichlorku glinu z bromkiem 1-etylopirydyniowym. Podstawową wadą syntezowanych pirydyniowych cieczy jonowych jest ich wrażliwość na kontakt z wodą, w efekcie czego zachodzi hydroliza z wydzieleniem gazowego chlorowodoru. W 1990 roku M. Zaworotko [26], podczas stażu naukowego w Air Force Academy, otrzymał nową generację cieczy jonowych. Jego odkryciem były – ciekłe w temperaturze pokojowej, stabilne w kontakcie z powietrzem i wodą – sole 1,3-dialkylimidazoliowe z anionami BF_4^- , PF_6^- , NO_3^- i SO_4^{2-} [26]. Ostatnie ważne wydarzenie w historii cieczy jonowych miało miejsce w 1996 roku – ukazuje się wówczas publikacja K. Seddon'a pod tytułem: *Room temperature ionic liquids - neoteric solvents for clean catalysis* [30]. Jednakże dopiero w 2 lata później na konferencji w Zürichu pt.: *Molten salt chemistry and technology* prof. Seddon zwraca uwagę badaczy na tę grupę związków [31]. Omawiana grupa związków chemicznych zostaje nazwana w literaturze anglojęzycznej jako *ionic liquids*, usystematyzowując dotychczasowe pojęcia: *molten salts*, *liquid organic salts*, *fused salts*, *room-temperature ionic liquids*, *nonaqueous ionic liquids*. W ślad za literaturą anglojęzyczną ustalono polskie słowo kluczowe – ciecze jonowe.

2.3.2. Nazewnictwo i budowa

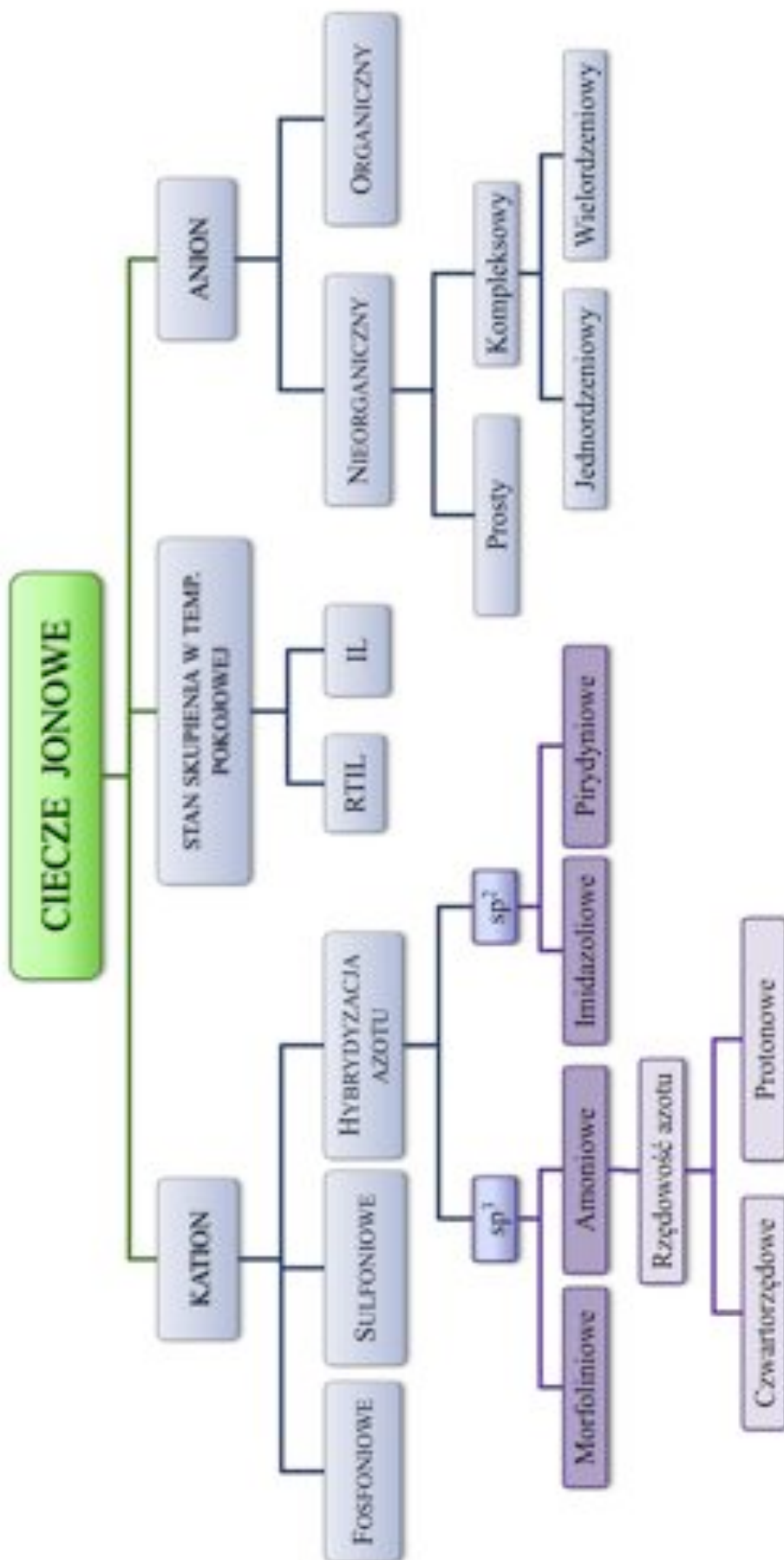
Ciecze jonowe to związki chemiczne składające się z kationu i anionu. Posiadają budowę jonową, a ich temperatura topnienia jest niższa niż temperatura wrzenia wody.

Ciecze jonowe wykazują skłonność do tworzenia struktur metastabilnych (przechłodzonych cieczy i stanów szklistych). Ich temperatury topnienia są różne, najczęściej oscylują pomiędzy -20°C a 100°C . Przyjęto, że ciecze jonowe, które w temperaturze pokojowej pozostają ciekłe, są określane skrótem RTIL (ang. *Room Temperature Ionic Liquids*). Natomiast związki, które w temperaturze 25°C są ciałami stałymi, a ich temperatura topnienia jest niższa niż 100°C , określamy skrótem IL (ang. *Ionic Liquid*).

Nazwa ciecze jonowe po raz pierwszy pojawiła się w latach 70-tych ubiegłego wieku [32], a w literaturze powszechnie zaczęto ją stosować dopiero w połowie lat 90-tych. Wcześniej bowiem używano określenia - stopione sole (ang. *molten salts*) [33, 34]. W literaturze angielskiej synonimami *ionic liquids* są np.: *ambient temperature ionic liquids* czy *low temperature molten salts*.

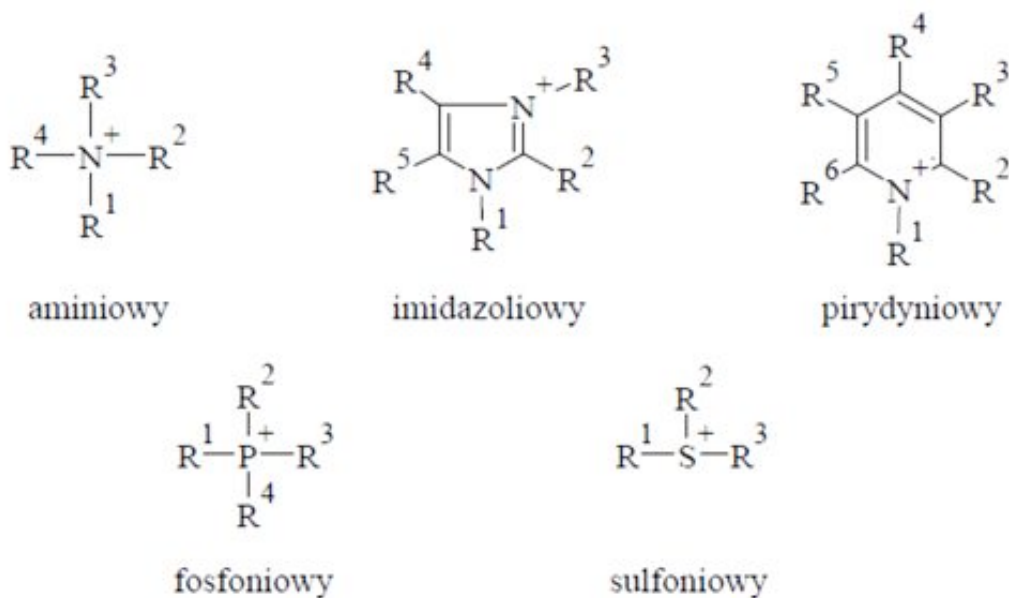
Nieustające olbrzymie zainteresowanie środowisk naukowych i przemysłowych cieczami jonowymi powoduje szybkie powiększanie się tej grupy o kolejne nowe związki. Konieczne okazało się wprowadzenie klasyfikacji dzielącej ciecze jonowe ze względu na rodzaj kationu i anionu oraz ze względu na stan skupienia [35], co przedstawia schemat 5.

W literaturze przedmiotu najbardziej popularny i jednocześnie uproszczony funkcjonuje podział na sole amoniowe, iminiowe, fosfoniowe i sulfoniowe.



Schemat 5. Klasyfikacja cieczy jonowych.

Amoniowe ciecze jonowe charakteryzują się hybrydyzacją sp^3 , a iminiowe hybrydyzacją sp^2 . Do iminiowych cieczy zaliczamy między innymi imidazoliowe i pirydyniowe. Przykładowe kationy cieczy jonowych przedstawiono na schemacie 6.



Schemat 6. Kationy cieczy jonowych.

Zaznaczone grupy R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 mogą być protonem lub grupą alkilową lub innymi grupami np. alkoksymetylową czy alkilotiometylową.

W obecnie prowadzonych badaniach najpopularniejsze są ciecze jonowe z kationami: amoniowym, imidazoliowym, pirydyniowym i fosfoniowym [36]. Natomiast sulfoniowe ciecze jonowe, ze względu na nieprzyjemny zapach wyjściowych tioli, nie są wdzięcznym obiektem badań.

Interesującym przykładem są imidazoliowe ciecze jonowe. Dzięki płaskiej strukturze pierścienia imidazolu łatwo zachować symetrię w cząsteczce, gdy grupy R^1 i R^2 są identyczne. Natomiast różnica w budowie pomiędzy alkilami R^1 a R^2 decyduje o asymetryczności kationu. Według Seddon'a ta właśnie asymetryczność

gwarantuje niską temperaturę topnienia, dzięki czemu są one cieciami. Późniejsze badania nie potwierdzają tej śmiałej hipotezy. Syntezowano symetryczne imidazoliowe ciecze jonowe, które są również cieciami w temperaturze pokojowej [37, 38].

Przeciwnikiem kationu jest anion, który może być pochodzenia nieorganicznego o budowie prostej takiej jak:



czy złożonej, wśród których w zależności od ilości atomów centralnych, można rozróżnić:

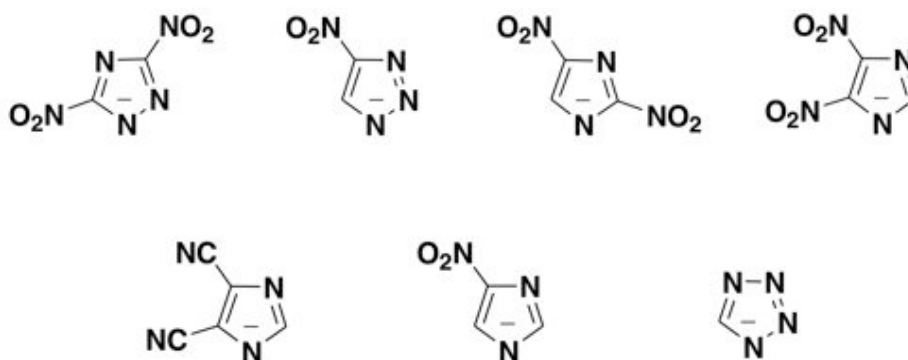
jednordzeniowe:



i wielordzeniowe:



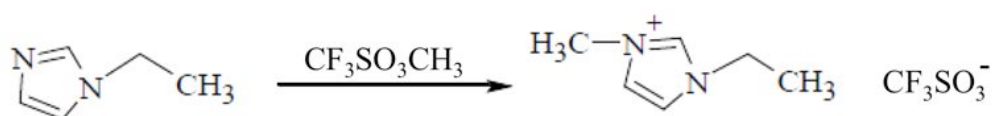
Anion może mieć również charakter organiczny, czego przykładem są: octany, mleczały, salicylany, benzoesany, acesulfamiany czy sacharyniany, jak i tiazolany:



Ciecze jonowe z anionem tiazolanowym są zaliczane do energetycznych cieczy jonowych.

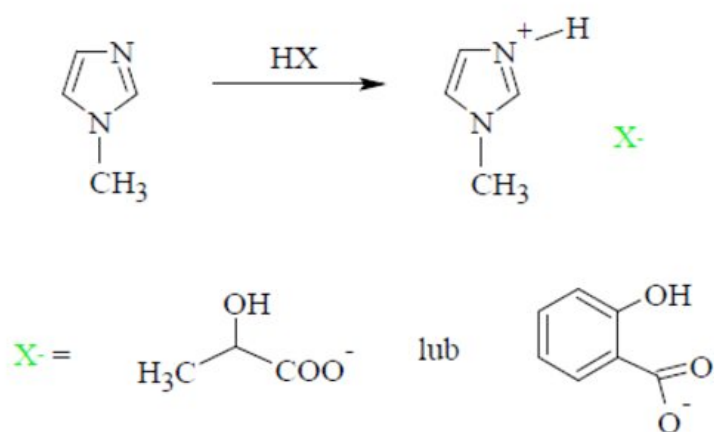
2.3.3. Synteza

Ciecze jonowe można otrzymać w reakcji jednoetapowej lub dwuetapowej. Synteza jednoetapowa polega na reakcji aminy z czynnikiem czwartorzędowym, takim jak trifluorometylosulfonian metylu lub siarczan(VI) dialkylowy. Synteza trifluorometylosulfonianu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego jest klasycznym przykładem reakcji jednoetapowej [39]:



Produktem reakcji jest aprotonowa ciecz jonowa. Reakcja przebiega z wysoką wydajnością i charakteryzuje się brakiem produktu ubocznego.

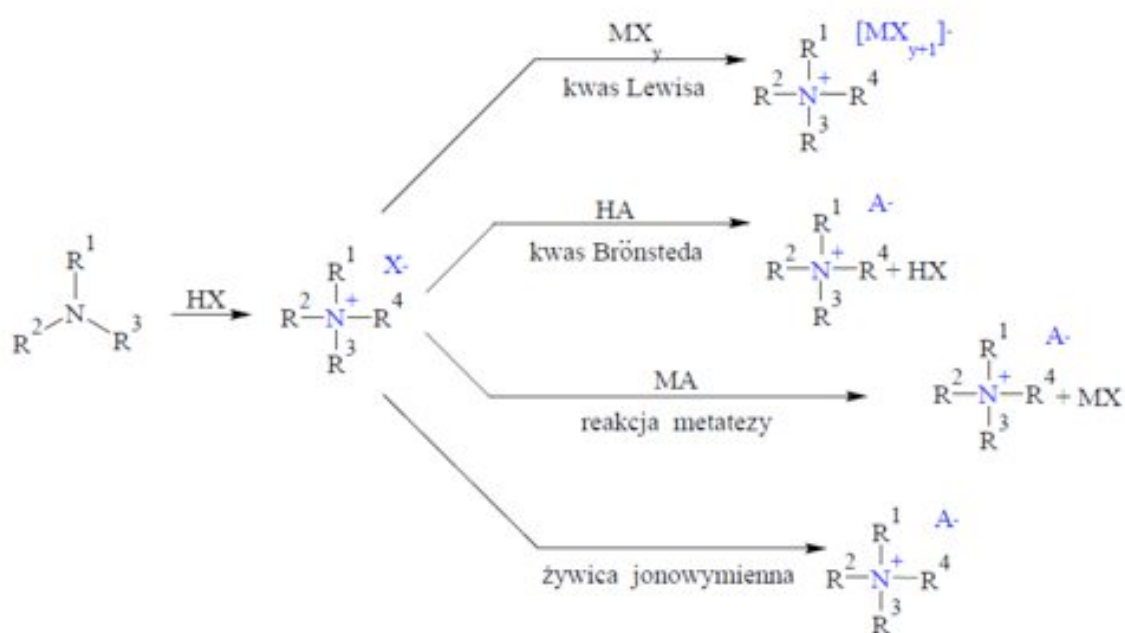
W jednoetapowej syntezie można również otrzymać protonowe ciecze jonowe w wyniku reakcji aminy trzeciorzędowej z kwasem, co przedstawiono na schemacie 7 [40].



Schemat 7. Synteza protonowej imidazoliowej cieczy jonowej.

Ostatnio wyraźnie wzrosło zainteresowanie środowisk badawczych protonowymi cieczami jonowymi i to za sprawą obecności „kwaśnego” protonu w kationie.

Aktualnie uniwersalną metodą otrzymywania cieczy jonowych jest synteza dwuetapowa przedstawiona na schemacie 8. W pierwszym etapie amina reaguje z czynnikiem czwartorzędującym, w wyniku której otrzymuje się czwartorzędowy chlorek lub bromek amoniowy. Jest to typowy przykład reakcji Menshutkina. Powstały halogenek jest często traktowany, jako prekursor cieczy jonowej. W drugim etapie zachodzi reakcja wymiany halogenku na inny anion w roztworze lub na wymienniczu jonowym, a także w reakcji z kwasem Lewisa lub Brönsteda [39].



Schemat 8. Metoda dwuetapowej syntezy cieczy jonowych.

Ważnym elementem w procesie otrzymywania cieczy jonowych jest ich sposób oczyszczania. Ze względu na budowę jonową destylacja nie może być traktowana, jako skuteczna metoda oczyszczania, aczkolwiek jest możliwa [40].

Reakcja wymiany jonowej, często nazywana reakcją metatezy, zachodzi z wysoką wydajnością, na którą ma wpływ rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika oraz temperatura. Głównym zanieczyszczeniem cieczy jonowych są sole nieorganiczne, powstałe w wyniku reakcji wymiany anionu. Najbardziej popularną metodą oczyszczania hydrofobowych cieczy jonowych jest kilkukrotne wypłukiwanie halogenków wodą destylowaną aż do zaniku jonów halogenkowych monitorowanych azotanem(V) srebra. Metoda ta sprawdza się najlepiej w przypadku tetrafluoroboranów, heksafluorofosforanów i bis(trifluorometylosulfonylo) imidków. Ostatecznie bezwodną ciecz otrzymuje się dzięki prostemu rozdzielaniu faz, przemyciu wodą i końcowemu osuszeniu produktu pod próżnią.

Trudniejszy jest sposób oczyszczania hydrofilowych cieczy jonowych. Należą do nich ciecze zawierające aniony: CF_3COO^- , CF_3SO_3^- , $\text{N}(\text{CN})_2^-$. Oczyszczanie polega na rozpuszczeniu hydrofilowej cieczy w bezwodnym acetonie lub metanolu. W tym przypadku sól – produkt uboczny – nie rozpuszcza się w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym, dlatego oddziela się ją na drodze filtracji. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika powstała ciecz suszy się w warunkach obniżonego ciśnienia w temperaturze 60-80°C, przez co najmniej 8 godzin. [41]. Drugim po soli nieorganicznej zanieczyszczeniem jest woda. Przyjęto, że w wysuszonych cieczach jonowych w zależności od ich struktury zawartość wody powinna wahać się pomiędzy 200 a 400 ppm [42]. Obecnie najlepszym sposobem usunięcia wody jest

suszenie cieczy jonowych pod obniżonym ciśnieniem, w podwyższonej temperaturze, w czasie co najmniej 8 godzin, a następnie przechowywanie ich nad P_4O_{10} .

2.3.4. Właściwości

Ciecze jonowe są ciekłe w szerokim zakresie temperatur, mają charakterystyczną lepkość, są niepalne i mają niemierzalną prężność par. Rozpuszczają związki nieorganiczne oraz organiczne, katalizatory (np. kompleksy metali przejściowych) i enzymy. Są stabilne termicznie i chemicznie. Zwilżają powierzchnię metali, polimerów i minerałów oraz mają właściwości smarujące. Wykazują działanie katalityczne oraz absorbują związki siarki. Ponadto związki z jonami BF_4^- , PF_6^- , $(CF_3SO_2)_2N^+$ wykazują ograniczoną mieszalność z wodą, mogą być użyte jako ekstrahenty.

Znajomość właściwości fizykochemicznych cieczy jonowych jest niezwykle istotna, bowiem wskazuje na różnicę pomiędzy nimi a szeroko stosowanymi rozpuszczalnikami organicznymi.

2.3.4.1. Temperatura topnienia

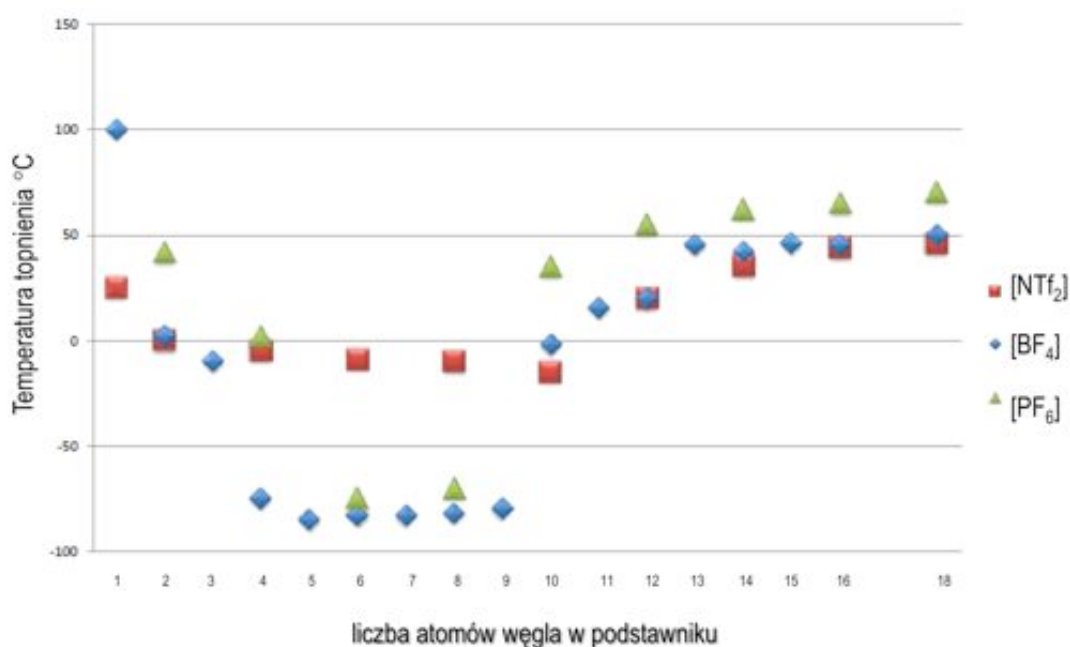
Jest to jedyna wielkość fizykochemiczna, jaka znalazła miejsce w definicji cieczy jonowej. Jednocześnie należy do wielkości dość trudnych do wyznaczenia z powodu silnej higroskopijności lub tendencji cieczy jonowych do przechłodzenia.

Ciecze jonowe rozpuszczalne w wodzie często są higroskopijne, kryształy momentalnie chłoną wodę z otoczenia, w której się rozpuszczają. Pomiar

temperatury topnienia musi być wykonany szybko i w warunkach o niskiej wilgotności.

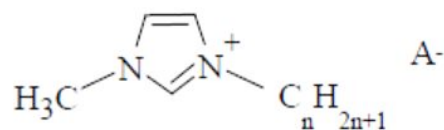
Obniżając temperaturę cieczy jonowej poniżej 0°C, uzyskujemy ciecz przechłodzoną, która może przejść w stan szklisty. Na rysunku 2 przedstawiono zmierzone temperatury topnienia dla trzech szeregów homologicznych tetrafluoroboranu, heksafluorofosforanu i bis(trifluorosulfonyl)imidku 3-alkilo-1-metyloimidazoliowego [43].

Wyróżnić można trzy obszary. Pierwszy dla podstawnika metylowego i etylowego, drugi dla alkilu od 3 do 9 atomów węgla, a trzeci powyżej 10 atomów węgla. Temperatury topnienia poniżej 0°C obserwuje się dla cieczy zawierających podstawnik alkilowy od 3 do 9 atomów węgla. Związki te w temperaturze pokojowej są cieciami.



Rysunek. 2. Temperatura topnienia dla tetrafluoroboranu [BF₄], heksafluorofosforanu [PF₆] i bis(trifluorosulfonyl)imidku [NTf₂] 3-alkilo-1-metyloimidazoliowego.

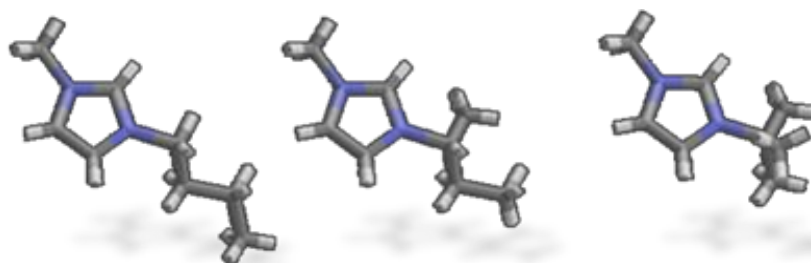
Omawiane szeregi homologiczne posiadają ten sam kation o ogólnym wzorze:



Z przedstawionego materiału wynika, że temperatura topnienia cieczy jonowych silnie zależy od długości podstawnika alkilowego przy czwartorzędowym atomie azotu. Jednocześnie ujawniło się, że rodzaj anionu ma również wpływ na omawianą wielkość. Zaobserwowano, że rozgałęzienie podstawnika alkilowego istotnie zmienia temperaturę topnienia. Dla heksafluorofosforanu 3-butylo-1-metyloimidazoliowego uzyskano następujące wartości:

alki	temperatura topnienia [°C]
<i>n</i> -butyl [CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂]	6,4
<i>sec</i> -butyl [CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH]	83,3
<i>tetr</i> -butyl [(CH ₃) ₃ C]	159,7

Strukturę cytowanych alkili zamieszczono na rysunku 3.

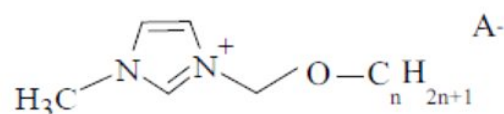


Rysunek 3. Struktury trzech butylowych podstawników.

Im bardziej rozgałęziony podstawnik alkilowy, tym temperatura topnienia jest wyższa. Przez rozgałęzienie podstawnika możemy przekroczyć temperaturę powyżej 100°C i wtedy otrzymamy sole, które nie będą cieczami jonowymi.

2.3.4.2. Gęstość

Gęstość cieczy jonowych najczęściej występuje w przedziale od 0,9 do 1,6 g/cm³. Przeważnie mamy do czynienia z cieczami lżejszymi od wody. Temperatura i ciśnienie nieznacznie wpływają na gęstość; są to zmiany poniżej 3%. Największy wpływ na gęstość ma długość podstawnika. Proces ten można dobrze zaobserwować na przykładzie soli 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowej o strukturze:



Jeżeli przeciwjonem A jest chlor, to związek jest silnie higroskopijny. Wymiana anionu chlorkowego na aniony BF₄⁻ czy PF₆⁻ powoduje utratę higroskopijności soli wówczas powstają ciecze lub substancje krystaliczne zestawione poniżej, w tabeli 2.

Tabela 2. Stan skupienia soli 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowych.

Anion	Liczba atomów węgla w podstawniku C _n H _{2n+1}									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BF ₄ ⁻	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	56-57 ^a	61-62 ^a	62-64 ^a
PF ₆ ⁻	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	ciecz	47-49 ^a	46-47 ^a	52-53 ^a	61-63 ^a

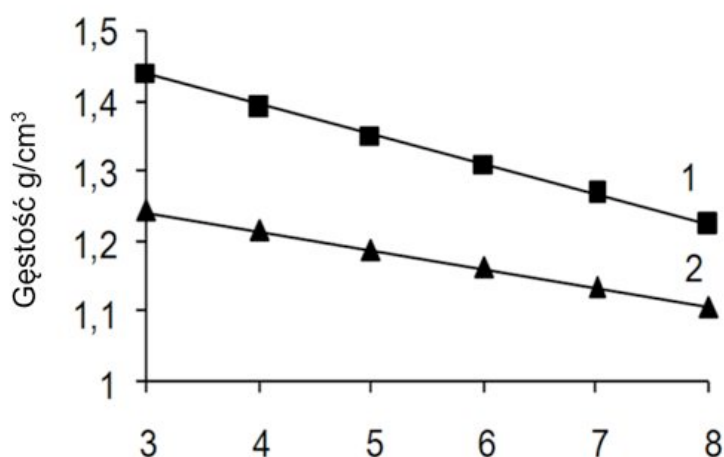
^a Temperatura topnienia w °C.

Z dwudziestu soli trzynaście jest cieczeniami w temperaturze pokojowej, a pozostałe są ciałami stałymi. Wraz ze wzrostem atomów węgla w podstawniku alkilowym gęstość maleje. Jest to zależność liniowa zgodna z równaniem:

$$d = a x + b$$

gdzie x oznacza liczbę atomów węgla, natomiast a i b są wielkościami stałymi.

Graficzny obraz zależności przedstawia rysunek 4. Z przebiegu prostych widać jak duży wpływ na gęstość ma długość podstawnika i rodzaj anionu.



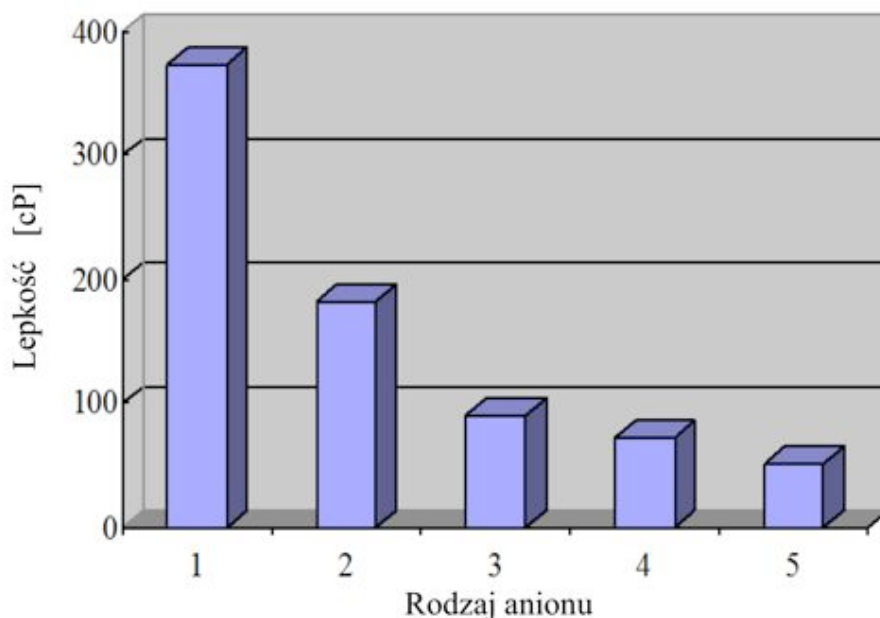
Rysunek 4. Gęstość cieczy jonowych dla dwóch soli 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowych: 1- dla heksafluorofosforanów, 2- dla tetrafluoroboranów.

Dysponując zależnością gęstości od liczby atomów węgla w podstawniku alkilowym można z dużą dokładnością wyliczyć gęstość cieczy jonowej i jednocześnie ustalić, czy będzie to związek cięższy czy lżejszy od wody.

2.3.4.3. Lepkość

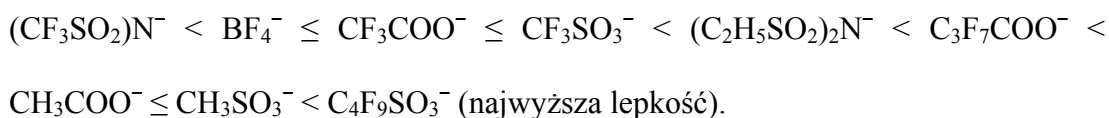
Lepkość cieczy jonowych zależy głównie od rodzaju anionu, co obrazuje rysunek 5 [44]. Obserwuje się tu odwrotną zależność aniżeli w przypadku gęstości. Wraz ze wzrostem masy molowej wzrasta lepkość. Jednocześnie, nie jest to zależność liniowa.

Niewielki dodatek wody lub rozpuszczalnika organicznego wpływa drastycznie na zmianę lepkości. Temperatura ma również silny wpływ. Dodatek soli nieorganicznej zmienia natomiast najsilniej lepkość układu. Wykazano, że 2% wody w tetrafluoroboranie 3-butylo-1-metyloimidazoliowym redukuje lepkość o 50%, natomiast na przykładzie heksafluorofosforanu 3-butylo-1-metyloimidazoliowego spadek temperatury o 5 stopni z 25 do 20°C powoduje wzrost lepkości o 27% [45].



Rysunek 5. Lepkość dynamiczna soli 3-butylo-1-metyloimidazoliowych w temperaturze 20°C z następującymi anionami:
1 – $n\text{-C}_4\text{F}_9\text{SO}_3^-$, 2 – $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{COO}^-$, 3 – CF_3SO_3^- , 4 – CF_3COO^- , 5 – $(\text{CF}_3\text{SO}_2)\text{N}^-$.

Generalnie wzrost lepkości obserwuje się w cieczach jonowych dla różnych anionów w następującej kolejności:



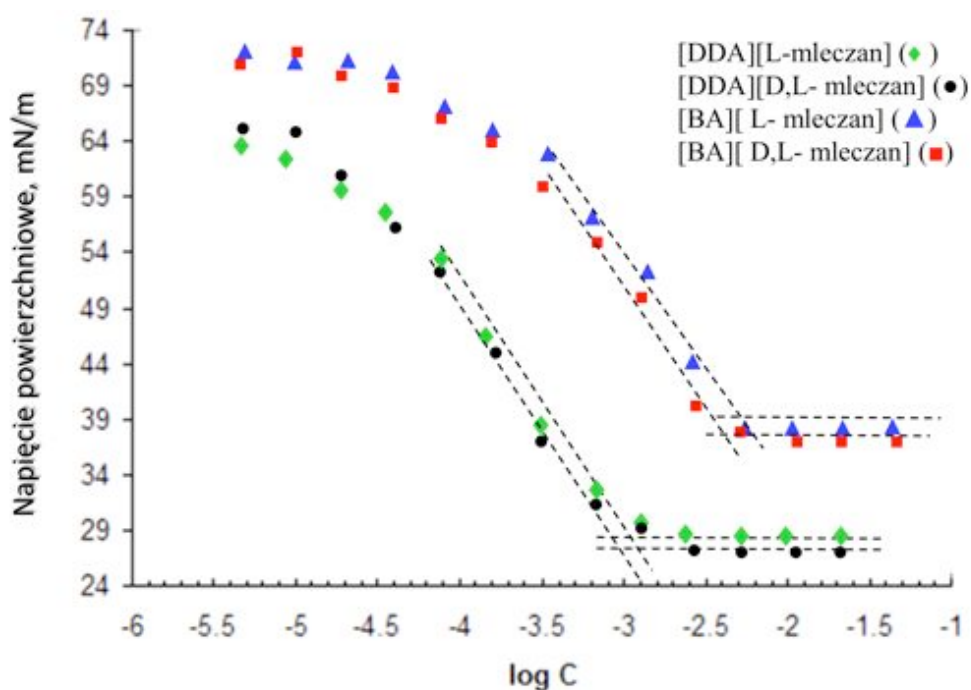
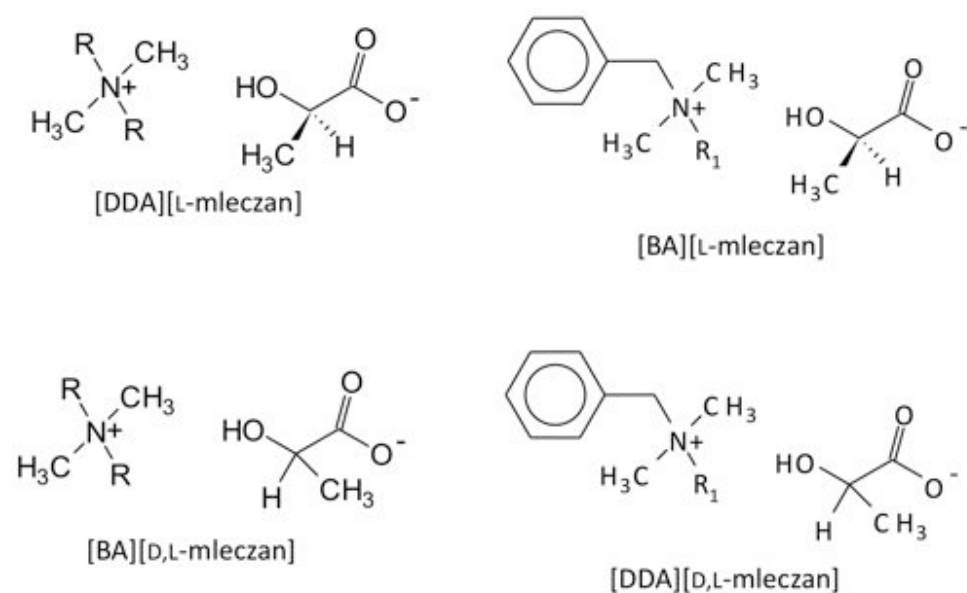
2.3.4.4. Stabilność termiczna

Istotną wielkością fizykochemiczną cieczy jonowych jest ich temperatura rozkładu. Ze względu na jonową budowę związki te powinny mieć wysokie temperatury rozkładu. Przyjęto, iż stabilność termiczną najdokładniej obrazuje analiza TGA (ang. *thermal gravimetric analysis*). Analiza ta ma przewagę nad innymi, ponieważ jest dobrze definiowalna, mierzalna oraz jest powtarzalna. Z termogramu TGA jasno wynika, kiedy następuje rozkład mierzonej cieczy. Najczęściej w literaturze podaje się, T_{onset} , czyli temperaturę, w której następuje 50% rozkład związku. Na stabilność termiczną ma wpływ zarówno rodzaj kationu, jak i anion. Najbardziej stabilny to kation bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowy.

Znane są już ciecze, których T_{onset} przekracza 400°C. W procesach przemysłowych, w których prowadzi się reakcje w rozpuszczalnikach istotną rolę odgrywa stabilność użytego medium. Natomiast dla procesów biotransformacji przebiegających z udziałem enzymów nie jest wymagana tak wysoka stabilność termiczna. Praktycznie każda ciecz jonowa może być użyta w reakcjach enzymatycznych; wystarczy wziąć pod uwagę kryterium jej stabilności termicznej.

2.3.4.5. Aktywność powierzchniowa

Ciecze jonowe wykazują aktywność powierzchniową. Dla rozpuszczalnych w wodzie cieczy jonowych, można łatwo wyznaczyć napięcie powierzchniowe.



Rysunek 6. Izotermi napięcia powierzchniowego mleczanów didecyldimetyloamoniowych [DDA] i benzalkoniowych [BA].

Wyznaczone wartości [46] dla mleczanów didecyloдимetyloamoniowych [DDA] i benzalkoniowych [BA] przedstawiono na rysunku 6. Przebieg izoterm napięcia powierzchniowego badanych cieczy jonowych wskazuje, że są to typowe kationowe związki powierzchniowo czynne. Nie zaobserwowano zmian w przebiegu krzywych dla formy optycznej - L-mleczanu i racematu - D,L-mleczanu. W badanym przypadku forma anionu nie spowodowała zmian aktywności powierzchniowej.

2.3.5. Toksykologia

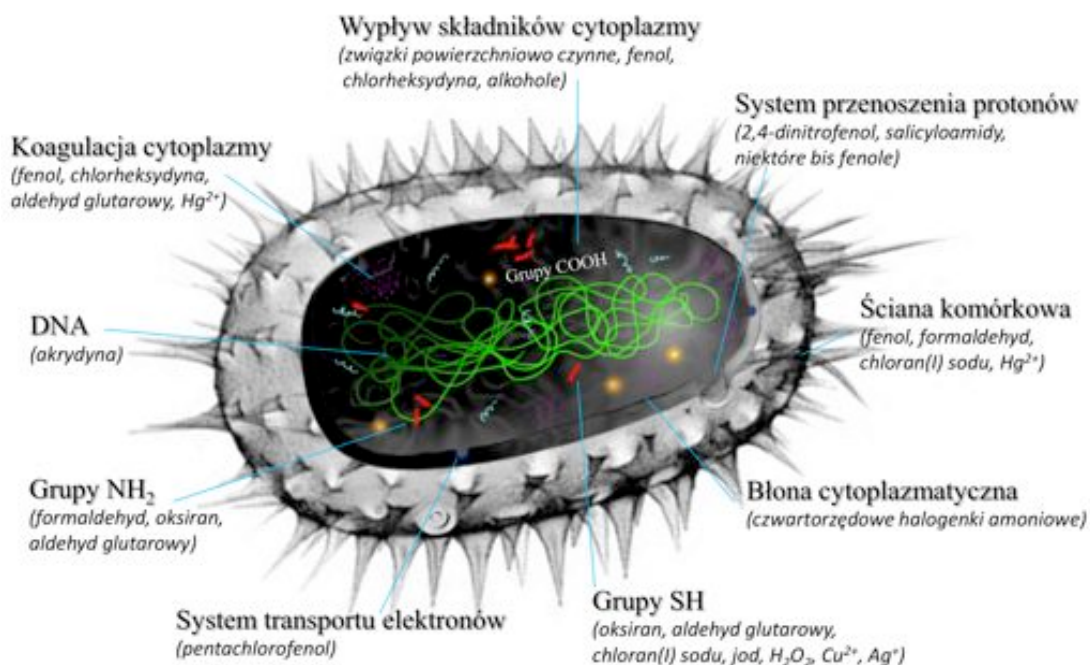
Czwartorzędowe halogenki amoniowe, prekursorzy cieczy jonowych, znane są ze swoich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Wykazują one względnie niską toksyczność w stosunku do organizmów stałocieplnych i od lat znajdują zastosowanie w sterylizacji, dezynfekcji oraz preparatach bakterio- i grzybobójczych. Najczęściej stosowane w antyseptyce są: chlorek i bromek benzalkoniowy, chlorek didecyloдимetyloamoniowy oraz chlorek heksadecylopirydyniowy.

Czwartorzędowe chlorki i bromki amoniowe mają pewną wadę – są gorzkie w smaku. Wymiana anionu chlorkowego na acesulfamianowy czy sacharynianowy powoduje, że taka sól staje się w smaku słodka [47, 48]. Acesulfamiany i sacharniany mogłyby zatem z powodzeniem zastąpić chlorki wszędzie tam, gdzie występuje kontakt z żywnością, w preparatach przyjmowanych doustnie oraz antybakteryjnych płukankach do jamy ustnej. Wykazano, że acesulfamiany alkoksymetylo(2-hydroksyetylo)dimetyloamoniowe oraz acesulfamiany alkoksymetylo(2-etanoloksyetylo)dimetyloamoniowe są rozpuszczalne w wodzie i posiadają silne działanie biologiczne [35].

Związki chemiczne, wykorzystywane, jako substancje czynne w środkach dezynfekcyjnych, mają znacznie szerszy zakres działania niż antybiotyki. Zwykle są stosowane w wyższych stężeniach, są mniej wybiórcze i niejednokrotnie atakują wiele miejsc docelowych w komórkach drobnoustrojów. Wyróżnia się cztery podstawowe mechanizmy działania związków chemicznych na komórkę bakteryjną:

- denaturacja białek i rozerwanie kompleksów nukleoproteidowych,
- uszkodzenie błony komórkowej,
- utlenienie grup sulfydrylowych,
- reakcje z grupami aminowymi.

Na schemacie 9 przedstawiono oddziaływanie związków chemicznych na strukturę komórki bakterii.



Schemat 9. Oddziaływanie różnych związków chemicznych na struktury komórki bakteryjnej.

Czwartorzędowe halogenki amoniowe odpowiadają głównie za dezorganizację błony cytoplazmatycznej bakterii i błony plazmatycznej grzybów. Mechanizm działania jest kilkuetapowy. W pierwszym etapie następuje oddziaływanie kationu z posiadającymi ładunek ujemny białkami strukturalnymi błony zewnętrznej bakterii. Zaadsorbowane na powierzchni komórki kationy penetrują przez ścianę komórkową, łączą się z błoną cytoplazmatyczną, uszkadzając w sposób wybiórczy jej strukturę półprzepuszczalną, a następnie wnikają do wnętrza komórki. W wyniku tych procesów dochodzi do wypływu z komórki jonów potasu, sodu, fosforanowych(V) oraz puryn, pirymidyn i pentoz.

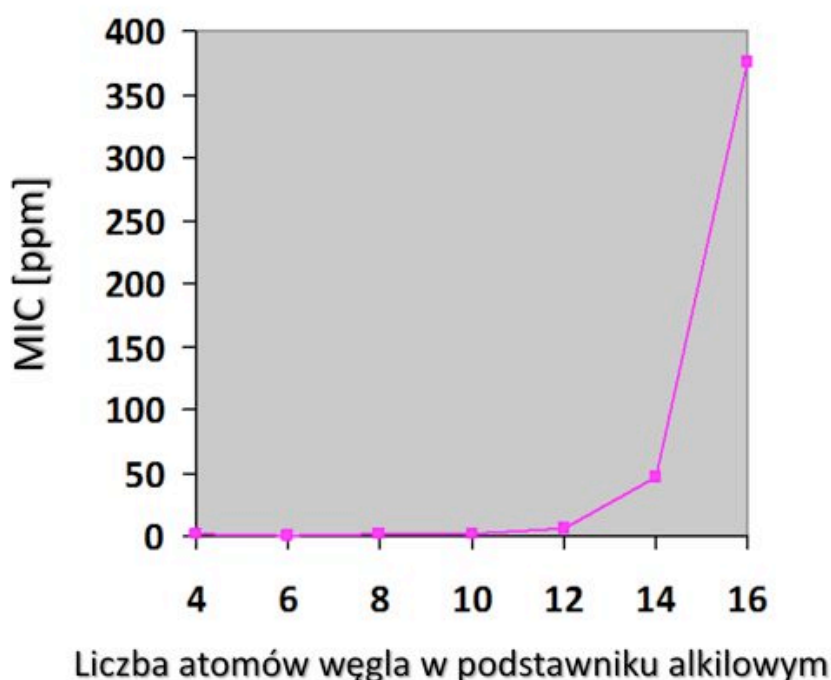
Zahamowana zostaje aktywność enzymów oddechowych, w tym dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej, oraz spada zużycie tlenu w komórce. Dochodzi do zakłócenia procesów glikolizy oraz syntezy kwasów nukleinowych i białek. Może także dojść do lizy komórek w wyniku aktywacji enzymów autolitycznych. Wszystkie przedstawione zmiany występują, kiedy stężenie czwartorzędowych halogenków amoniowych jest wysokie. Są to przemiany nieodwracalne i doprowadzają do śmierci komórki. Niskie stężenia omawianych związków powodują odwracalne zakłócenia podziałów komórkowych, procesów enzymatycznych oraz glikolizy. Procesy zachodzące wewnątrz komórki mogą się różnić w zależności od rodzaju czwartorzędowego halogenku amoniowego oraz rodzaju drobnoustroju [49, 50].

Czwartorzędowe halogenki amoniowe wykazują szeroki zakres przeciwdrobnoustrojowego działania obejmujący bakterie i grzyby [49-51]. Aktywność bakteriobójcza występuje jedynie wobec form wegetatywnych, wśród których na działanie tych soli bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe niż

Gram-ujemne. Najwyższą aktywność wykazują w stosunku do ziarenkowców Gram-dodatnich (np. z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus*) oraz innych bakterii Gram-dodatnich, w tym pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* i wegetatywnych form laseczek *Bacillus subtilis*.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa w istotny sposób zależy od długości łańcucha alkilowego oraz liczby łańcuchów alkilowych w cząsteczce; jest największa dla związków, które zawierają od 10 do 16 atomów węgla w łańcuchu alkilowym lub od 8 do 14 atomów węgla w grupie alkoksymetylowej [52-55].

Nie obserwuje się różnic w działaniu na drobnoustroje halogenków zawierających czwartorzędowy atom azotu o hybrydyzacji sp^3 czy sp^2 . W związku z tym aktywność czwartorzędowych halogenków amoniowych jest porównywalna z działaniem halogenków pirydynowych czy imidazoliowych.



Rysunek 7. Aktywność biologiczna wyrażona wartością MIC dla chlorku 3-alkoksymetylo-1-imidazoliowego wobec *Bacillus subtilis*.

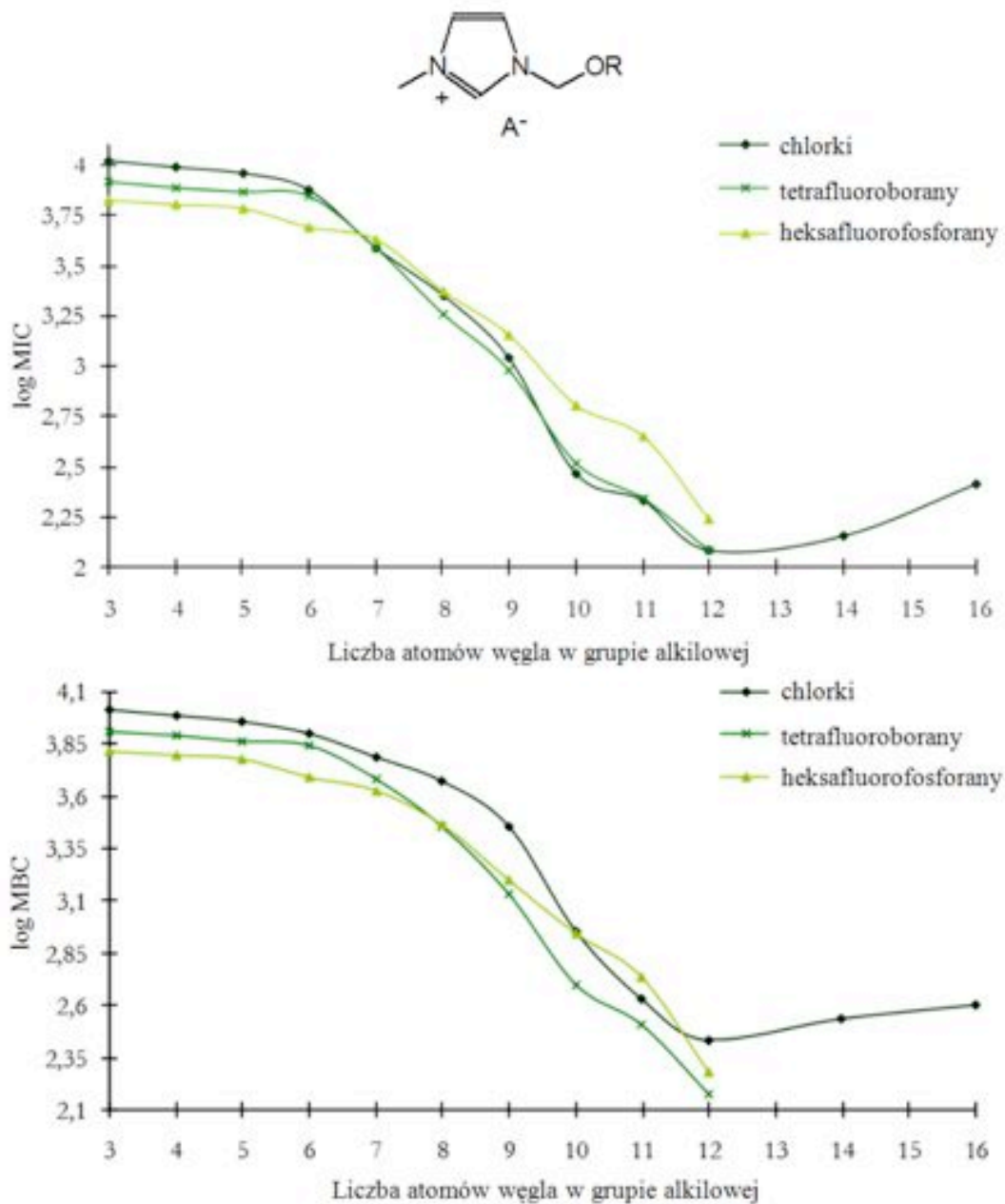
Na rysunku 7 przedstawiono zależność MIC (minimalne stężenie hamujące) od długości podstawnika alkilowego w chlorkach 3-alkoksymetylo-1-imidazoliowych wobec *Bacillus subtilis* [56]. Wysoką aktywność biologiczną obserwuje się do 12-tu atomów węgla w obu podstawnikach. Wzrost liczby atomów węgla powyżej 12 powoduje wyraźny spadek aktywności, który można tłumaczyć wzrostem hydrofobowości badanego chlorku.

Spośród grzybów wrażliwe na działanie czwartorzędowych halogenków amoniowych okazały się drożdżaki (w tym *Candida albicans*) [52-54] oraz grzyby strzępkowe (np. *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viridae*, *Coniophora puteana*, *Trametes versicolor*) [57].

W porównaniu z dobrze opisanymi właściwościami mikrobiologicznymi czwartorzędowych halogenków alkilowych, prekursorów cieczy jonowych, badania nad właściwościami bakterio- i grzybobójczymi cieczy jonowych są dopiero rozpoznawane.

Wykazano, że wymiana anionu na anion nieorganiczny taki jak tetrafluoroboranowy czy heksafluorofosforanowy nie powoduje zmian w aktywności wobec mikroorganizmów. Zależność średniej wartości MIC i MBC od długości podstawnika alkoksymetylowego w soli 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowej zestawione na rysunku 8 wobec 9-ciu bakterii [56]. Przebieg krzywych jest praktycznie identyczny. Należy zaznaczyć, że nie jest to regułą i w przypadku anionu organicznego jego wpływ będzie zmieniać aktywność biologiczną. Pierwsze prace o wpływie anionu o charakterze organicznym pojawiły się już w literaturze [58]. Zespół

Seddon'a wykazał, że ciecze jonowe są skuteczne w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego [59, 60].



Rysunek 8. Wartości średnie MIC i MBC dla wybranych dziewięciu mikroorganizmów.

Toksykologia i ekotoksykologia cieczy jonowych jest obecnie intensywnie badana. Pierwsza praca przeglądowa z tej dziedziny ukazała się w 2007 roku [61].

Wykazano, że kation w cieczy jonowej decyduje głównie o biodegradowalności oraz toksyczności wobec organizmów wodnych [62-68]. Ciecze jonowe z krótkimi podstawnikami od 1 do 5 atomów węgla są stosunkowo mniej toksyczne niż ciecze z podstawnikami od 7 i więcej atomów węgla. Zależność ta również obowiązuje w przypadku biodegradowalności. Lepiej biodegradowalne są ciecze jonowe z krótkimi podstawnikami alkilowymi. Badania dotyczące doustnej toksyczności cieczy jonowych, prowadzone są na szczurach. Użyty do badań acesulfam didecyldimetyloamoniowy [70] oraz sacharynian didecyldimetyloamoniowy [71] podawane nawet w wyższych dawkach okazały się nie toksyczne. Natomiast zarejestrowane nieznaczne odchylenia w morfologii krwi nie wymagały leczenia. Ukazała się już publikacja przeglądowa podsumowująca obecny stan wiedzy o toksyczności i ekotoksyczności cieczy jonowych [69].

 Nie zmienia to faktu że obecny stan wiedzy o cieczach jonowych jest na tyle ubogi, że trudno zaplanować syntezy związków całkowicie bezpiecznych.

2.3.6. Zastosowanie

Reakcja wymiany anionu pozwala dowolnie sterować własnościami cieczy jonowych. Możliwe jest więc projektowanie związków o pożądanych właściwościach. To właśnie wyróżnia ciecze jonowe i sprawia, że są one niezwykle atrakcyjne dla nauki i stanowią przedmiot zainteresowania ze strony nauki i przemysłu.

Ciecze jonowe charakteryzują się:

- szerokim zakresem temperatury, w której istnieją w stanie ciekłym, połączonym z wysoką stabilnością termiczną (dolną granicę stanowi

temperatura topnienia lub zeszklenia wynosząca nawet -80°C , natomiast górna granica to temperatura rozkładu termicznego sięgająca dla niektórych cieczy nawet 450°C),

- zdolnością rozpuszczania substancji organicznych, nieorganicznych, a nawet niektórych polimerów,
- wysoką polarnością, zbliżoną do polarności etanolu i DMF-u,
- wysokim przewodnictwem elektrycznym i szerokim oknem elektrochemicznym,
- bardzo niską prężnością par, nawet w podwyższonej temperaturze i pod obniżonym ciśnieniem,
- możliwością wielokrotnego wykorzystania poprzez recykling.

Początkowo ciecze jonowe w formie soli chloroglinianowych wykorzystali elektrochemicy, stosując je jako elektrolity do ogniw o dużej gęstości energii [72]. Chlorogliniany były również używane, jako kąpiele elektrolityczne do nanoszenia glinu i jego stopów oraz innych metali. Otrzymane w ten sposób powłoki okazały się zwarte, gładkie i odporne na korozję [73]. Wadą cieczy jonowych z anionem chloroglinianowym jest ich wrażliwość na działanie wody i powietrza, co znacznie ogranicza ich stosowanie. Istotnym postępem było otrzymanie nowej generacji cieczy jonowych zbudowanych z anionów, które spowodowały, że związki stały się niewrażliwe na wodę i powietrze [74]. Szczególnie interesujące okazały się ciecze jonowe zawierające słabo kompleksujące aniony: tetrafluoroboranowy, heksafluorofosforanowy oraz bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowy. Ciecze te zostały użyte, jako elektrolity w wysokonapięciowych kondensatorach elektrochemicznych [75].

Amoniove ciecze jonowe wykazują właściwości antyelektrostatyczne [76] i mogą być z powodzeniem stosowane zarówno, jako antyelektrostatyki zewnętrzne, jak i wewnętrzne. Właściwości antyelektrostatyczne cieczy jonowych mogą być wykorzystane przy impregnacji drewna. Samo drewno nie posiada właściwości antyelektrostatycznych, natomiast zaimpregnowane drewno cieczami jonowymi pozwala na obniżenie oporności i wzrost przewodnictwa elektrycznego [77, 78].

Ciecze jonowe charakteryzują się właściwościami bakteriobójczymi i bakteriostatycznymi [58-60, 79-82], a także grzybobójczymi [77, 83]. Można je również wykorzystać do balsamowania i utrwalania tkanek miękkich [84, 85], co zostało potwierdzone podczas diagnostyki histopatologicznej. Wykorzystanie cieczy jonowych powoduje, iż obraz mikroskopowy tkanek w nich przechowywanych jest wyraźniejszy niż w przypadku zastosowania popularnych preparatów, tj. 10%-go roztworu formaliny. W przyszłości cecha ta może wpłynąć na szybszą i bardziej precyzyjną diagnostykę schorzeń, takich jak stłuszczenie czy zapalenie wątroby.

Okazało się, że jest możliwa synteza nowej grupy tzw. energetycznych cieczy jonowych. Są to ciecze zawierające w swej budowie anion azolanowy, np. 3,5-dinitro-1,2,4-triazolowy [86]. Ze względu na obecność dużej ilości azotów, a przy tym grup nitrowych, związki te kumulują duże porcje energii i mogą zostać zastosowane, jako potencjalne wysokoenergetyczne dodatki do paliw płynnych.

Wykazano, że można rozpuścić polimer naturalny, jakim jest celuloza w cieczy jonowej. Swatloski i współpracownicy [87, 88] rozpuścili pulpę celulozową w kilku cieczach jonowych, z których najlepszym rozpuszczalnikiem okazały się bezwodny chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy i octan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy. Rozpuszczona celuloza wytrąca się z roztworu po dodaniu

wody, bez utraty swoich właściwości wyjściowych [87, 89, 90]. Ważne jest natomiast, iż nie zaobserwowano degradacji łańcucha polimerowego.

Ukazało się wiele doniesień o przemysłowym wykorzystaniu cieczy jonowych. Firma BP Chemicals opracowała ekstrakcję kerogenu łupków bitumicznych [91]. Wyekstrahowany kerogen pozwala oznaczyć wiek powstania złoża ropnoślusznego.

Przemysłowe zastosowanie cieczy jonowych jest możliwe przy odzysku paliwa jądrowego z odpadów z reaktorów atomowych. W procesie tym nierozpuszczalne tlenki uranu(IV) i plutonu(IV) utlenia się do rozpuszczalnych tlenków w azotanie(V) 1-butylopirydyniowym [92, 93]. Ekstrakcja związków siarki z oleju napędowego przez cieczy jonowe okazała się bardzo skuteczna, a proces ten jest zalecany w oczyszczaniu oleju napędowego. Tak oczyszczony olej napędowy spełnia obowiązujące europejskie normy dotyczące paliw płynnych [94, 95].

Kolejnym przemysłowym zastosowaniem cieczy jonowych jest proces Difasol [96]. Polega on na dimeryzacji propenów i butenów do izoheksenów oraz izooktenów, z wykorzystaniem katalizatorów typu Zieglera-Natta. Rozpuszczalnikiem jest chloroglinian 1-butylo-3-metyloimidazoliowy.

Instalacja pilotowa BP Chemicals pozwala produkować etylobenzen, surowiec do produkcji polistyrenu z udziałem cieczy jonowej. W technologii tej chloroglinian 1-alkilo-3-metyloimidazoliowy, jako ciecz jonowa pełni podwójną rolę: jest katalizatorem i rozpuszczalnikiem równocześnie. Aktywność katalityczna rozpuszczalnika utrzymuje się nawet do trzystu cykli [92]. Opracowana metoda jest zaliczana do technologii przyjaznych dla środowiska naturalnego.

Firma BASF uruchomiła proces o nazwie BASIL. Reakcję prowadzi się periodycznie w temperaturze 75°C, z udziałem protonowej cieczy jonowej. W procesie tym powstają dwie fazy: dolna – chlorowodorek 1-metyloimidazoliowy (protonowa ciecz jonowa) oraz górna – oczekiwany produkt. Po rozdzieleniu warstw chlorowodorek zobojętnia się i zwraca do ponownego użycia [97].

Popularnym kierunkiem zastosowania cieczy jonowych stała się biotechnologia. Zaletą stosowania omawianych cieczy jest zwiększona stabilność enzymów w cieczach jonowych niż w tradycyjnych mediach, tj. wodzie czy rozpuszczalnikach organicznych [98]. W biotechnologii główne reakcje prowadzone z użyciem cieczy jonowych to: synteza Z-aspartamu [99], estryfikacje i transestryfikacje [100-104] oraz chemiczny rozdział racematów [105] czy też solwoliza [106]. W reakcjach enzymatycznych najczęstszym katalizatorem są lipazy, szczególnie lipaza B *Candida antarctica* [107, 108], która jest wykorzystywana głównie do reakcji transestryfikacji i kinetycznego rozdziału racematów. Pozostałe enzymy to: proteazy np. stosowana w syntezie Z-aspartamu α -chymotrypsyna, β -galaktozydaza, a także oksydoreduktazy, dehydrogenaza mrówkowa i inne [109-111].

Dokonany przegląd zastosowania cieczy jonowych pokazuje, jak duży potencjał aplikacyjny ma omawiana grupa związków. W tym właśnie należy upatrywać tak duże zainteresowanie środowisk naukowych i przemysłowych cieczami jonowymi.

3. CEL PRACY

Podstawowym celem pracy była ocena przydatności zastosowania utrwalania tkanek w cieczach jonowych dla diagnostyki patomorfologicznej. Wyselekcjonowane ciecze jonowe zostały wykorzystane do utrwalania materiału tkankowego pobranego do badania histopatologicznego nowotworów głowy i szyi, jako efektywne i bezpieczne zamienniki formaliny.

Założenia pracy realizowano przy pomocy następujących celów cząstkowych:

1. Zaprojektowanie i syntetyzowanie cieczy jonowej, która będzie łatwo penetrować tkanki, utrzymywać materiał do badania histopatologicznego i jednocześnie posiadać właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze.
2. Ocena przydatności zsyntetyzowanych cieczy jonowych dla wykonywania badań histologicznych, histochemicznych i immunohistochemicznych, na materiale przekazywanym do badania histopatologicznego, nowotworów głowy i szyi.
3. Ocena porównawcza materiału utrwalonego w 10% roztworze buforowanej formaliny i wybranej cieczy jonowej.

Spodziewano się, że ciecze jonowe charakteryzujące się unikalnymi właściwościami będą dobrymi zamiennikami szeroko stosowanego obecnie 10% roztworu buforowanej formaliny. Ponieważ wybrane ciecze jonowe są związkami nielotnymi, w miejscu pracy zostanie ograniczona do minimum toksyczność związana z uwalnianymi się oparami formaldehydu.

4. MATERIAL I METODA

4.1. CIECZE JONOWE

4.1.1. Synteza eteru chlorometyloalkilowego

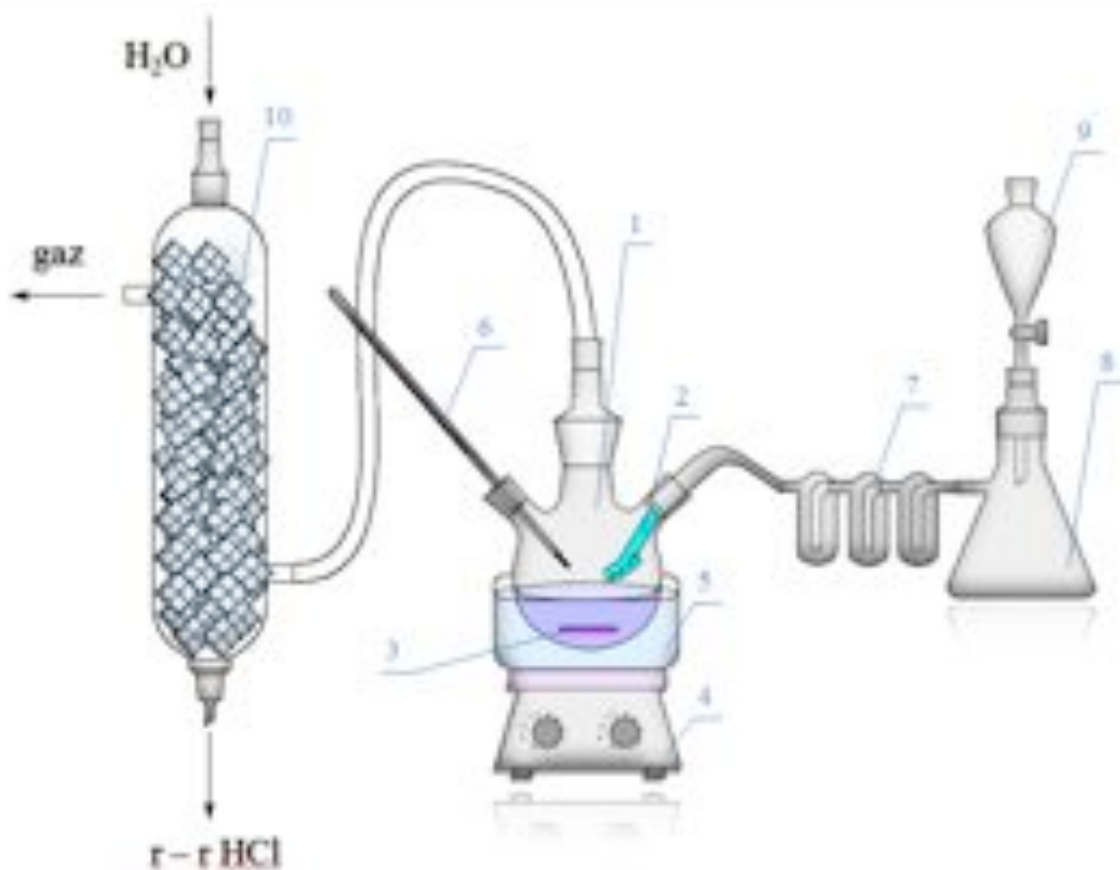
1 mol alkoholu umieszczono w kolbie reakcyjnej o pojemności 500 cm³, zaopatrzonej w dipol magnetyczny i termometr. Następnie dodano stechiometryczną ilość formaldehydu w postaci stałej (paraformaldehyd) i 400 cm³ toluenu. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną nasycano gazowym chlorowodorem. Chlorowódor był wytwarzany za pomocą wkraplania stężonego kwasu siarkowego(VI) do stężonego kwasu solnego. Reakcję prowadzono w temperaturze 10-15°C, chłodząc kolbę reakcyjną lodem. Chlorowódor przepuszczano przez mieszaninę reakcyjną, intensywnie mieszając do momentu zaniku jego absorpcji. Nieprzereagowany chlorowódor był absorbowany w wodnej płuczce.

Schemat stanowiska syntezy przedstawia rysunek 9. Po zakończeniu reakcji oddzielono dolną warstwę wodną. Górna warstwa organiczna była suszona nad bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Następnie odparowano toluen.

Otrzymany produkt zawierał eter chlorometyloalkilowy i acetal dialkilowy formaldehydu. Zawartość procentową eteru oznaczono alkacymetrycznie.

Naważkę 1 g produktu, o dokładnie oznaczonej masie ($\pm 0,01$ g), umieszczono w kolbie stożkowej o pojemności 250 cm³. Następnie dodano 20 cm³ acetonu wychłodzonego do temperatury -18°C i szybko odmiareczkowano wolny chlorowódor 0,2 molowym metanolemowym roztworem wodorotlenku sodu.

Miareczkowanie prowadzono wobec lakmoidu, który posłużył jako wskaźnik do zmiany zabarwienia z czerwonego na niebieskie.



Rysunek 9. Schemat instalacji do syntezy eteru chlorometyloalkilowego. 1-kolba reakcyjna, 2-spiek ceramiczny, 3-dipol magnetyczny, 4-mieszadło magnetyczne, 5-łaźnia lodowa, 6-termometr, 7-bateria płuczek, 8-kolba ze stężonym kwasem solnym, 9-wkraplacz ze stężonym kwasem siarkowym(VI), 10-płuczka wodna.

Następnie dodano 50 cm³ gorącej wody destylowanej. Powstający w wyniku hydrolizy chlorowódz odmiareczkowano 0,2 molowym metanolem roztworem wodorotlenku sodu aż do uzyskania trwałego niebieskiego zabarwienia roztworu. Procentową zawartość eteru chlorometyloalkilowego w produkcie obliczono ze wzoru:

$$X_E = \frac{(V_2 - V_1) \cdot M_E \cdot C_{\text{NaOH}}}{1000 \cdot m_E} \cdot 100$$

w którym:

X_E – procentowa zawartość eteru chlorometyloalkilowego [%],

V_1 – ilość 0,2 molowego NaOH zużytego na zmiareczkowanie wolnego HCl
[cm³],

V_2 – całkowita objętość 0,2 molowego NaOH [cm³],

M_E – masa molowa eteru chlorometyloalkilowego [g/mol],

m_E – naważka produktu [g],

C_{NaOH} – stężenie metanolowego roztworu NaOH [mol/dm³].

Dokładność metody była na poziomie $\pm 1\%$.

4.1.2. Synteza 1-butyloimidazolu

Do kolby reakcyjnej wprowadzono 1 mol imidazolu, 300 cm³ odwodnionego THF i porcjami 1 mol sodu metalicznego. Po rozpuszczeniu sodu wkroplono 1 mol bromku butylu. Reakcję prowadzono w temperaturze 60°C przez 2 godziny. Z mieszaniny reakcyjnej odpędzono rozpuszczalnik i oddestylowano pod obniżonym ciśnieniem 1-butyloimidazol. Otrzymano czysty 1-butyloimidazol z wydajnością 80%.

4.1.3. Synteza chlorku 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowego

Do kolby reakcyjnej wprowadzono syntezowany 1-butyloimidazol, stechiometryczną ilość eteru chlorometyloalkilowego i odwodniony heksan. Reakcja była prowadzona przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie oddestylowano heksan. Pozostałość płukano 2-krotnie porcjami heksanu. Otrzymano chlorek 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowy z wydajnością powyżej 90%.

4.1.4. Synteza tetrafluoroboranu 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowego

Do kolby reakcyjnej wprowadzono chlorek 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowy, wodę i stechiometryczną ilość tetrafluoroboranu sodu. Reakcja wymiany była przeprowadzona w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Następnie rozdzielono warstwy. W dolnej warstwie wodnej zawarty był produkt uboczny chlorek sodu. Warstwę organiczną osuszono w suszarce próżniowej w temperaturze 60°C i rozpuszczono w bezwodnym acetonie. Produkt uboczny chlorek sodu nie rozpuszcza się w bezwodnym acetonie, dlatego można go było całkowicie usunąć. Po odparowaniu acetonu otrzymano tetrafluoroboran 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowy z 95-99% wydajnością.

Zsyntezowane związki były analizowane spektralnie. Widma protonowe i węglowe magnetycznego rezonansu jądrowego wykonano w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej, działającym przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Użyto w tym celu spektrometru Mercury Gemini

300 o częstotliwości generowania 300 MHz dla widm protonowych i 75 MHz dla widm węglowych. Jako standardu wewnętrznego użyto tetrametylosilanu.

Tetrafluoroboran 1-butylo-3-propoksymetyloimidazoliowy ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 9,34(t, 1,5Hz, 1H), 7,88(t, 1,8Hz, 1H), 7,85(t, 1,8Hz, 1H), 5,57(s, 2H), 4,25(t, 7Hz, 2H), 3,48(t, 6,4Hz, 2H), 1,84(m, 2H), 1,58(m, 2H), 1,31(m, 2H), 0,94(t, 7,4Hz, 3H), 0,86(t, 7,4Hz, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm 136,5, 122,9, 122,1, 78,3, 70,9, 48,9, 31,2, 22,0, 18,8, 13,2, 10,2.

Tetrafluoroboran 3-butoksymetylo-1-butyloimidazoliowy ^1H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 9,35(t, 1,4Hz, 1H), 7,88(t, 1,8Hz, 1H), 7,85(t, 1,8Hz, 1H), 5,56(s, 2H), 4,25(t, 7Hz, 2H), 3,52(t, 6,5Hz, 2H), 1,85(m, 2H), 1,51(m, 2H), 1,44(m, 4H), 0,93(t, 7,4Hz, 3H), 0,87(t, 7,3Hz, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm 136,3, 122,7, 122,0, 78,2, 68,9, 48,8, 31,2, 30,7, 18,8, 18,6, 13,5, 13,3.

Tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm 8,98(t, 1,5Hz, 1H), 7,53(t, 1,8Hz, 1H), 7,50(t, 1,8Hz, 1H), 5,56(s, 2H), 4,27(t, 7,4Hz, 2H), 3,56(t, 6,5Hz, 2H), 1,92(m, 2H), 1,59(m, 2H), 1,41(m, 2H), 1,27(m, 8H), 0,98(t, 7,3Hz, 3H), 0,89(t, 6,9Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm 135,6, 122,9, 121,4, 79,2, 70,5, 49,9, 31,7, 28,7, 27,8, 22,2, 19,2, 13,8, 13,2.

Tetrafluoroboran 1-butylo-3-oktyloksymetyloimidazoliowy ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm 8,96(t, 1,5Hz, 1H), 7,55(t, 1,8Hz, 1H), 7,51(t, 1,9Hz, 1H), 5,56(s, 2H), 4,28(t, 7,4Hz, 2H), 3,56(t, 6,4Hz, 2H), 1,95(m, 2H), 1,58(m, 2H), 1,41(m, 2H), 1,25(m, 10H), 0,98(t, 7,4Hz, 3H), 0,89(t, 6,7Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm 135,5, 122,9, 121,3, 79,1, 70,5, 49,8, 31,65, 31,57, 29,1, 28,99, 28,97, 25,6, 22,4, 19,1, 13,9, 13,1.

Tetrafluoroboran 1-butylo-3-nonyloksymetyloimidazoliowy ^1H NMR (CDCl_3) δ ppm 8,97(t, 1,5Hz, 1H), 7,52(t, 1,8Hz, 1H), 7,50(t, 1,8Hz, 1H), 5,56(s, 2H), 4,27(t, 7,4Hz, 2H), 3,55(t, 6,4Hz, 2H), 1,92(m, 2H), 1,58(m, 2H), 1,41(m, 2H), 1,25(m, 12H), 0,98(t, 7,4Hz, 3H), 0,90(t, 6,7Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm 135,6, 122,9, 121,3, 79,2, 70,6, 49,9, 31,7, 29,3, 29,2, 29,11, 29,07, 25,7, 22,5, 19,3, 14,0, 13,2.

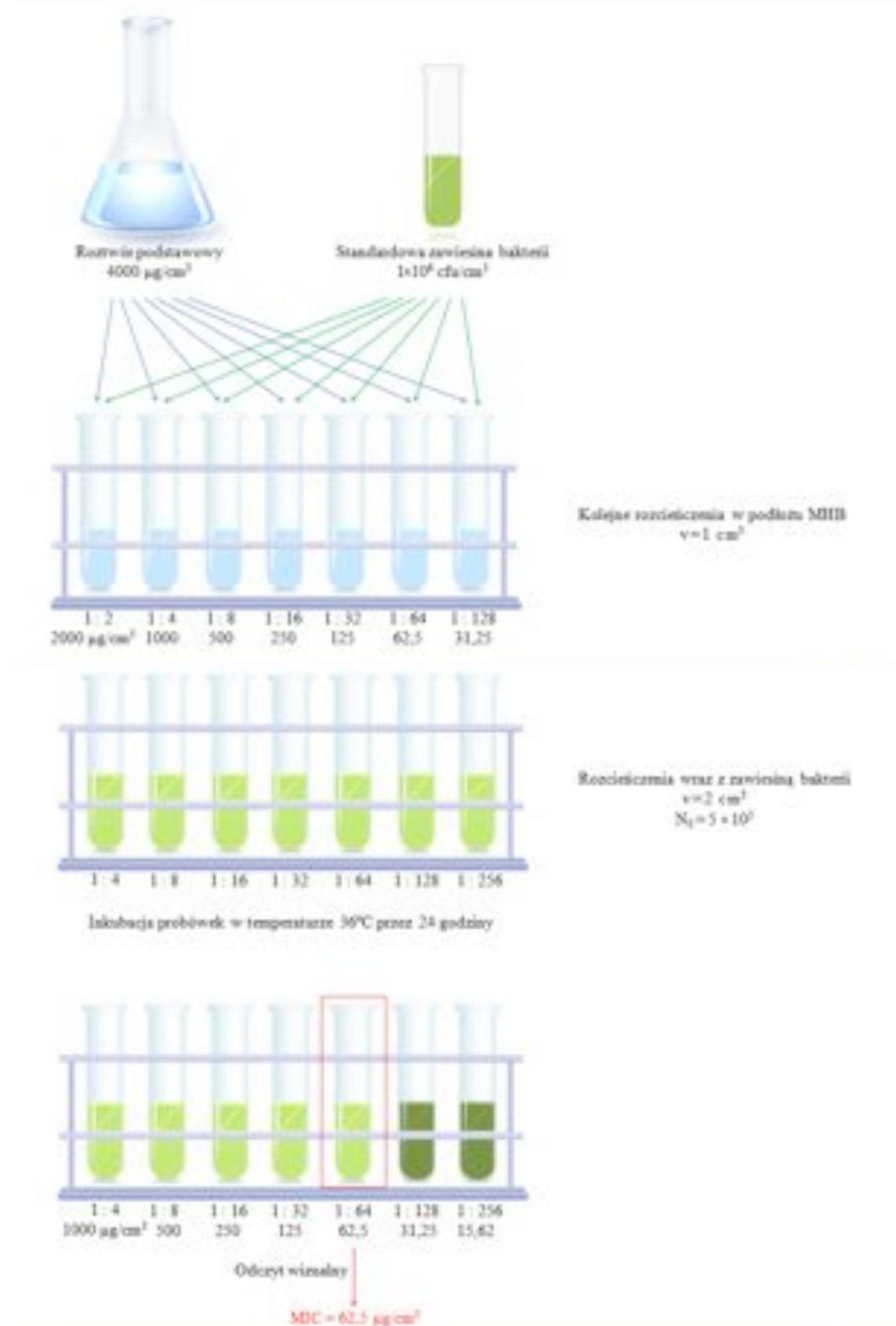
W pracy doświadczalnej wykorzystano odczynniki i rozpuszczalniki handlowe, produkcji krajowej i zagranicznej.

4.1.5. Aktywność biologiczna

Aktywność bakteriostatyczną oraz grzybostatyczną badanych związków określono metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym, wyznaczając minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost wzorcowych szczepów bakterii i grzybów oraz minimalnego stężenia biobójczego (MBC). Na rysunku 10 przedstawiono kolejne etapy postępowania w metodzie seryjnych rozcieńczeń.

Badania przeprowadzono na następujących szczepach: bakterii z rodziny pałeczek: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* NCTC 4635, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, bakterii z rodziny laseczek: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, bakterii z rodziny ziarniaków: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecium* ATCC 49474, grzybów: *Candida albicans* ATCC 10231, *Rhodotorula rubra* kolekcja Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Wszystkie szczepy były przechowywane na słupkach agarowych w temperaturze 4°C. Badania wykonano używając 24-godzinnej hodowli szczepów wzorcowych na płynnym podłożu o gęstości 2 w skali McFarlanda, rozcieńczonych w stosunku 1:1000 w 0,9% NaCl. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków wykonano na płynnych podłożach firmy bio Merieux: Mtiler-Hinton (MHB) dla bakterii i Sabourand dla grzybów. Podłoża były sterylizowane w temperaturze 117°C przez 20 minut.



Rysunek 10. Schematyczne przedstawienie seryjnych rozcieńczeń.

4.1.5.1. Określenie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC)

Przygotowano roztwór badanej cieczy jonowej o stężeniu 4 g/dm³. W kolejnym etapie wykonano szereg rozcieńczeń, który przebiegał w następujący sposób: pobierano 2 cm³ roztworu i dodawano jałowo do 2 cm³ płynnego podłoża. Po dokładnym wymieszaniu przenoszono 2 cm³ do ponownego rozcieńczania w następnej probówce z 2 cm³ podłoża. Ponownie mieszano, przenoszono 2 cm³ kolejnego rozcieńczania do następnej próbki z pożywką itd. Do każdej próbki szeregu rozcieńczeniowego dodawano 0,1 cm³ zawiesiny bakteryjnej. Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny (bakterie) lub 28-30°C przez 48 godziny (grzyby). Jako wartość MIC określano najmniejsze rozcieńczenie badanego związku, w którym nie obserwowano wzrostu drobnoustrojów.

4.1.5.2. Określenie wartości minimalnego stężenia biobójczego (MBC)

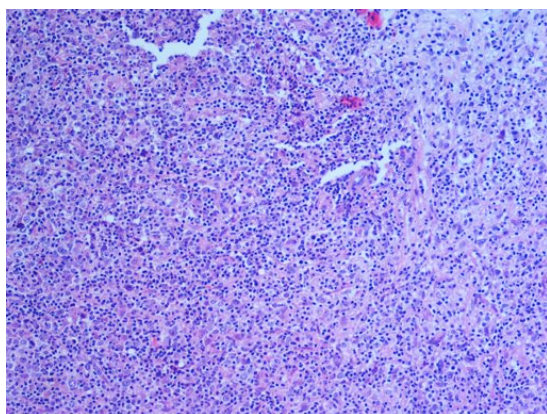
Do określenia MBC używano takich samych szczepów, jak przy ocenie MIC. Szczepy przechowywane na agarach i przesiewane raz w miesiącu. Do badania używano 22-24-godzinnych hodowli bulionowych o takich stężeniach, jak przy określaniu MIC. Bulion przygotowywano na wyciągu mięsny, dodając do 1000 cm³ wyciągu 20 g peptonu i 10 g chlorku sodu. Roztwór gotowano przez 30 minut, następnie oziębiano, uzupełniano wodą destylowaną do 1000 cm³ i doprowadzano odczyn do pH = 7,6. Bulion wyjaławiano w autoklawie w temperaturze 120°C przez 20 minut, po czym rozlewano aseptycznie do jałowych probówek w ilości 0,5 cm³ na każde 5 cm³ wodnego roztworu badanego związku. Probówki inkubowano w

temperaturze 20°C i po 5, 10 i 15 minutach pobierano z każdej próbki pełne oczko ezy standardowej, posiewając jej zawartość do próbki zawierającej 5 cm³ jałowego bulionu z odpowiednim inaktywatorem. Posiewy umieszczano w cieplarni o temperaturze 37°C i inkubowano przez 48 godzin (bakterie) lub w temperaturze 28-30°C przez pięć dni (grzyby). Najmniejsze rozcieńczenie badanego związku, w którym nie obserwowano rozwoju kolonii drobnoustrojów, przyjmowano, jako wartość MBC.

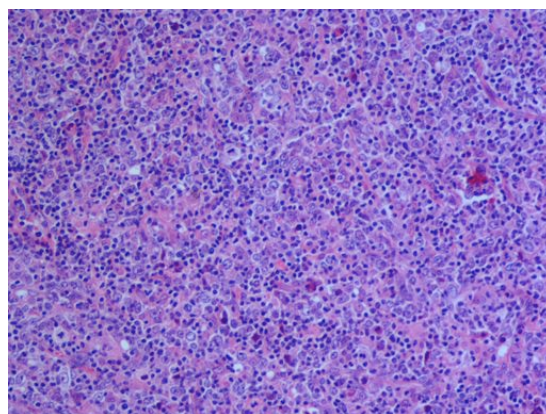
4.2. NOWOTWORY GŁOWY I SZYI

4.2.1. Materiał badawczy

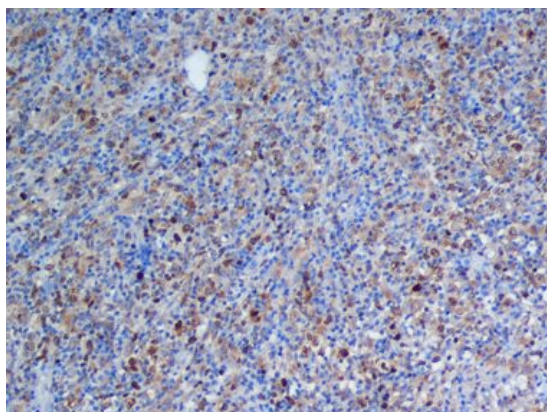
Do badań użyto materiał operacyjny pobrany od pacjentów leczonych z powodu nowotworów głowy i szyi w Katedrze i Klinice Chirurgii Szcękowo-Twarzowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zebrano 62 przypadki, z których 38 zakwalifikowano do badań porównawczych. Zdecydowaną przewagę stanowili mężczyźni w liczbie 25 przypadków; reszta – 13 przypadków – to kobiety. Średnia wieku pacjentów, od których pobrano materiał badawczy, wynosiła 56 lat. Granica wieku rozciągała się od 26 do 95 roku życia. Najstarszym pacjentem była 95 letnia pacjentka z guzem litym wielkości 4 cm, u której w badaniu histopatologicznym rozpoznano *Lymphoma malignum diffusum macrocellulare* (wg WHO – diffuse large B-cell lymphoma, anaplastic variant). Zestawienie porównawcze materiału tej pacjentki przedstawiono poniżej:



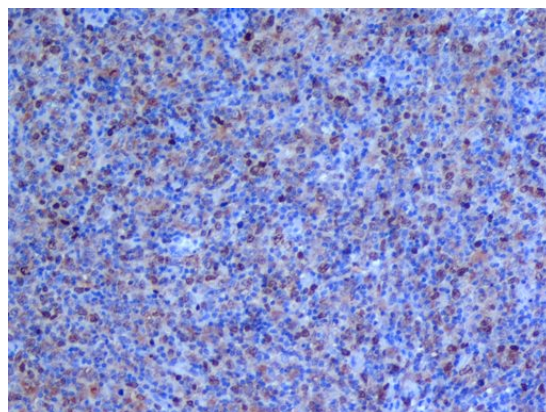
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: H&E,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: H&E,
Powiększenie: 10x.

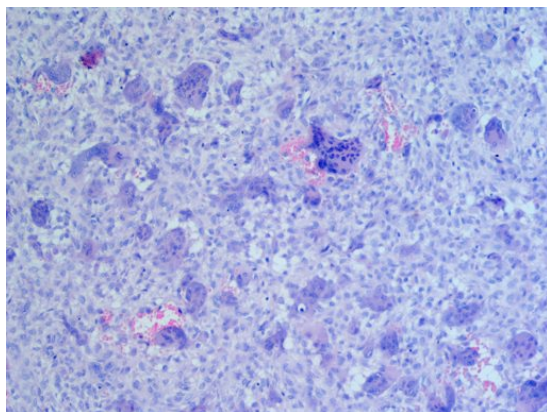


Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

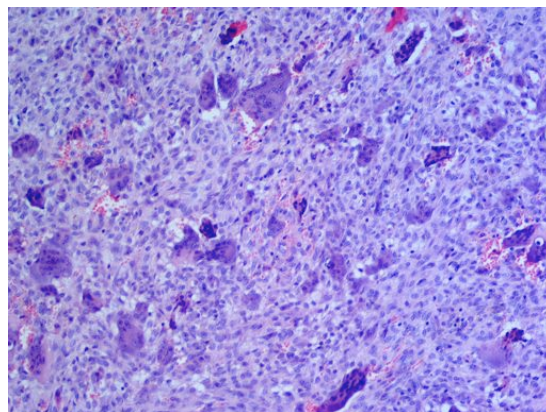


Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Najmłodszym pacjentem była natomiast 26 letnia pacjentka, u której w badaniu histopatologicznym rozpoznano *Granuloma gigantocellulare* – zestawienie porównawcze badanego materiału przedstawiono poniżej:



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: H&E,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: H&E,
Powiększenie: 10x.

Z zebranego materiału wybrano: 30 przypadków raka płaskonabłonkowego, 1 przypadek chłoniaka złośliwego, 1 przypadek sarkomatycznej postaci raka płaskonabłonkowego, 1 przypadek gruczolakoraka, 1 przypadek gruczolaka

wielopostaciowego, 1 przypadek raka podstawnkomórkowego, 1 przypadek włókniakomięsa szczęki oraz 1 przypadek włókniakowatości.

Przeprowadzone badania miały charakter porównawczy i były prowadzone *in vitro*. Grupę kontrolną stanowił materiał utrwalony w 10% buforowanym roztworze formaliny, a grupę badaną materiał utrwalony w wybranej cieczy jonowej. Utrwalony materiał został następnie poddany rutynowym badaniom histologicznym, a zastosowane procedury były identyczne dla obu grup.

Przeprowadzono barwienie histochemiczne hematoksyliną i eozyną (H&E) oraz reakcje immunohistochemiczne z użyciem markerów błonowych, cytoplazmatycznych i jądrowych (panel cytokeratyn i Ki-67). Wszystkie preparaty zostały poddane ocenie histopatologicznej w mikroskopie świetlnym przez dwóch specjalistów patomorfologii.

4.2.2. Metodologia pracy badawczej

Pobrano od pacjentów materiał po opisanu był następnie skrawany w pracowni histopatologicznej, gdzie przygotowano dwa zestawy preparatów. Pierwszy zestaw stanowił podstawową grupę, która była oceniana przez patomorfologa w celu diagnostyki przesłanej zmiany. Drugi zestaw to materiał przeznaczony do badania, w którym wyróżniono grupę kontrolną utrwaloną w 10% roztworze buforowanej formaliny i grupę badaną utrwalaną w cieczy jonowej.

Po utrwaleniu badany materiał płukano, a następnie odwadniano. Proces odwadniania polegał na przeprowadzeniu materiału przez szereg wodnych roztworów alkoholi o stopniowo wzrastających stężeniach (np. 50, 70, 80, 90%). Płukanie

bezwodnym alkoholem absolutnym było wykonywane dwukrotnie. Kolejnym etapem było przepojenie materiału płynem pośrednim. W tym celu użyto roztworów ksylenu.

Tak przygotowane tkanki umieszczono w roztworze płynu pośredniego i parafiny (w stosunku 1:1), w temperaturze 37°C, w celu wstępnego wprowadzenia parafiny do tkanki. Następnie materiał przeprowadzono przez dwie zmiany czystej parafiny, w celu usunięcia pozostałych, śladowych ilości płynu pośredniego. Po przepojeniu tkanki parafiną, badany materiał zatapiano w kostkach parafinowych, które następnie oziębiano w zimnej wodzie.

Po zespoleniu się parafiny uzyskane bloczki skrawano na mikrotomie saneczkowym. Uzyskane wstęgi skrawków grubości 3 µm wstępnie rozprostowywano na powierzchni wody ogrzanej do temperatury 40°C i naklejano na szkiełka podstawowe SuperFrosty. Kolejnym etapem było suszenie skrawków przez jedną godzinę w temperaturze 37°C.

Przed przystąpieniem do barwienia, szkiełka podzielono na dwie grupy:

pierwsza – barwienie rutynowe H&E,

druga – badanie immunohistochemiczne.

W pierwszej grupie, przeznaczonej do barwienia H&E, najpierw usuwano parafinę poprzez płukanie w ksylenu, a następnie nawadniano tkanki, przeprowadzając je przez szereg roztworów alkoholu o coraz niższych stężeniach (90, 80, 70 oraz 50%). Ostatecznie skrawki były płukane w czystej wodzie, a następnie barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną oraz znowu płukane, tym razem w celu wypłukania niezwiązanego barwnika. Po zabarwieniu i wypłukaniu preparatów prześwietlano je i nakładano naturalną żywicę - balsam kanadyjski oraz zamykano szkiełkami nakrywkowymi. Tak przygotowane preparaty były porównywane w mikroskopie

światłym. Obraz rejestrowano kamerą cyfrową Nikon, sprzężoną z mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-E.

W drugiej grupie, przeznaczonej do badań immunohistochemicznych, nakładano przeciwciała przeciwko cytokeratynie i Ki-67. Tak przygotowane preparaty były również porównywane w mikroskopie świetlnym, a obraz był rejestrowany kamerą cyfrową Nikon, sprzężoną z mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-E.

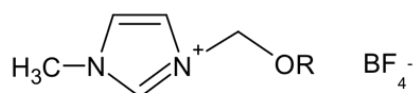
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

5.1. SYNTEZA CIECZY JONOWYCH

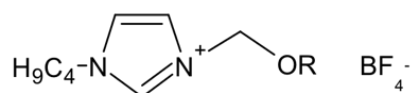
Przeprowadzone badania z następującymi cieczami jonowymi: amoniowymi, imidazoliowymi, pirydyniowymi, morfoliniowymi i fosfoniowymi wykazały, że najlepsze efekty w balsamowaniu tkanek miękkich uzyskuje się dla cieczy imidazoliowych. W grupie tej rodzaj podstawnika alkilowego przy czwartorzędowym atomie azotu wpływa na efekt balsamowania. Grupa alkoksymetylowa okazała się zdecydowanie lepsza niż grupa alkilowa.



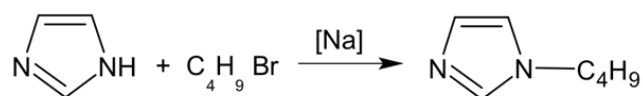
Wprowadzenie tlenu do grupy alkilowej spowodowało, że sztywny podstawnik stał się „ruchliwy” na atomie tlenu. Imidazoliowe ciecze jonowe o wzorze ogólnym



są cieczami dostępnymi w handlu (oferowane przez firmę POCH). W oparciu o dotychczasowe badania postanowiono zsyntezować nowe analogii szeregu 1-alkoksymetylo-3-metyloimidazoliowych soli. W celu zwiększenia hydrofobowości cieczy jonowej uznano za zasadne dokonanie zamiany grupy metylowej na butylową. Zaplanowane struktury cieczy jonowych można przedstawić wzorem ogólnym

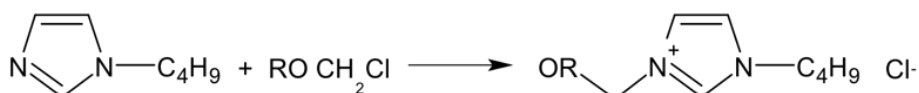


W pierwszym etapie wychodząc z imidazolu, otrzymano 1-butyloimidazol w reakcji



Deprotonizację przeprowadzono przy użyciu sodu, a następnie dodano bromek butylu. W literaturze ta reakcja jest opisywana z udziałem chlorku butylu. Zamiana chlorku na bromek okazała się trafna, ponieważ brom o większej masie molowej okazał się łatwiejszą grupą odchodzącą.

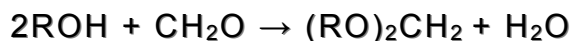
W drugim etapie syntezowany 1-butyloimidazol poddano reakcji czwartorzędowania eterem chlorometyloalkilowym



Wychodząc z substratów niejonowych, powstała ciecz jonowa. Eter chlorometyloalkilowy otrzymano w reakcji chlorometylowania liniowych alkoholi o różnych podstawnikach alkilowych



jednocześnie w kolbie reakcyjnej zachodziła reakcja uboczna



z utworzeniem acetalu dialkilowego formaldehydu.

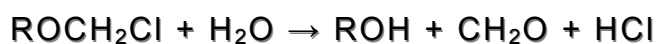
Zsyntezowane etery zestawiono w tabeli 3. Wydajność reakcji była wysoka i przekraczała 90%. W tabeli 3 podano również czystość eteru w produkcie reakcji.

Pozostałość do 100% stanowił produkt uboczny acetal dialkilowy, który jest niereaktywny chemicznie.

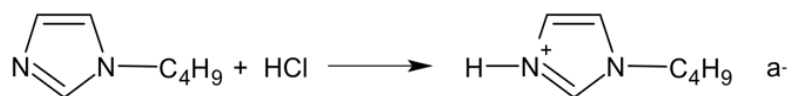
Tabela 3. Zsyntezowane etery chlorometyloalkilowe (ROCH₂Cl).

Eter	R	Wzór sumaryczny	Masa molowa [g/mol]	Wydajność [%]	Czystość [%]
1	C ₃ H ₇	C ₄ H ₉ ClO	108,56	90	95
2	C ₄ H ₉	C ₅ H ₁₁ ClO	122,59	91	96
3	C ₅ H ₁₁	C ₆ H ₁₃ ClO	136,61	92	95
4	C ₆ H ₁₃	C ₇ H ₁₅ ClO	150,64	91	95
5	C ₇ H ₁₅	C ₈ H ₁₇ ClO	164,67	93	96
6	C ₈ H ₁₇	C ₉ H ₁₉ ClO	178,69	91	97
7	C ₉ H ₁₉	C ₁₀ H ₂₁ ClO	192,72	93	98
8	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₁ H ₂₃ ClO	206,75	95	97
9	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₂ H ₂₅ ClO	220,77	96	97
10	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₃ H ₂₇ ClO	234,80	96	98

Reakcję czwartorzędowania prowadzono w warunkach bezwodnych, ze względu na łatwość hydrolizy wyjściowego eteru



Mogący powstać HCl reagowałby natychmiast z anionem,



dając chlorowodorek.

W tabeli 4 zestawiono zsyntezowane chlorki 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowe. Wydajność reakcji była wysoka i przekraczała 90%. Otrzymano higroskopijne chlorki, które uznano za prekursorsy cieczy jonowych.

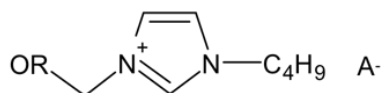


Tabela 4. Zsyntezowane sole imidazoliowe.

Sól	R	A	Wydajność [%]	IL	R	A	Wydajność [%]
1	C ₃ H ₇	Cl	90	11	C ₃ H ₇	BF ₄	95
2	C ₄ H ₉	Cl	91	12	C ₄ H ₉	BF ₄	95
3	C ₅ H ₁₁	Cl	92	13	C ₅ H ₁₁	BF ₄	96
4	C ₆ H ₁₃	Cl	92	14	C ₆ H ₁₃	BF ₄	97
5	C ₇ H ₁₅	Cl	94	15	C ₇ H ₁₅	BF ₄	98
6	C ₈ H ₁₇	Cl	95	16	C ₈ H ₁₇	BF ₄	99
7	C ₉ H ₁₉	Cl	96	17	C ₉ H ₁₉	BF ₄	98
8	C ₁₀ H ₂₁	Cl	96	18	C ₁₀ H ₂₁	BF ₄	99
9	C ₁₁ H ₂₃	Cl	97	19	C ₁₁ H ₂₃	BF ₄	98
10	C ₁₂ H ₂₅	Cl	98	20	C ₁₂ H ₂₅	BF ₄	99

Na etapie trzecim prekursor poddano reakcji wymiany anionu chlorkowego na tetrafluoroboranowy.



Reakcja zachodziła w wodzie z wydajnością powyżej 95%. Otrzymane tetrafluoroborany były na tyle hydrofobowe, że wypadły z wody. Produkt uboczny chlorek sodu został usunięty przez rozpuszczenie osuszonego produktu w bezwodnym acetonie. Otrzymano nowe ciecze jonowe (zestawione w tabeli 4), których struktury oznaczono za pomocą widm protonowych i węglowych magnetycznego rezonansu jądrowego. Opis wykonania syntez zamieszczono w podrozdziale 4.1. natomiast widma protonowe i węglowe zamieszczono w aneksie 2.

5.1.1. Wybór cieczy jonowej

Syntezy były prowadzone w skali 0,1 mola. Po selekcji działania balsamującego, wybrano dwie imidazoliowe ciecze jonowe do dalszych badań. Tetrafluoroboran 1-metylo-3-oktyloksymetloimidazoliowy zakupiono w firmie POCH, a tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy syntezowano w skali 1 mola. Wszystkie syntezy wykonano w laboratorium specjalistycznym zlokalizowanym w Zakładzie Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Merytoryczną opiekę nad prowadzonymi badaniami sprawował dr Józef Węglewski.

5.2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA TETRAFLUOROBORANÓW 3-ALKOKSYMETYLO-1-BUTYLOIMIDAZOLIOWYCH

Tetrafluoroborny 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowe są znanymi związkami, a ich właściwości mikrobiologiczne są opisane [61]. Wyznaczone wartości MIC i MBC dla cytowanego szeregu są niskie, co wskazuje na wyjątkowo wysoką aktywność wobec bakterii i grzybów.

Tetrafluoroborany 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowe są nowymi związkami, dlatego też postanowiono wyznaczyć ich aktywność mikrobiologiczną. Korzystając z metodologii opracowanej przez dr Ilonę Mirską z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, wyznaczono wartości MIC i MBC dla chlorków i tetrafluoroboranów. Wartości liczbowe zestawiono w tabelach 5 i 6. Materiał ten wskazuje, że zarówno prekursorzy, jak i badane ciecze jonowe wykazują słabą aktywność biologiczną. W porównaniu z wartościami MIC i MBC dla tetrafluoroboranu 1-metylo-3-oktyloksymetyloimidazoliowego (tabela 6), przedstawiciela szeregu tetrafluoroboranu 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowego są to ciecze jonowe praktycznie nieaktywne wobec badanych mikroorganizmów.

Zamiana grupy metylowej na butylową poprawiła właściwości hydrofobowe imidazoliowej cieczy jonowej jednocześnie zahamowała aktywność wobec drobnoustrojów. Obserwowana zależność aktywności biologicznej od budowy kationu i rodzaju anionu [61] została potwierdzona. Wymiana anionu chlorkowego na tetrafluoroboranowy nie wpłynęła na zmianę aktywności biologicznej, która zależy jedynie od wielkości kationu.

Tabela 5. Wyznaczone wartości MIC^a i MBC^a dla chlorków 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowych

Szczep testowy		Chlorki								
		12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Micrococcus luteus</i>	MIC	250	62	31	8	2	2	2	1	0,5
	MBC	250	125	125	31	8	8	4	2	1
<i>Staphylococcus ureus</i>	MIC	500	>500	>500	500	250	125	125	62	8
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	62
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIC	250	250	125	62	31	16	16	8	2
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	31
<i>Enterococcus faecium</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	500	250	125	62
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	250	125
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MIC	250	500	250	125	62	31	31	16	4
	MBC	500	>500	>500	62	125	125	31	31	4
<i>Escherichia coli</i>	MIC	250	500	250	125	62	31	16	8	4
	MBC	250	500	250	125	62	62	16	16	8
<i>Serratia marcescens</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	250
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<i>Proteus vulgaris</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC	>500	>500	>500	250	250	250	125	125	62
	MBC	>500	>500	>500	250	250	250	125	125	62
<i>Candida albicans</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	500	125
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
<i>Rhodotorula rubra</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	250	125
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	250

^a w ppm.

Tabela 6. Wyznaczone wartości MIC^a i MBC^a dla tetrafluoroboranów 3-alkoksymetylo-1-bu-tyloimidazoliowych

Szczep testowy		Ciecze jonowe									C ₈ mim ^b
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	
<i>Micrococcus luteus</i>	MIC	250	62	31	8	2	2	2	1	0,5	0,25
	MBC	250	250	125	31	8	8	4	2	1	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	500	>500	>500	500	125	125	125	62	8	0,25
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	62	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIC	250	125	125	31	31	16	16	8	2	0,13
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	125	31	0,25
<i>Enterococcus faecium</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	500	250	125	62	-
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	250	125	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MIC	250	250	250	62	62	31	31	31	4	-
	MBC	500	500	500	62	125	125	31	16	4	-
<i>Escherichia coli</i>	MIC	250	250	250	125	31	31	16	16	4	1
	MBC	250	250	250	125	31	31	16	31	8	2
<i>Serratia marcescens</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	250	-
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	-
<i>Proteus vulgaris</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	1
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	1
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	2
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC	>500	>500	>500	250	250	250	125	125	62	-
	MBC	>500	>500	>500	250	250	250	125	125	62	-
<i>Candida albicans</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	500	125	0,5
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	1
<i>Rhodotorula rubra</i>	MIC	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	250	250	0,5
	MBC	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	250	1

^aw ppm; ^btetrafluoroboran 1-metylo-3-oktyloksymetyloimidazoliowy [55].

5.3. WŁAŚCIWOŚCI BALSAMUJĄCE

Balsamowanie to zabieg polegający na zabezpieczeniu narządów przed postępującymi przemianami pośmiertnymi. Pierwsze doniesienia dotyczące balsamowania datowano na około 3000 lat p.n.e. Przez lata uważano, iż prekursorami w tej dziedzinie byli Egipcjanie, którzy używali do balsamowania sody oczyszczonej, ziół oraz soli o różnych stężeniach. Przeprowadzone przez prof. Bernardo Arriaza badania na mumiach południowoamerykańskich, ludu Chinchorro wykazały, że są one starsze od mumii egipskich o co najmniej 2000 lat. Wiek najstarszej mumii, obliczony na podstawie rozkładu izotopu promieniotwórczego, w metodzie datowania radiowęglowego, określono na 5050 lat p.n.e. [112].

W średniowieczu najpopularniejszym środkiem do balsamowania był alkohol etylowy, zioła i skrawki materiału nasączone smołą lub woskiem. W XVI wieku do balsamowania stosowano mieszaniny składające się z soli rtęci, terpentyny, alkoholu etylowego, kamfory, olejku lawendowego i soli kuchennej [113]. Natomiast w XVII wieku płyny balsamujące zawierały metale ciężkie, takie jak arsenik, ołów, miedź, które przez wiele lat były jedyną uznaną metodą utrwalania tkanek. Od 1868 roku najpopularniejszym środkiem balsamującym, stał się wodny roztwór formaldehydu.

Formalina jest związkiem bakteriobójczym i niebezpiecznym dla środowiska. Biodegradacja tego związku jest długotrwała, a opary, które są uwalniane podczas pracy z jej roztworami, są niezmiernie niebezpieczne dla zdrowia. Przez wiele lat nie zdawano sobie sprawy z wysokiej toksyczności formaliny. Obecnie wiadomo, że bezpośredni kontakt z tym prostym aldehydem lub jego oparami może doprowadzić do rozwoju poważnych chorób, takich jak nowotwory górnych dróg oddechowych

czy białaczki [114]. Wiele ośrodków na całym świecie prowadzi badania nad zamiennikami formaliny, takimi jak roztwory wodne: aldehydu glutarowego i formaldehydu oraz metanol, etanol i aceton [115]. Pomimo wciąż prowadzonych badań nie udało się zsyntetyzować takiego związku, który byłby idealnym zamiennikiem formaliny.

Idealny środek balsamujący posiada szereg właściwości fizykochemicznych takich jak, np.: balsamuje, czyli utrwala materiał biologiczny przez równomierną i szybką penetrację, utrwala tkanki miękkie jak i tkanki twarde, jest nietoksyczny w miejscu pracy i nieszkodliwy dla środowiska naturalnego, a także łatwo ulega utylizacji.

Wydaje się, że idealnym utrwalczem jest użyty tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy. Posiada wszystkie wyżej wymienione cechy oraz szereg dodatkowych. Zaliczamy do nich: niską prężność par, dzięki czemu nie paruje, a tym samym nie stwarza zagrożenia w środowisku pracy; jest łatwo degradowalny i nie zalega w środowisku. Nie obkurcza tkanek miękkich, a zarazem prezerwuje tkanki twarde, co zostało po raz pierwszy opisane w 2010 roku [116]. Materiał utrwalony w tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowym zachowuje naturalny kolor tkanki, która nie blednie tak, jak ta utrwalona w 10% roztworze buforowanej formaliny. Zarejestrowane zmiany makroskopowe w trakcie procesu balsamowania zestawiono w tabeli 7. Ponadto wybrany tetrafluoroboran może być wielokrotnie recyklingowany i wykorzystywany w celu utrwalania materiału biologicznego bez konieczności przestrzegania objętości potrzebnej do utrwalenia danej wielkości tkanki. Wystarczy, że balsamowany materiał będzie całkowicie zanurzony w cieczy jonowej. Długoterminowe

przechowywanie preparatów w wybranej cieczy jonowej, jako eksponaty medyczne, jest również możliwe.

Tabela 7. Porównawcze zestawienie zmiany w trakcie utrwalania tkanki w 10% roztworze formaliny i tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowymi

Rodzaj utrwalacza	Czas	Barwa tkanki	Obkurczenie materiału	Barwa utrwalacza	Objętość utrwalacza
tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy	30 min	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	1 godzina	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	1,5 godziny	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	2 godziny	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	4 godziny	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	12 godzin	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	24 godziny	bez zmian	brak	bez zmian + osad	bez zmian
	1 rok	bez zmian	brak	bez zmian + osad	bez zmian
	5 lat	bez zmian	brak	bez zmian + osad	bez zmian
10% roztwór formaliny	30 min	bez zmian	brak	bez zmian	bez zmian
	1 godzina	zblednięcie	brak	bez zmian	bez zmian
	1,5 godziny	zblednięcie	brak	bez zmian	bez zmian
	2 godziny	zblednięcie	brak	bez zmian	bez zmian
	4 godziny	szara	nieznaczne	bez zmian	bez zmian
	12 godzin	szara	zauważalne	bez zmian	bez zmian
	24 godziny	szara	zauważalne	bez zmian	bez zmian
	1 rok	szara	zauważalne	bez zmian	zmniejszona
	5 lat	szara	zauważalne	bez zmian	zmniejszona

*osad – luźne fragmenty tkanki, które uległy oddzieleniu od materiału badanego.

5.4. BADANIA PATOMORFOLOGICZNE NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI

5.4.1. Typy histologiczne zmian

W badaniach porównawczych użyto materiał pobrany od 38 pacjentów leczonych z powodu nowotworów głowy i szyi. Materiał został utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny i wybranej cieczy jonowej (tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy). Na podstawie przeprowadzonych badań histopatologicznych ustalono ostateczne rozpoznanie dla wszystkich zebranych przypadków. W tabeli 8 zestawiono płeć pacjenta, wiek w chwili pobrania materiału, rodzaj nowotworu oraz jego stopień złośliwości.

Tabela 8. Charakterystyka analizowanych przypadków nowotworów głowy i szyi.

Lp	♀	♂	Wiek	Rodzaj nowotworu	Stopień
1	0	1	49	<i>Fibrosarcoma maxille</i>	
2	1	0	26	<i>Granuloma gigantocellulare</i>	
3	0	1	59	<i>Carcinoma planoepitheliale akeratodes</i>	G2
4	0	1	58	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
5	0	1	59	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
6	0	1	51	<i>Fibromatosis</i>	
7	0	1	60	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
8	1	0	66	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G2
9	1	0	69	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
10	1	0	70	<i>Carcinoma planoepitheliale akeratodes</i>	G2
11	0	1	50	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
12	1	0	95	<i>Lymphoma malignum diffusum macrocellulare</i>	
13	1	0	59	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
14	0	1	47	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G1
15	0	1	48	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
16	1	0	62	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G2
17	0	1	60	<i>Carcinoma planoepitheliale akeratodes</i>	G3
18	0	1	62	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
19	0	1	57	<i>Carcinoma planoepitheliale akeratodes</i>	G1
20	0	1	50	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
21	0	1	54	<i>Adenocarcinoma papillare</i>	G1
22	1	0	57	<i>Carcinoma planoepitheliale fusocellulare</i>	G3
23	0	1	60	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
24	0	1	36	<i>Carcinoma planoepitheliale akeratodes</i>	G2
25	0	1	71	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
26	0	1	57	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
27	1	0	64	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
28	0	1	52	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G2
29	1	0	50	<i>Adenoma pleomorphum (utkanie gruczolaka)</i>	
30	0	1	61	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
31	0	1	57	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
32	1	0	33	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G2
33	0	1	53	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i>	G2
34	1	0	32	<i>Ameloblastoma cysticum</i>	
35	0	1	60	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G1
36	0	1	39	<i>Carcinoma planoepitheliale akeratodes</i>	G2
37	1	0	83	<i>Carcinoma basocellulare</i>	
38	0	1	58	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i>	G2

5.4.2. Badania porównawcze materiału utrwalonego w cieczy jonowej i formalinie

5.4.2.1. Opis wybranych przypadków nowotworów głowy i szyi

Przypadek 1. Rak płaskonabłonkowy rogowaciejący (*carcinoma planoepitheliale keratodes*)

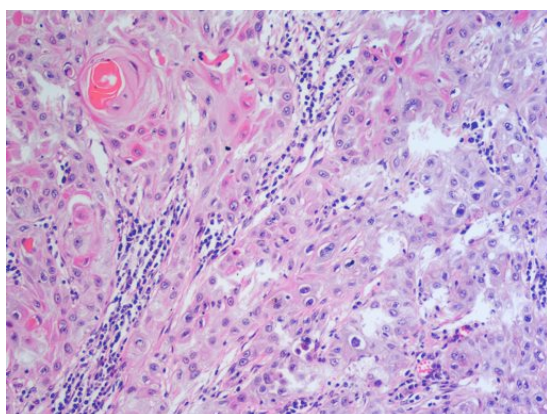


Fotografia 1. Guz języka, 66 letniej pacjentki, przed zabiegiem chirurgicznym.

Pacjentka Elżbieta Ł., lat 66, została przyjęta do szpitala z powodu dużej zmiany na języku, umiejscowionej po stronie prawej i przekraczającej linię symetrii. Zmiana zlokalizowana była w 1/3 środkowej części języka, wielkości 2,8 cm szerokości i 3,3 cm długości, wyniosła nad jego powierzchnię z pępkowatym wciągnięciem i owrzodzeniem w części centralnej. W badaniu klinicznym stwierdzono znaczne naciekanie mięśni oraz powiększone węzły chłonne po stronie

prawej. W wywiadzie pacjentka podała brak dolegliwości bólowych, a jedynie skarżyła się na utrudnioną mowę. Bezpośrednią przyczyną rozwoju choroby było palenie papierosów. Wykonano hemiglosektomię wraz z usunięciem węzłów chłonnych. Pobrany materiał został przesłany do pracowni histopatologicznej w celu dalszej diagnostyki.

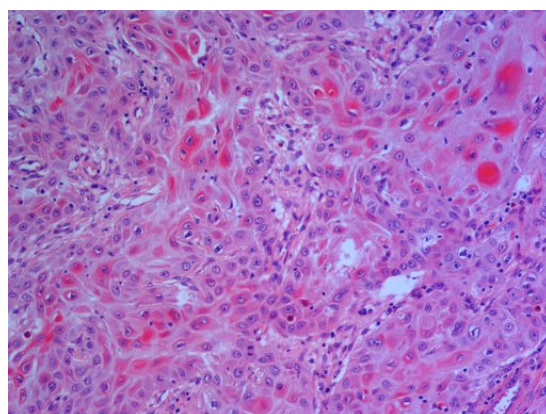
Przygotowano preparaty, które następnie utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny – grupa kontrolna, oraz w cieczy jonowej – grupa badana. Po okresie utrwalania wykonano skrawki, które następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,

Barwienie: H+E,

Powiększenie: 10x.

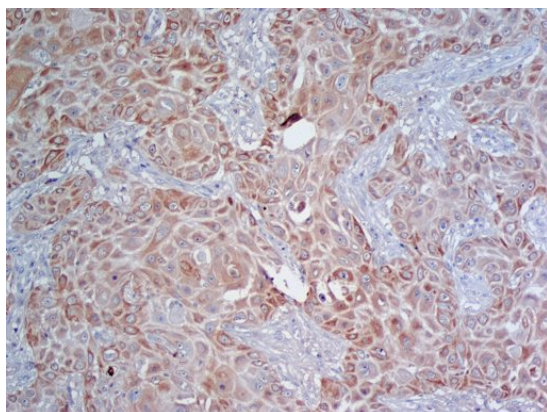


Utrwalacz: ciecz jonowa,

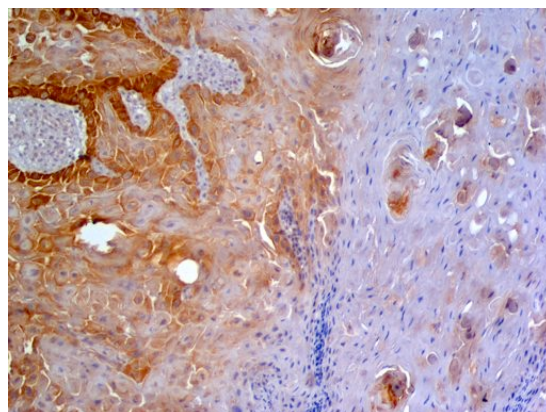
Barwienie: H+E,

Powiększenie: 10x.

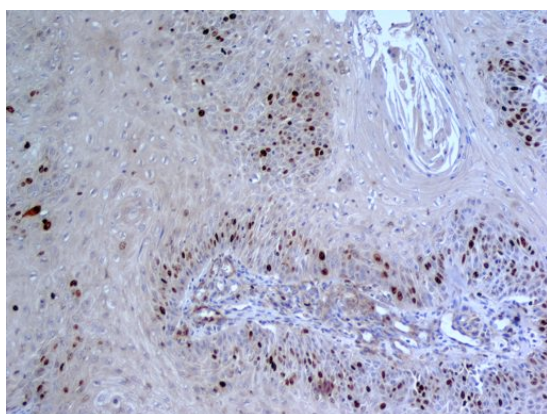
Przeprowadzono badanie immunohistochemiczne z użyciem CK i Ki67.



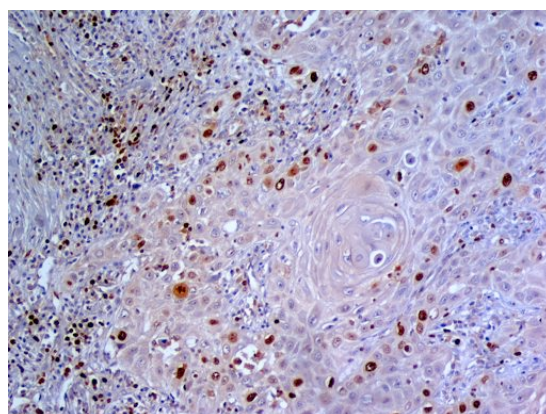
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Wyniki badania histopatologicznego był następujący:

Metastases carcinomatosae in lymphnodis - carcinoma
planoepitheliale keratodes G2 /mat. I/.

Carcinoma planoepitheliale keratodes. G2.

Material usunięty w granicach zdrowych tkanek /mat. II/.
Naevus pigmentosus intradermalis partim iunctionalis.
Excisio completa /mat. III/.

Na podstawie analizy porównawczej obrazu mikroskopowego stwierdzono, iż materiał utrwalony w tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowym posiada intensywniejsze kolory niż materiał utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny, co wykazano we wszystkich trzech typach barwienia. Szczególnie intensywnie wybarwiły się perły rogowe, które posiadają intensywny karmazynowy kolor, natomiast komórki nacieku zapalnego wybarwiły się na intensywny niebieski kolor.

Ponadto oba utrwalacze wykazują prawidłowy stopień utrwalenia materiału badanego, co widać w postaci jednolitego wybarwienia i prawidłowego zachowania struktur komórkowych. Dodatkowo materiał utrwalony w cieczy jonowej wykazuje mniejszy stopień obkurczenia komórek w porównaniu z materiałem utrwalonym w formalinie.

Badania immunohistochemiczne potwierdziły obecność nowotworu w badanym materiale, a reakcja barwna (DAB) dla przeciwciał przeciwko CK i Ki-67 jest intensywniejsza w przypadku materiału utrwalonego w badanym tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowym.

Przypadek 2. Rak płaskonabłonkowy częściowo rogowaciejący (*carcinoma planoepiteliale partim keratodes*)

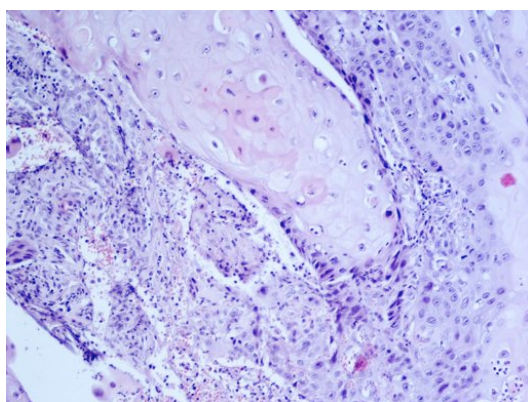


Fotografia 2. Pacjent, lat 57, z guzem języka i dna jamy ustnej, przed zabiegiem chirurgicznym.

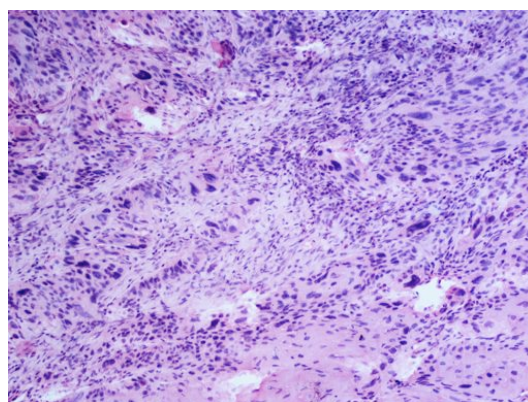
Pacjent Bogusław W., lat 57, został przyjęty do szpitala z powodu dużej zmiany zlokalizowanej na dnie jamy ustnej i przechodzącej na prawą stronę języka. Zmiana na języku zlokalizowana była na prawym brzegu w jego części przedniej. Klinicznie wielkość guza była trudna do ustalenia ze względu na znaczny obrzęk tkanek. W badaniu klinicznym stwierdzono znaczne naciekanie mięśni oraz powiększone węzły chłonne po stronie prawej. W wywiadzie pacjent nie zgłaszał dolegliwości bólowych. Mowę miał utrudnioną i niewyraźną. Pacjent przyznał, że od 18 roku życia pali papierosy (około 1 paczki dziennie) oraz nadużywa alkoholu. Przeprowadzono rozległy zabieg chirurgiczny, w trakcie którego wykonano hemiglosektomię wraz z usunięciem fragmentu zuchwy i węzłów chłonnych.

Pobrano materiał został przesłany do pracowni histopatologicznej w celu dalszej diagnostyki.

Przygotowano dwa zestawy preparatów, które następnie utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny – grupa kontrolna, oraz w cieczy jonowej – grupa badana. Po okresie utrwalania wykonano skrawki, które następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną.

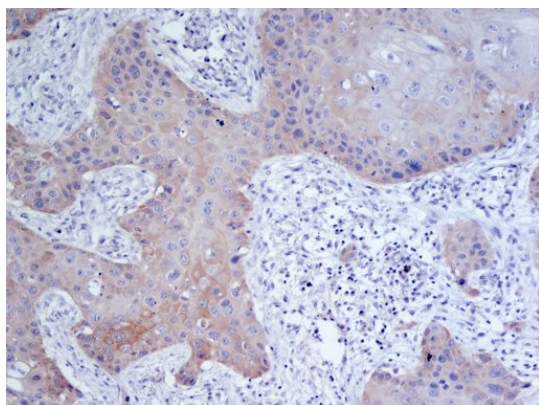


Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

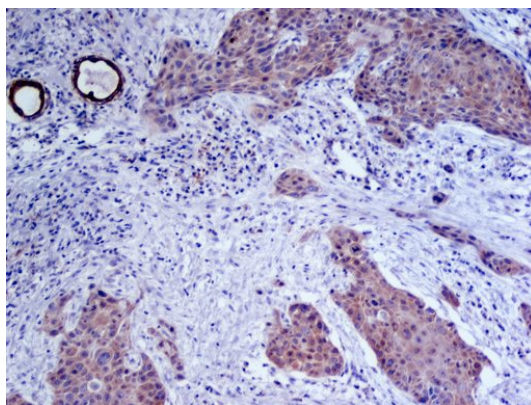


Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

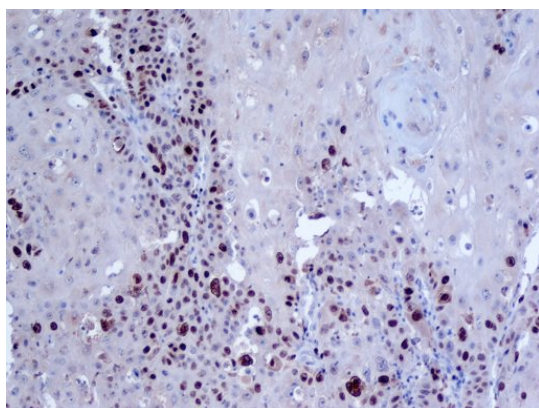
Następnie przeprowadzono badanie immunohistochemiczne z użyciem markerów przeciwko cytokeratynie CK oraz przeciwciał monoklonalnych Ki-67.



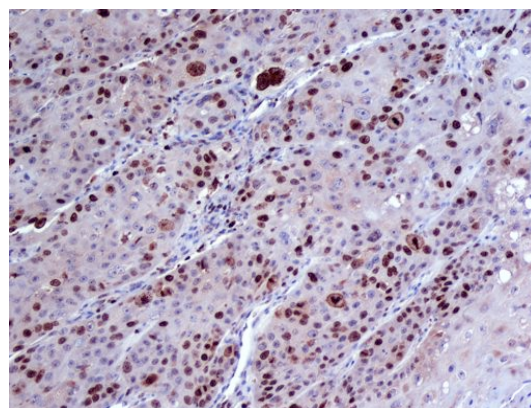
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Wyniki badania histopatologicznego był następujący:

Carcinoma planoepitheliale partim keratodes G2 /mat. I/.

Metastase carcinomatosae in lymphonodis/mat. II/.

Materiał utrwalony w wybranym tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentylodimetyloimidazoliowym posiada intensywniejsze kolory niż materiał utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny. W badaniu immunohistochemicznym reakcja barwna dla przeciwciała przeciwko Ki-67 jest intensywniejsza w przypadku materiału utrwalonego w badanej cieczy jonowej. Ponadto komórki wraz z jądrami w trakcie podziału są mniej obkurczone i łatwiejsze do identyfikacji.

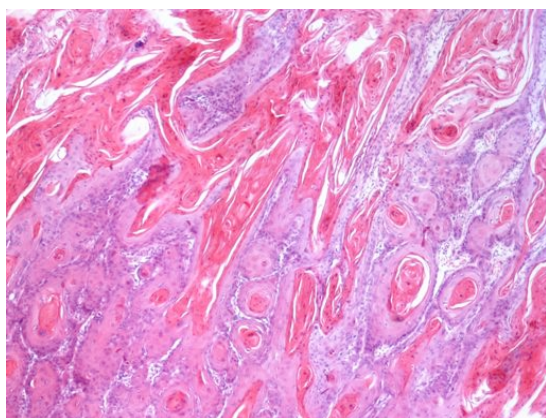
Porównawcza ocena grupy kontrolnej względem grupy badanej wykazała prawidłowy stopień penetracji i utrwalenia materiału badanego.

Przypadek 3. Rak płaskonabłonkowy rogowaciejący (*carcinoma planoepitheliale keratodes*)



Fotografia 3. Pacjent, lat 60, z guzem okolicy trójkąta zatrzonowcowego, po stronie prawej.

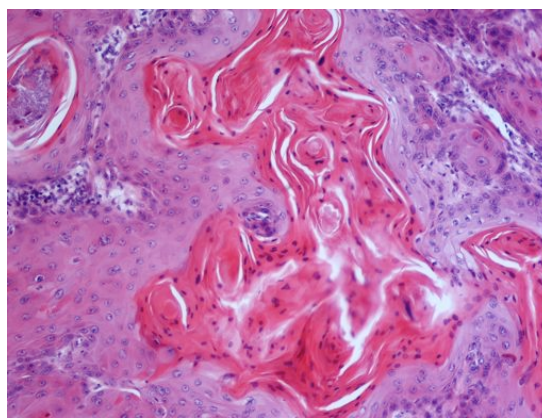
Pacjent Jan L., lat 60, został przyjęty do szpitala z powodu zmiany wielkości 4,0 cm w okolicy prawego trójkąta zatrzonowcowego o charakterze rozrostowym, wypukły o brodawkowatej powierzchni. W badaniu klinicznym stwierdzono nacieczenie wyrostka zębodołowego po stronie prawej oraz rozlaną zmianę na powierzchni policzka w wielkości około 3,0 cm. Węzły chłonne po stronie prawej powiększone, niebolesne i nieprzesuwalne względem podłoża. W wywiadzie pacjent podał, że zmiana znajdowała się pod protezą i nie bolała. Zgłosił się do lekarza stomatologa w celu dopasowania luźnej protezy. Pacjent nie pali, a alkohol spożywa okazjonalnie. Przeprowadzono rozległy zabieg chirurgiczny, w trakcie którego wycięto fragment żuchwy w wielkości 11,0 x 7,0 x 6,0 cm z towarzyszącą błoną śluzową, tkankami miękkimi wraz z fragmentem migdałka, ślinianką podżuchwową oraz cztery węzły chłonne, z których największy miał średnicę 2,5 cm. Pobrany materiał został przesłany do pracowni histopatologicznej w celu dalszej diagnostyki. Przygotowano preparaty, które następnie utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny – grupa kontrolna, oraz w cieczy jonowej – grupa badana. Po okresie utrwalania wykonano skrawki, które następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,

Barwienie: H+E,

Powiększenie: 10x.

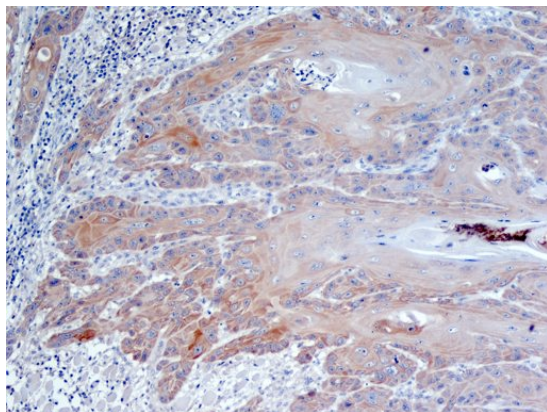


Utrwalacz: ciecz jonowa,

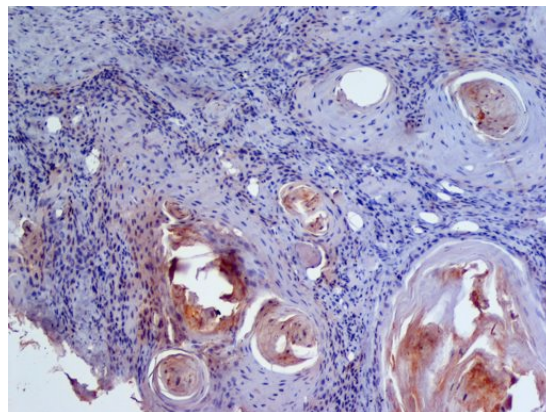
Barwienie: H+E,

Powiększenie: 10x.

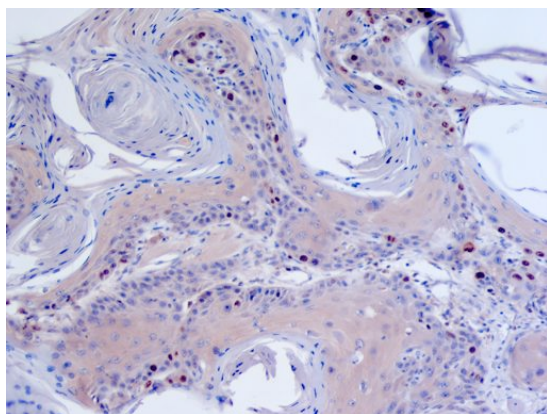
Następnie przeprowadzono badanie immunohistochemiczne z użyciem ocenianych markerów.



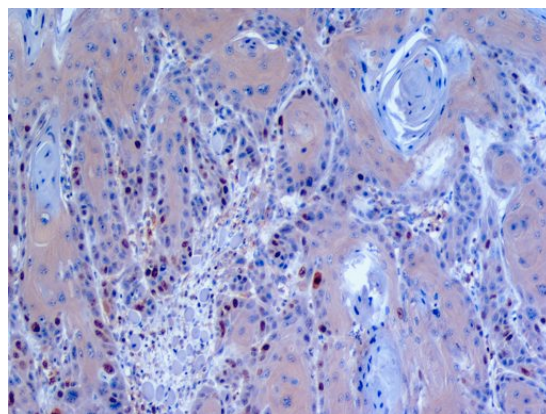
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Wyniki badania histopatologicznego był następujący:

Carcinoma planoepitheliale keratodes G2.

Zmiana usunięta w granicach tkanek niezmiennych – najmniejszy margines zdrowych tkanek wynosi 0,8cm (margines tylny) i 0,5cm (margines boczny).

W towarzyszących dwóch węzłach chłonnych wykładniki reaktywnego pobudzenia (hyperplasia follicularis). W utkaniu migdałka zwracają uwagę poszerzone krypty zawierające kolonie Promieniowca promienicy.

Ślinianka podżuchwowa oraz drobne gruczoły ślinowe z wykładnikami przewlekłego zapalenia oraz zanikiem włóknistym i tłuszczakowatym. /mat. III -guz żuchwy/

Hyperplasia follicularis et sinus histiocytosis in lymphonodis No 2 /mat. I węzeł chłonny, piętro górne/

Metastasis carcinomatosa in uno lymphonodo.

Hyperplasia follicularis et sinus histiocytosis in uno lymphonodo. /mat. II węzły chłonne/

Porównawcza ocena mikroskopowa materiału utrwalonego w tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowym i 10% roztworze buforowanej formaliny posiada wykazała zdecydowane różnice w rutynowym barwieniu H+E. Komórki nie są obkurczone tak jak w przypadku materiału utrwalonego w formalinie. Dodatkowo lepiej widoczny jest podział komórkowy w materiale utrwalonym w cieczy jonowej. Natomiast intensywniejsze kolory widoczne w materiale utrwalonym w wybranym tetrafluoroboranie są również obserwowane w

pozostałych typach barwień. Badanie immunohistochemiczne w reakcji barwnej przeciwko CK oprócz reakcji dodatniej obecność przeciwciał monoklonalnych przeciw cytokeratynie wykazało intensywniejsze wybarwienie komórek nacieku zapalnego w materiale utrwalonym w badanej cieczy jonowej.

Oba utrwalacze wykazują prawidłowy stopień utrwalenia badanego materiału.

Przypadek 4. Rak płaskonabłonkowy częściowo rogowaciejący (*carcinoma planoepitheliale partim keratodes*)

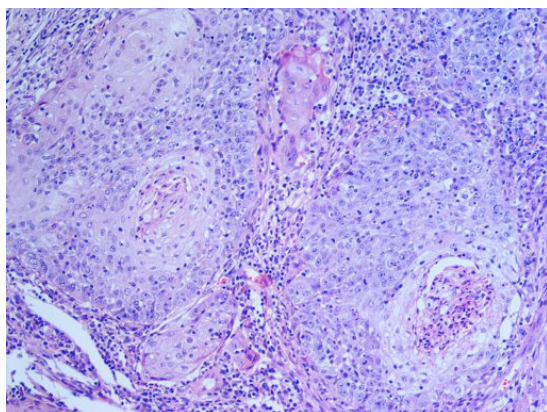


Fotografia 4. Pacjent, lat 62, guz żuchwy po stronie lewej, sytuacja po pobraniu wycinka diagnostycznego.

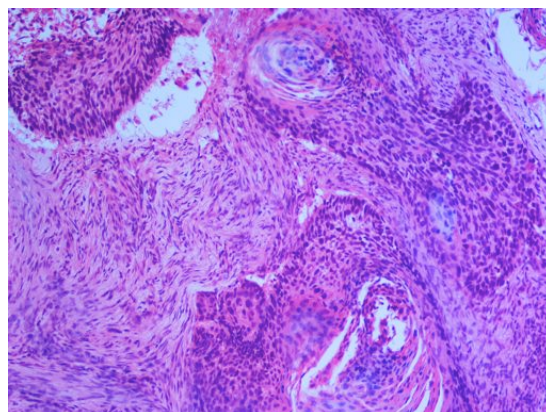
Pacjent Stefan K., lat 62, został przyjęty do szpitala z powodu zmiany zlokalizowanej po lewej stronie w bezzębnej żuchwie. Zmiana miała charakter wygórowany z owrzodzeniem w części centralnej, wielkości około 5,0 cm. W

badaniu klinicznym stwierdzono wyraźne ograniczenie zmiany do wyrostka zębodołowego z jego nacieczeniem. Węzły chłonne po stronie lewej wyczuwalne, nieznacznie powiększone i niebolesne. Z wywiadu nie udało się ustalić przyczyny powstania zmiany, ponieważ pacjent rzucił palenie parę lat wcześniej, a alkoholu prawie nie spożywa. W badaniu histopatologicznym pobranego wcześniej wycinka ze zmiany, stwierdzono *Carcinoma planoepitheliale partim keratodes* G1. Przeprowadzono zabieg chirurgiczny, w trakcie którego wycięto fragment trzonu zuchwy wraz z towarzyszącymi tkankami miękkimi w wielkości 7,0 x 3,5 x 2,5 cm. Pobrany materiał został przesłany do pracowni histopatologicznej w celu dalszej diagnostyki.

Przygotowano preparaty, które następnie utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny – grupa kontrolna, oraz w cieczy jonowej – grupa badana. Po okresie utrwalania wykonano skrawki, które następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną.

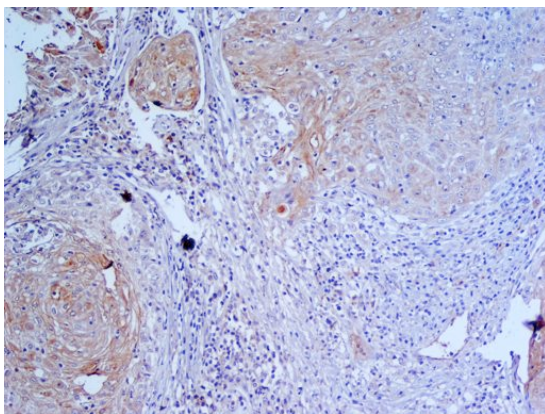


Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

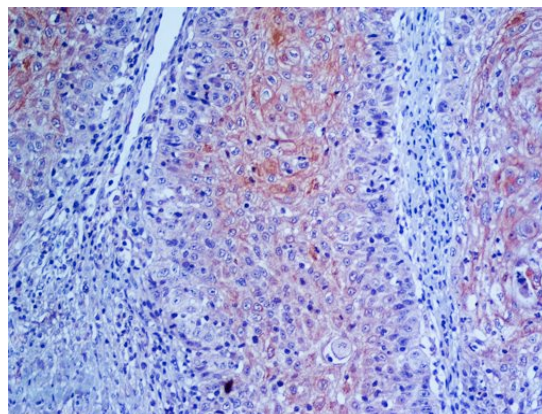


Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

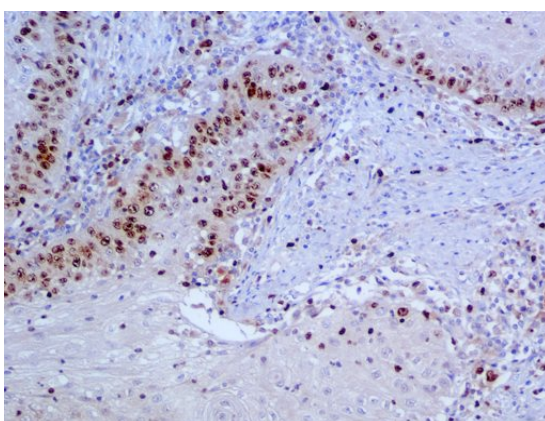
Następnie przeprowadzono badanie immunohistochemiczne z użyciem markerów przeciwko cytokeratynie CK oraz przeciwciał monoklonalnych Ki-67.



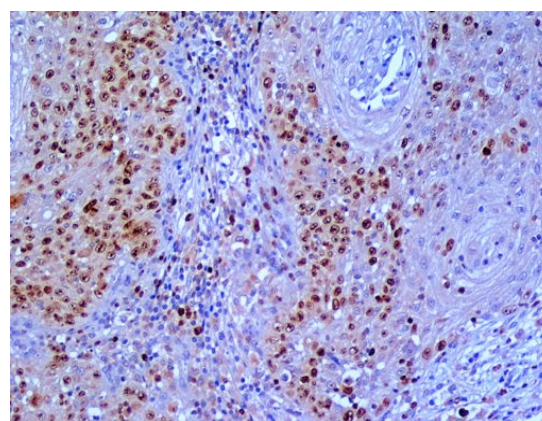
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Wyniki badania histopatologicznego był następujący:

Carcinoma planoepitheliale partim keratodes G2 /mat. I/.

Zmiana usunięta w granicach tkanek niezmiennych.

Materiał utrwalony w tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentylotymetyloimidazoliowym posiada intensywniejsze kolory we wszystkich trzech typach barwienia.

Mikroskopowa ocena porównawcza obu utrwalaczy wykazuje prawidłowy stopień utrwalenia struktur komórkowych. Jednakże materiał utrwalony w cieczy jonowej wykazuje mniejszy stopień obkurczenia komórek w porównaniu do materiału utrwalonego w formalinie, co jest to szczególnie dobrze widoczne w zestawieniu badań immunohistochemicznych. Jądra komórkowe są wyraźnie zaznaczone o zaokrąglonym kształcie z widocznymi procesami mitozy.

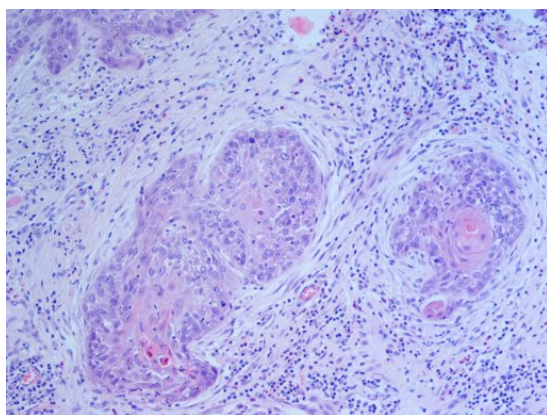
Przypadek 5. Rak płaskonabłonkowy rogowaciejący (*carcinoma planoepiteliale keratodes*)



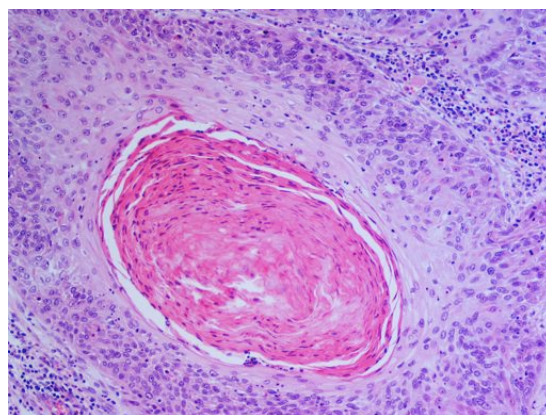
Fotografia 5. Pacjent, lat 53, guz szczęki obejmujący wyrostek zębodołowy, podniebienie twarde, po stronie prawej.

Pacjent Henryk N., lat 53, został przyjęty do szpitala z powodu guza zlokalizowanego na podniebieniu w wielkości 5,0 x 6,0 cm. Zmiana miała charakter wygórowany z ogniskowymi owrzodzeniami na jej powierzchni. W badaniu klinicznym stwierdzono znaczną deformację wyrostka zębodołowego prawego, podniebienia twardego w części centralnej spowodowanego masą guza. Węzły chłonne po stronie prawej powiększone i niebolesne. Z wywiadu ustalono, iż przyczyną powstania zmiany było nadużywanie alkoholu i palenie papierosów. Pacjent skarżył się na problemy z przełykaniem. Przeprowadzono rozległy zabieg chirurgiczny, w trakcie którego usunięto guz wraz fragmentami kości szczęki i tkankami miękkimi. Pobrany materiał został przesłany do pracowni histopatologicznej w celu dalszej diagnostyki.

Przygotowano preparaty, które następnie utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny – grupa kontrolna, oraz w cieczy jonowej – grupa badana. Po okresie utrwalania wykonano skrawki, które następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną.

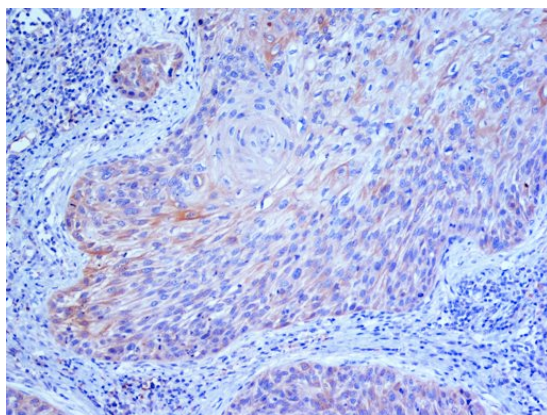


Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

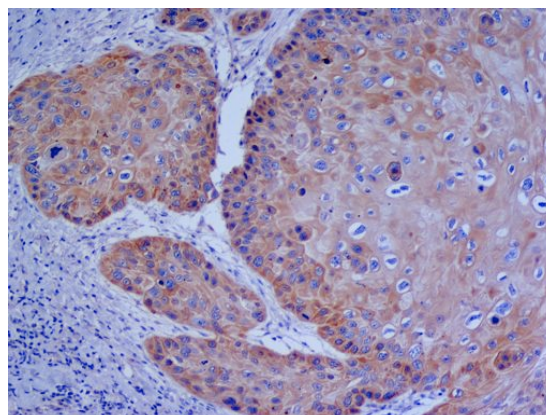


Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

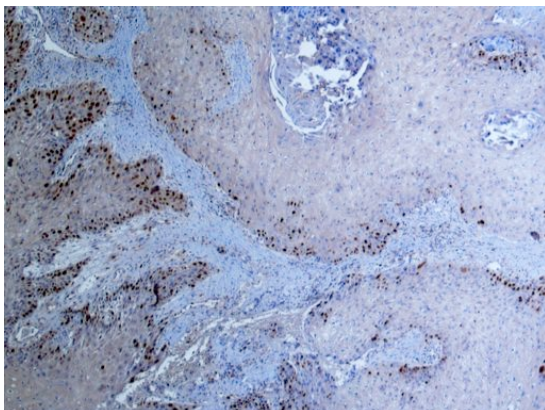
Następnie przeprowadzono badanie immunohistochemiczne z użyciem markerów przeciwko cytokeratynie CK oraz przeciwciał monoklonalnych Ki-67.



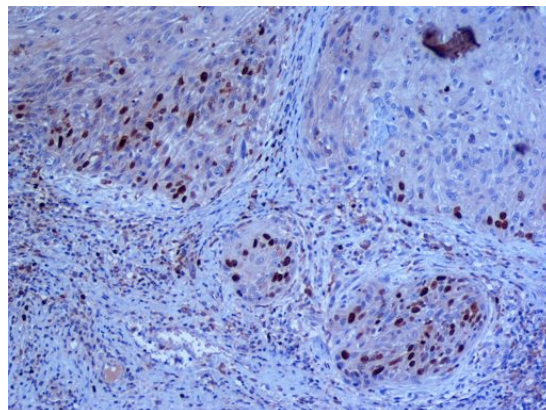
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Wyniki badania histopatologicznego był następujący:

Carcinoma planoepitheliale partim keratodes G2 /mat. I/.

W obrębie tkanek miękkich dominuje proces zapalny o dużym nasileniu, częściowo ziarninujący, częściowo martwiczy.

Na obrzeżu tkanki obecny naciek zapalny o dość dużym nasileniu. Lymphonodulitis reactiva /mat. IV - węzeł szyi/

Wybrany tetrafluoroboran utrwalił materiał w równym stopniu jak 10% roztwór buforowanej formaliny. Kolory uzyskane w kolejnych trzech barwieniach są intensywniejsze w przypadku materiału utrwalonego w cieczy jonowej, o czym świadczy intensywny karmazynowy kolor perły rogowej oraz brązowe zabarwienie przeciwciał monoklonalnych. Ponadto materiał utrwalony w tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowym wykazuje mniejszy stopień obkurczenia komórek w porównaniu z materiałem utrwalonym w formalinie. Jądra komórkowe są wyraźnie widoczne wraz z elementami podziału we wszystkich trzech barwieniach.

Przypadek 6. Rak płaskonabłonkowy nierogowaciejący (*carcinoma planoepiteliale akeratodes*)

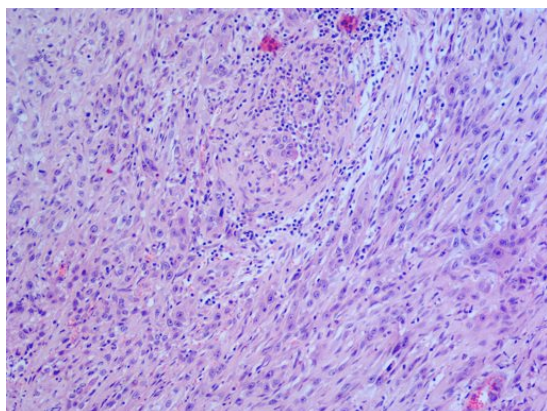


Fotografia 6. Pacjentka, lat 70, guz podniebienia po stronie prawej.

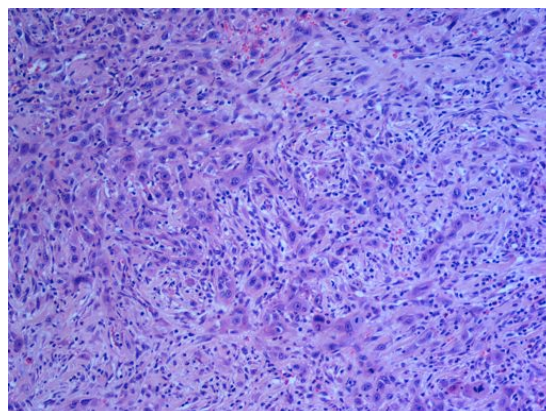
Pacjentka Agata J., lat 70, została przyjęta do szpitala z powodu guza podniebienia po stronie prawej, wielkości 4,5 cm. W badaniu klinicznym stwierdzono oddzielającą się masę guza od podniebienia twardego. Zmiana nie przekroczyła linii symetrii i nie naciekała szczytu wyrostka zębodołowego. Węzły chłonne po stronie prawej – wyczuwalne i niebolesne. Z wywiadu pacjentka podaje długoletnie palenie papierosów. Badana nie skarżyła się na problemy z przełykaniem, ani występowaniem bólu. Przeprowadzono zabieg chirurgiczny z usunięciem fragmentu podniebienia twardego i wyrostka zębodołowego po stronie prawej. Pobrany materiał został przesłany do pracowni histopatologicznej w celu dalszej diagnostyki.

Przygotowano preparaty, które następnie utrwalono w 10% roztworze buforowanej formaliny – grupa kontrolna, oraz w cieczy jonowej – grupa badana. Po

okresie utrwalania wykonano skrawki, które następnie wybarwiono hematoksyliną i eozyną.

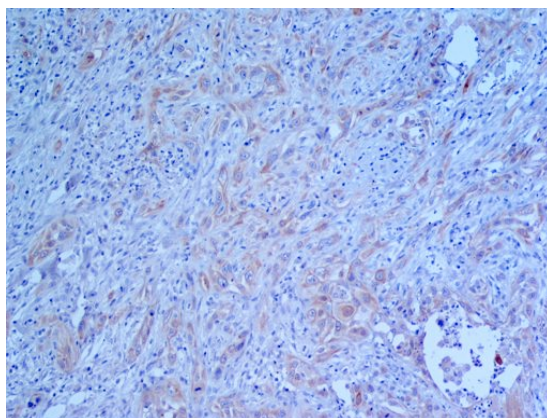


Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

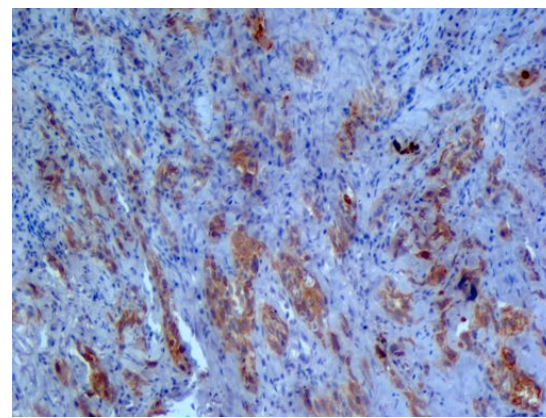


Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: H+E,
Powiększenie: 10x.

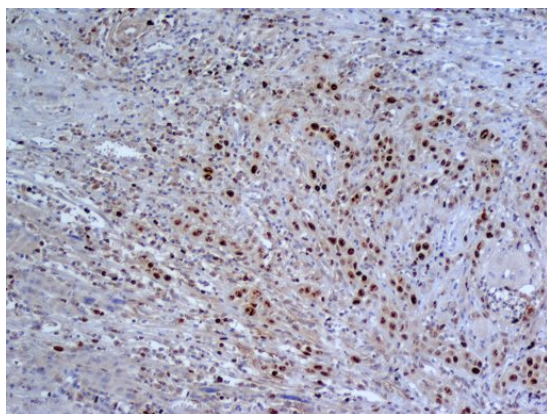
Następnie przeprowadzono badanie immunohistochemiczne z użyciem markerów.



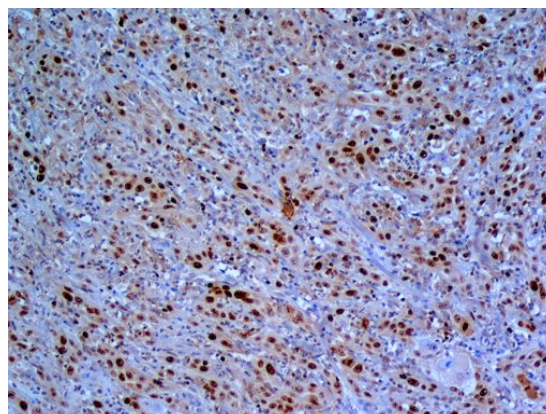
Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko CK,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: 10% roztwór buforowanej formaliny,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.



Utrwalacz: ciecz jonowa,
Barwienie: reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko Ki-67,
Powiększenie: 10x.

Wyniki badania histopatologicznego był następujący:

Carcinoma planoepitheliale akeratodes G2 /mat. I/.

Zmiana nowotworowa usunięta w granicach zdrowych tkanek.

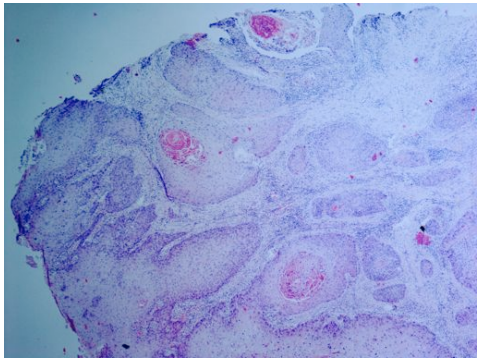
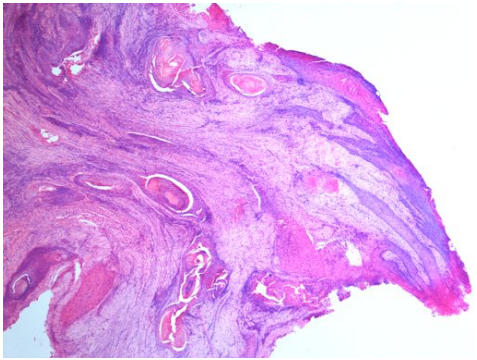
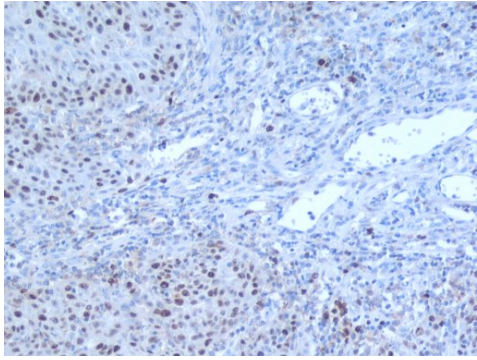
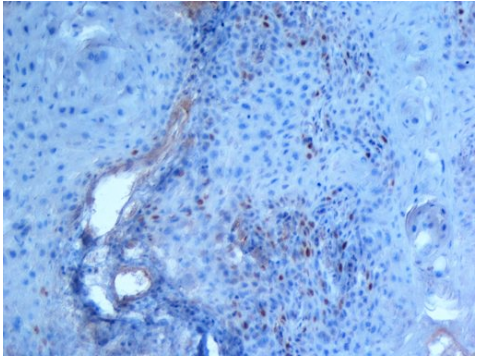
Mikroskopowa ocena porównawcza wykazała, iż materiał utrwalony w tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentylksymetyloimidazoliowym charakteryzuje się mniejszym stopniem obkurczenia komórek w porównaniu z materiałem utrwalonym w formalinie. Komórki posiadają okrągły kształt z wyraźnie wybarwionymi jądrami komórkowymi. Natomiast komórki nowotworowe wraz z jądrami w trakcie podziału są lepiej widoczne i intensywniej wybarwione w preparatach utrwalonych w cieczy jonowej.

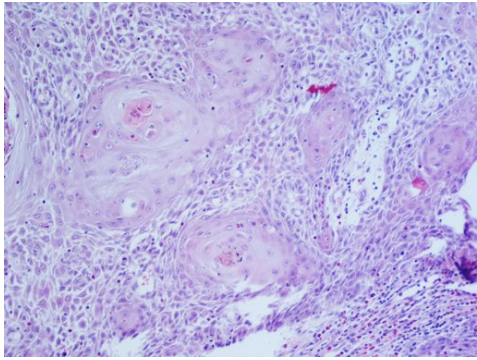
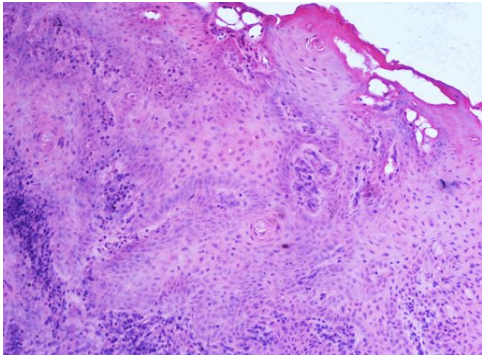
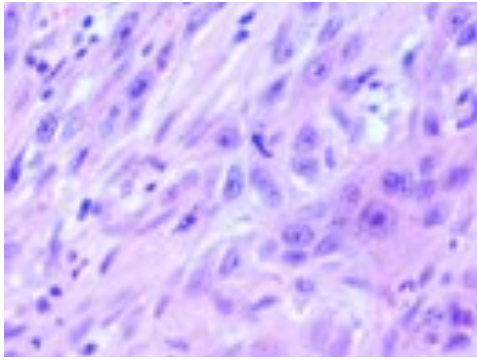
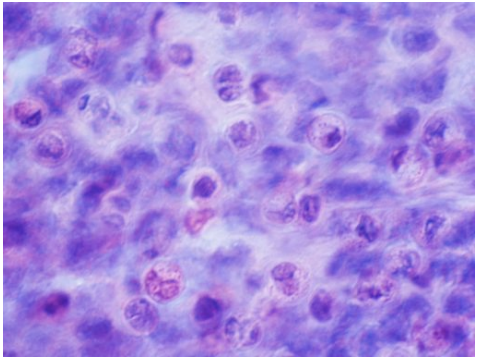
Dodatkowo wybarwienie erytrocytów jest intensywniejsze w przypadku materiału utrwalonego w cieczy jonowej, co szczególnie jest widoczne w przypadku badania H+E. Natomiast komórki nacieku zapalnego w badaniu immunohistochemicznym wybarwiły się na intensywny niebieski kolor.

5.4.2.2. Zestawienie różnic w reakcji na zastosowany utrwalacz

Preparaty utrwalone w cieczy jonowej charakteryzowały się intensywniejszym wybarwieniem oraz słabszym obkurczeniem struktur komórkowych w stosunku do materiału kontrolnego utrwalonego w 10% roztworze buforowanej formaliny, co zestawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Zestawienie obserwowanych różnic w materiale utrwalonym w 10% roztworze buforowanej formaliny i cieczy jonowej.

Różnica	Materiał utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny	Materiał utrwalony w cieczy jonowej
Barwa	<i>Carcinoma planoepitheliale keratodes</i> G2, H+E, powiększenie 10x	
		
Barwa	<i>Carcinoma planoepitheliale partim keratodes</i> G1, Ki-67, powiększenie 10x	
		

Różnica	Materiał utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny	Materiał utrwalony w cieczy jonowej
obkurczenie materiału	<p><i>Carcinoma planoepitheliale keratodes G1, H+E, powiększenie 10x</i></p> 	
obkurczenie materiału	<p><i>Carcinoma planoepitheliale keratodes G2, barwienie H+E, powiększenie 100x + olejek imersyjny</i></p> 	

Dodatkowo warto nadmienić, iż opisane badania porównawcze z wykorzystaniem cieczy jonowych, w celu utrwalania materiału biologicznego są nowatorskie w skali światowej.

6. WNIOSKI

Badania opisane w pracy wykazały, iż ciecz jonowa o nazwie chemicznej: tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowym może być z powodzeniem stosowana w utrwalaniu materiału biologicznego, a co ważniejsze może być stosowana, jako bezpieczny zamiennik 10% roztworu buforowanej formaliny. Poniżej wyszczególniono najważniejsze wnioski:

1. Dzięki łatwej penetracji w głąb tkanki zsyntezowana ciecz jonowa szybciej i skuteczniej utrwała badany materiał. Mikroskopowa ocena porównawcza wykazała, iż stopień utrwalenia tkanki jest taki sam.
2. Wykazano możliwość zastosowania materiału utrwalonego w cieczy jonowej do rutynowych badań histopatologicznych, jak również do badań immunohistochemicznych. Użyta do utrwalania ciecz jonowa nie zmienia właściwości chemicznych tkanki.
3. Wykazano, iż tkanki utrwalone w cieczy jonowej z powodzeniem mogą być wykorzystane w diagnostyce nowotworów głowy i szyi. Zachodzą reakcje barwne z stosowanymi w immunohistochemii przeciwciałami.
4. Materiał utrwalony w cieczy jonowej nie ulega obkurczeniu. Jest to ważna cecha pozwalająca porównać wielkość materiału otrzymanego z materiałem utrwalonym i przygotowanym do skrawania.
5. W obrazie mikroskopowym komórki wraz z jądrami nie ulegają obkurczeniu. Posiadają owalny kształt, a ich jądra są łatwiejsze w identyfikacji.

6. Utrwalony w cieczy jonowej materiał wybarwia się intensywniej. Kolory wybarwionych struktur są bardziej soczyste i z czasem nie bledną.
7. Wykazano długoterminową skuteczność utrwalania i przechowywania materiału biologicznego, powyżej 5 lat, przy użyciu tetrafluoroboranu 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowego. Utrwalona i przechowywana tkanka w tym tetrafluoroboranie nie ulega zmianom makroskopowym, jak i mikroskopowym.
8. Środowisko pracy jest bezpieczne dla człowieka, ponieważ użyta ciecz jonowa ma niską prężność par, jest więc związkiem nielotnym.

7. PIŚMIENNICTWO

- [1] Buszewski B., Kowalska S., Stepnowski P.: The influence of stationary phase properties on ionic liquids cation separation in RP-HPLC, *Journal of Separation Science*, 29:1116-1125, **2006**.
- [2] Rogers R.D., Sedona K.R.: Ionic liquids: Industrial applications to green chemistry, *American Chemical Society*, Washington DC, **2002**.
- [3] Lewandowski L., Szymaś J.: Weryfikacja histopatologiczna wczesnych i późnych postaci nowotworów złośliwych i niektórych zmian patologicznych jamy ustnej. Rozdział w książce: Onkologia szczękowo-twarzowa – wybrane zagadnienia kliniczne. Pod red. prof. L. Lewandowskiego. *Wydawnictwo Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego*, Poznań, **2004**.
- [4] Eltoun I.-E., Fredenburgh J., Grizzle W.E.: Advanced concepts in fixation: effects of fixation on immunohistochemistry and histochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues, special methods of fixation. *Journal of Histotechnology*, 24:201-210, **2001**.
- [5] Eltoun I.-E., Fredenburgh J., Myers R.B., Grizzle W.E.: Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *Journal of Histotechnology*, 24:173-190, **2001**.
- [6] Grizzle W.E., Stockard C., Billings P.: The effects of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. *Journal of Histotechnology*, 24:213-219, **2001**.

- [7] Jewell S.D., Srinivasan M., McCart L.M. et al.: Analysis of the molecular quality of human tissue: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. *American Journal of Clinical Pathology*, 118:733-741, **2002**.
- [8] Steg A., Wang W., Blanquicett C. et al.: Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by taqman low-density array: application to hedgehog and wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *Journal of Molecular Diagnostics*, 8:76-83, **2006**.
- [9] Grizzle W.E., Fredenburgh J.: Avoiding biohazards in medical, veterinary and research laboratories. *Biotechnic and Histochemistry*, 76:183-206, **2001**.
- [10] Dapson R.W.: Fixation for the 1990s: a review of needs and accomplishments. *Biotechnic and Histochemistry*, 68:75-82, **1993**.
- [11] Horobin R.W.: Histochemistry: an expository outline of histochemistry and biophysical staining. Stuttgart: Gustav Fischer, **1982**.
- [12] Rait V.K., O’Leary T.J., Mason J.T.: Modeling formalin fixation and antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A: I-structural and functional alterations. *Laboratory Investigations*, 84:292-299, **2004**.
- [13] Rait V.K., Zhang Q., Fabris D. et al.: Conversions of formaldehyde-modified 2-deoxyadenosine 5’-monophosphate in conditions modeling formalin-fixed tissue dehydration. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54:301-310, **2005**.
- [14] Anonymous: Preserve for microwave fixation. Vol. **2001**. Energy Beam Sciences.

- [15] Kok L.P., Boon M.E.: Microwave for the art of microscopy. Leyden: Coulomb Press, **2003**.
- [16] Leong A.S.-Y.: Microwave technology for light microscopy and ultrastructural studies. Bangkok: Milestone, **2005**.
- [17] Pearse A.G.: Histochemistry, theoretical and applied, Volume I. Edinburgh: Churchill Livingstone, **1980**.
- [18] Lillie R.D., Fullmer H.M.: Histopathologic technic and practical histochemistry, 4th edn. New York: McGraw-Hill, **1976**.
- [19] Arnold M.M., Srivastava S., Fredenburgh J. et al.: Effect of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotechnic and Histochemistry*, 71:224-230, **1996**.
- [20] Medawar P.B.: The rate of penetration of fixatives. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 61:46-57, **1941**.
- [21] Hopwood D.: Fixatives and fixation: a review. *Histochemical Journal*, 1:323-360, **1969**.
- [22] Grizzle W.E., Fredenburgh J.: Safety in biomedical and other laboratories. In: Patrinos G., Ansorg W., eds. Molecular diagnostics, Ch. 33, pp. 421-428, **2005**.
- [23] Hopwood D.: Cell and tissue fixation, 1972-1982. *Histochemical Journal*, 17:389-442, **1985**.
- [24] Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P.: Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33:845-853, **1985**.

- [25] Hayat M.A.: Principles and techniques of electron microscopy. *Biological applications*, 2nd edn. Baltimore, MD: University Park Press, Vol. 1, **1981**.
- [26] Wilkes J.S.: A short history of ionic liquids-from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem*, 4:73-80, **2002**.
- [27] Ray P.C., Rakshit J.N.: Nitrites of the alkylammonium bases: ethylammonium nitrite, dimethylammonium nitrite, and trimethylammonium nitrite. *J. Chem. Soc. Trans.*, 99:1470-1475, **1911**.
- [28] Walden P.: Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bull. Russian Acad. Sci.*, 405-422, **1914**.
- [29] Hurley F.H., *patent USA*: 4 446 331, 1948; Wier T.P. Jr and Hurley F.H., *patent USA*: 4 446 349, 1948; Wier T.P. Jr, *patent USA*: 4 446 350, **1948**.
- [30] Seddon K.R.: Room-temperature ionic liquids: Neoteric solvents for clean catalysis. *Kinet. Catal.*, 37:693-697, **1996**.
- [31] Seddon K.R.: Molten Salt Forum: *Proceedings of 5th International Conference on Molten Salt Chemistry and Technology* (ed. H. Wendt) 53 Trans Tech Publications Zürich, 5:53, **1998**.
- [32] Copeland J.L.: Transport Properties in Ionic Liquids, Gordon and Breach Science Publishers, New York, **1974**.
- [33] Crisp R.I., Hussey C.L., Seddon K.R.: The reduction of dioxotetrachlororuthenate(VI) to hexachlororuthenate(IV) in a basic 1-butylpyridinium chloride-aluminium(III) chloride ionic liquid. *Polyhedron.*, 14:2819-2825, **1995**.

- [34] Suarez P.A.Z., Dullius J.E.L., Einloft S., De Souza R.F., Dupont J.: The use of new ionic liquids in two-phase catalytic hydrogenation reaction by rhodium complexes. *Polyhedron.*, 15:1217-1219, **1995**.
- [35] Syguda A.: Praca doktorska, *Sole deanolu i jego estrów*. Poznań **2006**.
- [36] Pernak J., Stefaniak F., Węglewski J.: Phosphonium Acesulfamate Based Ionic Liquids. *Eur. J. Org. Chem.*, 650-652, **2005**.
- [37] Pernak J., Sobaszekiewicz K., Foksowicz-Flaczyk J.: Ionic liquids with symmetrical dialkoxymethyl-substituted imidazolium cations. *Chem. Eur. J.*, 10:3479-3485, **2004**.
- [38] Howarth J., Hanlon K., Fayne D., McCormac P.: Moisture Stable Dialkylimidazolium Salts as Heterogeneous and Homogeneous Lewis Acids in the Diels-Alder Reaction. *Tetrahedron Lett.*, 38:3097-3100, **1997**.
- [39] Pernak J.: Ciecze jonowe. Związki na miarę XXI wieku. *Przem. Chem.*, 82:521-524, **2003**.
- [40] Earle M.J., Esparanca J.M.S.S., Gilea M.A., Lopes J.N.C., Rebelo L.P.N., Magee J.W., Seddon K.R., Widegren J.A.: The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*, 439:831-834, **2006**.
- [41] Holbrey J.D., Seddon K.R.: The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2133-2140, **1999**.
- [42] Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M., Willauer H.D., Broker G.A., Rogers R.D.: Characterization and comparison of hydrophilic and

- hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.*, 3:156-164, **2001**.
- [43] Holbrey J.D., Seddon K.R.: Ionic Liquids. *Clean Prods. Proc.*, 1:223-236, **1999**.
- [44] Brennecke J.F., Maginn E.J.: Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing. *AIChEJ.*, 47:2384-2389, **2001**.
- [45] Wasserscheid P., Welton T.: Ionic liquids in synthesis. John Wiley & Sons, New York, **2002**.
- [46] Cybulski J., Wiśniewska A., Kulis-Adamiak A., Lewicka L., Ciemiecka-Rosłonkiewicz A., Kita K., Fojutowski A., Materna K., Pernak J.: Long-alkyl-chain quaternary ammonium lactate based ionic liquids. *Chem. Eur. J.*, 14:9305-9311, **2008**.
- [47] Pernak J., Stefaniak F., Węglewski J.: Phosphonium acesulfamate based ionic liquid. *Eur. J. Org. Chem.*, 650-652, **2005**.
- [48] Carter E.B., Culver S.A., Goode R.D., Ntai I., Tickell M.D., Traylor R.K., Hoffman N.W., Davis Jr J.H.: Sweet success: ionic liquids derived from non-nutritive sweeteners. *Chem. Commun.*, 630-631, **2004**.
- [49] Stefańska J.: Substancje czynne środków dezynfekcyjnych – mechanizmy działania, oporność drobnoustrojów. *Mikrobiologia*, 1(22):17-24, **2000**.
- [50] Merianos J.J.: Surface-Active Agents. Block S.S., ed. *Disinfection, sterilization and preservation*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 5:283-320, **2001**.

- [51] Rutala W.A.: Disinfection, sterilization and waste disposal. Wenzel R.P. ed. Prevention and Control of Nosomial Infections. Baltimore: Williams & Wilkins, 539-594, **1997**.
- [52] Pernak J., Jędraszczyk J., Skrzypczak A., Krysiński J., Węclaś H.: Antimikrobielle wirkung von iminiumverbindungen. *Tenside Surf. Det.*, 29:280-284, **1992**.
- [53] Brycki B., Skrzypczak A., Mirska I., Pernak J.: Synthesis and antimicrobial activity of new quaternary ammoniumchlorides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 329:279-282, **1996**.
- [54] Skrzypczak A., Brycki B., Mirska I., Pernak J.: Synthesis and antimicrobial activities of new quats. *Eur. J. Med. Chem.*, 32:661-668, **1997**.
- [55] Lukac M., Lacko I., Bukovsky M., Kyselova Z., Karlovska J., Horvath B., Davinsky F.: Synthesis and antimicrobial activity of a series of optically active quaternary ammonium salts derived from phenylalanine. *Cent. Eur. J. Chem.*, 8:194-201, **2010**.
- [56] Pernak J., Krysiński J., Skrzypczak A.: Bakterizide wirkung von iminiumverbindungen. *Tenside Surfactants Detergents*, 24:276-279, **1987**.
- [57] Stasiewicz M., Fojutowski A., Kropacz A., Pernak J.: 1-Alkoxyethyl-X-dimethylaminopyridinium-base ionic liquids in wood preseervation. *Holzforschung*, 62:309-317, **2008**.
- [58] Petkovic M., Seddon K.R., Rebelo L.P.N., Pereira C.S.: Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. *Chem. Soc. Rev.*, 40:1383-1403, **2011**.

- [59] Carson L., Chau P.K.W., Earle M.J., Gilea M.A., Gilmore B.F., Gorman S.P., McCann M.T., Seddon K.R.: Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chem.*, 11:492-497, **2009**.
- [60] Busetti A., Crawford D.E., Earle M.J., Gilea M.A., Gilmore B.F., Gorman S.P., Lavery G., Lowry A.F., McLaughlin M., Seddon K.R.: Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids. *Green Chem.*, 12:420-425, **2010**.
- [61] Ranke J. Stolte S., Störmann S., Arning J., Jastorff B.: Design of sustainable chemical products the example of ionic liquids. *Chem. Rev.*, 107:2183-2206, **2007**.
- [62] Latała A., Nędzi M., Stepnowski P.: Toxicity of imidazolium ionic liquids towards algae. Influence of salinity variations. *Green Chem.*, 12:60-64, **2010**.
- [63] Latała A., Nędzi M., Stepnowski P.: Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids towards algae. *Bacillaria paxillifer* (a microphytobenthic diatom) and *Geitlerinema amphibium* (a microphytobenthic blue green alga). *Green Chem.*, 11:1371-1376, **2009**.
- [64] Docherty K.M., Joyce M.V., Kulacki K.J., Kulpa C.F.: Microbial biodegradation and metabolite toxicity of three pyridinium-based cation ionic liquids. *Green Chem.*, 12:701-712, **2010**.
- [65] Petkovic M., Ferguson J.L., Gunaratne N.H.Q., Ferreira R., Leitao M.C., Seddon K.R., Rebelo L.P.N., Pereira C.S.: Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids – toxicity and biodegradability. *Green Chem.*, 12:643-649, **2010**.

- [66] Zhang C., Wang H., Malhotra S.V., Dodge C.J., Francis A.J.: Biodegradation of pyridinium-based ionic liquids by an axenic culture of soil *Corynebacteria*. *Green Chem.*, 12:851-858, **2010**.
- [67] Neumann J., Grundmann O., Thöming J., Schulte M., Stolte S.: Anaerobic biodegradability of ionic liquid cations under denitrifying conditions. *Green Chem.*, 12:620-627, **2010**.
- [68] Docherty K.M., Joyce M.V., Kulacki K.J., Kulpa C.F.: Microbial biodegradation and metabolite toxicity of three pyridinium-based cation ionic liquids. *Green Chem.*, 12:701-712, **2010**.
- [69] Thi Phuong Thuy Pham, Chul-Woong Cho, Yeoung-Sang Yun: Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Weather Research*, 44:352-372, **2010**.
- [70] Jodynis-Liebert J., Nowicki M., Adamska T., Ewertowska M., Kujawska M., Petzke E., Konwerska A., Ostalska-Nowicka D., Pernak J.: Acute and subacute (28-Day) toxicity studies of ionic liquid, didecyldimethyl ammonium acesulfamate, in rats. *Drug and Chem. Toxicology*, 32(4):395-404, **2009**.
- [71] Jodynis-Liebert J., Nowicki M., Murias M., Adamska T., Ewertowska M., Kujawska M., Piotrowska H., Konwerska A., Ostalska-Nowicka D., Pernak J.: Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethyl ammonium saccharinate, in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57:266-273, **2010**.

- [72] Wilkes J.S, Levisky J.A., Wilson R.A., Hussey C.L.: Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorg. Chem.*, 21:1263-1264, **1982**.
- [73] Kosmulski M., Saneluta C., Marczewska-Boczkowska K.: Niskotemperaturowe ciecze jonowe - ciekawostka laboratoryjna czy zapowiedź rewolucji technologicznej? Cz. 3 Zastosowanie w procesach elektrochemicznych. *Przem. Chem.*, 81:234-236, **2002**.
- [74] Wilkes J.S., Zaworotko M.J.: Air and water stable 1-methyl-3-ethylimidazolium based ionic liquids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 965, **1992**.
- [75] Lewandowski A., Galiński M.: Carbon-ionic liquid double-layer capacitors. *J. Phys. Chem. Solids.*, 65:281, **2004**.
- [76] Pernak J., Czepukowicz A., Poźniak R.: New ionic liquids and their antielectrostatic properties. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40:2379-2383, **2001**.
- [77] Pernak J., Goc I., Fojutowski A.: Protic ionic liquids with organic anion as wood preservative. *Holzforschung*, 59:473-475, **2005**.
- [78] Geng X.Li.Y., Simonsen J., Li K.: Application of ionic liquids for electrostatic control in wood. *Holzforschung*, 58:280-285, **2004**.
- [79] Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I.: Anti-microbial activities of ionic liquids *Green Chem.*, 5:52-56, **2003**.
- [80] Pernak J., Goc I., Mirska I.: Anti-microbial activities of protic ionic liquids with lactate anion *Green Chem.*, 6:323-329, **2004**.

- [81] Pernak J., Feder-Kubis J.: Synthesis and properties of chiral ammonium-based ionic liquids. *Chem. Eur. J.*, 11:4441-4449, **2005**.
- [82] Cieniecka-Rosłonkiewicz A., Pernak J., Feder-Kubis J., Ramani A., Robertson J., Seddon K.R.: Synthesis, anti-microbial activities and anti-electrostatic properties of phosphonium-based ionic liquids. *Green Chem.*, 7:855-862, **2005**.
- [83] Zabielska-Matejuk J., Urbanik E., Pernak J.: New bis-quaternary ammonium and bis-imidazolium chloride wood preservatives. *Holzforschung*, 58:292-299, **2004**.
- [84] Majewski P., Pernak A., Grzymisławski M., Iwanik K., Pernak J.: Ionic liquids in embalming and tissue preservation. Can traditional formalin-fixation be replaced safely? *Acta Histochem.*, 105:135-142, **2003**.
- [85] Pernak A., Iwanik K., Majewski P., Grzymisławski M., Pernak J.: Ionic liquids as an alternative to formalin in histopathological diagnosis. *Acta Histochem.*, 107:149-156, **2005**.
- [86] Katritzky A.R., Singh S., Kirichenko K., Holbrey J.D., Smiglak M., Reichert W.M., Rogers R.D.: 1-Butyl-3-methylimidazolium 3,5-dinitro-1,2,4-triazolate: a novel ionic liquid containing a rigid, planar energetic anion. *Chem. Commun.*, 868-870, **2005**.
- [87] Swatoski R.P., Spear S.K., Holbrey J.D., Rogers R.D.: Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:4974-4975, **2002**.

- [88] Vanoye L., Fanselow M., Holbrey J.D., Atkins M.P., Seddon K.R.: Kinetic model for the hydrolysis of lignocellulosic biomass in the ionic liquid, 1-ethyl-3-methyl-imidazolium chloride. *Green Chem.*, 11:390-396, **2009**.
- [89] Moulthrop J.S., Swatloski R.P., Moyna G., Rogers R.D.: High-resolution ¹³C NMR studies of cellulose and cellulose oligomers in ionic liquid solutions. *Chem. Commun.*, 1557-1559, **2005**.
- [90] Sun N., Rahman M., Qin Y., Maxim M.L., Rodriguez H., Rogers R.D.: Complete dissolution and partial delignification of wood in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.*, 11:646, **2009**.
- [91] Freemantle M.: Eyes on Ionic Liquids. *Chem. Eng. News*, 78(20):37-50, **2000**.
- [92] Freemantle M.: Designer solvents—ionic liquids may boost clean technology development. *Chem. Eng. News*, 76(13):32-37, **1998**.
- [93] Ackerman J.P.: Chemical basis for pyrochemical reprocessing of nuclear fuel. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30:141-145, **1991**.
- [94] Bösmann A., Datsevich L., Jess A., Lauter A., Schmitz C., Wasserscheid P.: Deep desulfurization of diesel fuel by extraction with ionic liquids. *Chem. Commun.*, 2494-2495, **2000**.
- [95] Eßer J., Wasserscheid P., Jess A.: Deep desulfurization of oil refinery streams by extraction with ionic liquids. *Green. Chem.*, 6:316-322, **2004**.
- [96] Olivier-Bourbigou H., Chodorage J.A., Travers P.: Olefin oligomerisation with homogeneous catalysis. *Petrol. Technol. Quart. Autumn*, 141, **1999**.

- [97] Freemantle M.: BASF'S smart ionic liquid. *Chem. Eng. News*, 9, 31 marca, **2003**.
- [98] van Rantwijk F., Lau R., Sheldon R.A.: Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol*, 21:131-138, **2003**.
- [99] Erbedinger M., Mesiano A.J., Russel A.J.: Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid – an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, 16:1129-1131, **2000**.
- [100] Itoh T., Akasaki E., Nishimura Y.: Efficient lipase-catalyzed enantioselective acylation under reduced pressure conditions in an ionic liquid solvent system. *Chem. Lett.*, 31:154, **2002**.
- [101] Reetz M.T., Wiesenhöfer W., Francicò G., Leitner W.: Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. *Chem. Commun.*, 1:992-993, **2002**.
- [102] Eckstein M., Sesing M., Kragl U., Adlercreutz P.: At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 24:867-872, **2002**.
- [103] Nara S.J., Harjani J.R., Salunkhe M.M.: Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study. *Tetrahedron Lett.*, 43:2979-2982, **2002**.
- [104] Nara S.J., Harjani J.R., Salunkhe M.M.: Lipase-catalysed polyester synthesis in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Tetrahedron Lett.*, 44:1371-1373, **2003**.

- [105] Kielbasiński P., Albrycht M., Łuczak J., Mikołajczyk M.: Enzymatic reactions in ionic liquids: lipase-catalysed kinetic resolution of racemic, *P*-chiral hydroxymethanephosphinates and hydroxymethylphosphine oxides. *Tetrahedron-Asymmetr.*, 13:735-738, **2002**.
- [106] Husum L., Jørgensen C.T., Christensen M.W., Krik O.: Enzyme catalysed synthesis in ambient temperature ionic liquids. *Biocatal. Biotrans.*, 19:331-338, **2001**.
- [107] Li X., Lou W., Smith T.J., Zong M., Wu H., Wang J.: Efficient regioselective acylation of 1- β -D-arabinofuranosylecytosine catalyzed by lipase in ionic liquid containing systems. *Green. Chem.*, 8:538-544, **2006**.
- [108] Lundell K., Kurki T., Lindroos M., Kanerva L.T.: Room temperature ionic liquids in the kinetic resolution of adrenaline-type aminoethanols by *Burkholderia cepacia* lipase under normal and microwave conditions. *Adv. Synth. Catal.*, 347:1110-1118, **2005**.
- [109] Kragl U., Eckstein M., Kaftzik N.: Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotech.*, 13:565-571, **2002**.
- [110] Rantwijk von F., Sheldon R.A.: Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.*, 107:2757-2785, **2007**.
- [111] Cantone S., Hanefeld U., Basso A.: Biocatalysis in non-conventional media-ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chem.*, 9:954-971, **2007**.

- [112] Arriaza B.T., Standen V.G., Cassman V., Santoro C.M.: Chinchorro Culture: Pioneers of the Coast of the Atacama Desert. “The Handbook of South American Archaeology”, Springer, New York, 45-58, **2008**.
- [113] Mayer, R. G.: Embalming: History, Theory, and Practice, Appleton & Lange, Norwalk, CT, **1990**.
- [114] Conolly R.B., Kimbell J.S., Janszen D., Schlosser P.M., Kalisak D., Preston J., Miller F.J.: Human respiratory tract cancer risks of inhaled formaldehyde: Dose-response predictions derived from biologically-motivated computational modeling of a combined rodent and human dataset. *Toxicol Sci.*, 82(1):279-296, **2004**.
- [115] Moloney M., McDonnell L., O’Schea H.: Atomic force microscopy of BHK-21 cells: an investigation of cell fixation techniques. *Ultramicroscopy*, 100:153-161, **2004**.
- [116] Sidorowicz K., Sokalski J., Pernak A., Czarnecka B.: Ocena szczelności wybranych cementów zastosowanych do wypełnień kanałów korzeniowych zębów poddanych resekcji wierzchołka korzenia. *Dent. Med. Probl.*, 47(4):425-432, **2010**.

8. WYKAZ RYSUNKÓW, SCHEMATÓW, TABELI I FOTOGRAFII

RYSUNEK 1	Trójwymiarowa, kulowa struktura formaldehydu z zaznaczonym rozkładem ładunku elektrycznego.	str. 6
RYSUNEK 2	Temperatura topnienia dla tetrafluoroboranu [BF ₄], heksafluorofosforanu [PF ₆] i bis(trifluorosulfonylo)imidku 3-alkilo-1-metyloimidazoliowego [NTf ₂].	str. 36
RYSUNEK 3	Struktury trzech butylowych podstawników.	str. 37
RYSUNEK 4	Gęstość cieczy jonowych dla dwóch soli 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowych: 1- dla heksafluorofosforanów, 2- dla tetrafluoroboranów.	str. 39
RYSUNEK 5	Lepkość dynamiczna soli 3-butylo-1-metyloimidazoliowych w temperaturze 20°C z następującymi anionami: 1 – <i>n</i> -C ₄ F ₉ SO ₃ ⁻ , 2 – <i>n</i> -C ₃ H ₇ COO ⁻ , 3 – CF ₃ SO ₃ ⁻ , 4 – CF ₃ COO ⁻ , 5 – (CF ₃ SO ₂)N ⁻ .	str. 40
RYSUNEK 6	Izotermy napięcia powierzchniowego mleczanów didocyloдимetyloamoniowych [DDA] i benzalkoniowych [BA].	str. 42
RYSUNEK 7	Aktywność biologiczna wyrażona wartością MIC dla chlorku 3-alkoksymetylo-1-imidazoliowego wobec <i>Bacillus subtilis</i> .	str. 46
RYSUNEK 8	Wartości średnie MIC i MBC dla wybranych dziewięciu mikroorganizmów.	str. 48
RYSUNEK 9	Schemat instalacji do syntezy eteru chlorometyloalkilo-wego.	str. 56
RYSUNEK 10	Schematyczne przedstawienie seryjnych rozcieńczeń.	str. 62
<hr/>		
SCHEMAT 1	Wykres przedstawia liczbę opublikowanych prac na temat cieczy jonowych w latach od 1968 do roku 2006.	str. 7
SCHEMAT 2	Podział topograficzny okolic występowania raków jamy ustnej.	str. 9
SCHEMAT 3	Klasyfikacja TNM wargi i jamy ustnej wg AJCC z 2002 roku.	str. 13
SCHEMAT 4	Stopnie histologiczne złośliwości raków.	str. 15
SCHEMAT 5	Klasyfikacja cieczy jonowych.	str. 29
SCHEMAT 6	Kationy cieczy jonowych.	str. 30
SCHEMAT 7	Synteza protonowej imidazoliowej cieczy jonowej.	str. 32

SCHEMAT 8	Metoda dwuetapowej syntezy cieczy jonowych.	str. 33
SCHEMAT 9	Oddziaływanie różnych związków chemicznych na struktury komórki bakteryjnej.	str. 44
<hr/>		
TABELA 1	Zestawienie rodzajów klasyfikacji TNM opublikowanej przez AJCC w 2009 r.	str. 14
TABELA 2	Stan skupienia soli 3-alkoksymetylo-1-metyloimidazoliowych.	str. 38
TABELA 3	Zsyntezowane etery chlorometylowoalkilowe (ROCH ₂ Cl).	str. 72
TABELA 4	Zsyntezowane sole imidazoliowe.	str. 73
TABELA 5	Wyznaczone wartości MIC ^a i MBC ^a dla chlorków 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowych.	str. 76
TABELA 6	Wyznaczone wartości MIC ^a i MBC ^a dla tetrafluoroboranów 3-alkoksymetylo-1-butyloimidazoliowych.	str. 77
TABELA 7	Porównawcze zestawienie zmiany w trakcie utrwalania tkanki w 10% roztworze formaliny i tetrafluoroboranie 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowymi.	str. 80
TABELA 8	Charakterystyka analizowanych przypadków nowotworów głowy i szyi.	str. 82
TABELA 9	Zestawienie obserwowanych różnic w materiale utrwalonym w 10% roztworze buforowanej formaliny i cieczy jonowej.	str. 104
<hr/>		
FOTOGRAFIA 1	Guz języka, 66 letniej pacjentki, przed zabiegiem chirurgicznym.	str. 83
FOTOGRAFIA 2	Pacjent, lat 57, z guzem języka i dna jamy ustnej, przed zabiegiem chirurgicznym.	str. 87
FOTOGRAFIA 3	Pacjent, lat 60, z guzem okolicy trójkąta zatrzonowcowego, po stronie prawej.	str. 90
FOTOGRAFIA 4	Pacjent, lat 62, guz żuchwy po stronie lewej, sytuacja po pobraniu wycinka diagnostycznego.	str. 94
FOTOGRAFIA 5	Pacjent, lat 53, guz szczęki obejmujący wyrostek zębodołowy, podniebienie twarde, po stronie prawej.	str. 98
FOTOGRAFIA 6	Pacjentka, lat 70, guz podniebienia po stronie prawej.	str. 101

STRESZCZENIE

Praca dotyczy wykorzystania nowej grupy związków chemicznych - cieczy jonowych w diagnostyce histopatologicznej. Wyselekcjonowana ciecz jonowa, o nazwie chemicznej: tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy, była wykorzystana do utrwalania wybranych nowotworów głowy i szyi jako efektywny i bezpieczny zamienniki formaliny.

W 1868 roku niemiecki chemik, William Hoffman odkrył rozpuszczalny w wodzie gaz znany obecnie, jako formaldehyd. Od tego momentu formalina stała się powszechnie używanym prezerwantem. Przez wiele lat nie dostrzegano problemu wysokiej toksyczności formaliny. Obecnie wiadomo, że bezpośredni kontakt z tym prostym aldehydem lub jego oparami może doprowadzić do rozwoju poważnych chorób, takich jak nowotwory górnych dróg oddechowych czy białaczki.

Wiele ośrodków na całym świecie prowadzi badania nad zamiennikami formaliny, takimi jak: roztwory wodne aldehydu glutarowego i formaldehydu oraz związki, takie jak: metanol, etanol i aceton. Pomimo nieustannie prowadzonych poszukiwań, nie udało się zsyntetyzować takiego związku, który byłby idealnym zamiennikiem formaliny.

Zainteresowaliśmy się wykorzystaniem nowej grupy związków chemicznych – cieczy jonowych w diagnostyce histopatologicznej. Cieczą jonową nazywamy organiczny związek chemiczny zawierający wiązanie jonowe. Składa się on z kationu organicznego oraz anionu nieorganicznego lub organicznego. Jest to czysta sól organiczna o temperaturze topnienia poniżej 100°C.

Badania były prowadzone *in vitro*, na materiale nowotworowym pobranym od pacjentów Katedry i Kliniki Chirurgii Twarzowo Szczękowej UM w Poznaniu.

Grupę kontrolną stanowił materiał utrwalony w 10% buforowanym roztworze formaliny, a grupę badaną materiał utrwalony w wybranej cieczy jonowej.

Prowadzone badania miały charakter porównawczy. Utrwalony materiał był następnie poddany rutynowym badaniom histologicznym. Wykonano również badania immunohistochemiczne ekspresji cytokeratyny i markera proliferacji Ki-67. Preparaty były oceniane przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Przeprowadzone badania wykazały, iż ciecze jonowe mogą być zastosowane w diagnostyce patomorfologicznej, jako skuteczne zamienniki formaliny. Utrwalany w cieczy jonowej materiał nie zmienia swojej objętości, kolor tkanki pozostaje niezmieniony, natomiast wybarwienie materiału utrwalonego w cieczy jonowej jest intensywniejsze niż materiału utrwalanego w 10% roztworze buforowanej formaliny. Zastosowane ciecze jonowe są nietoksyczne i nie parują, tym samym nie powodują zagrożeń dla zdrowia.

Cel pracy został osiągnięty. Ciecz jonowa (tetrafluoroboran 1-butylo-3-pentyloksymetyloimidazoliowy) jest skutecznym zamiennikiem formaliny w diagnostyce histopatologicznej nowotworów głowy i szyi.

ABSTRACT

This work describes the use of a new group of chemical compounds - ionic liquids in histopathological diagnosis. A selected ionic liquid, presented with a chemical name: 1-butyl-3-pentyloxymethylimidazolium tetrafluoroborate, was used for fixation of examined head and neck cancers as an effective and a safe alternative for formalin.

In 1868, German chemist, William Hoffman discovered a water-soluble gas, which is now known as formaldehyde. Since then, formalin, become a commonly used fixative. For many years a high toxicity of formalin was not perceived as a problem. It is now known that a direct contact with this simple aldehyde or its vapors can lead to a development of serious diseases such as cancers of the upper respiratory tract and leukemia.

Many facilities around the world conduct research on formalin substitutes, such as: aqueous solutions of glutaraldehyde and formaldehyde as well as compounds like methanol, ethanol and acetone. Although the research continues, it failed to synthesize a compound, which could be an ideal replacement for formalin.

We were interested in using a new group of chemical compounds - ionic liquids in histopathological diagnosis. Ionic liquid is an organic compound, which contains ionic bonding. It consists of an organic cation and inorganic or organic anion. This is a pure, organic salt with a melting point below 100°C.

The tests were conducted *in vitro*, on a material collected from patients from Department of Maxillo-Facial Surgery, University of Medical Sciences in Poznań. For a control group a cancer tissue was fixated in 10% buffered formalin, as for the study group a cancer tissue from the same patient was fixated in the selected ionic

liquid.

Ongoing studies were comparative. The fixed material was then subjected to a routine histological examination. Immunohistochemical analysis of cytokeratin expression and the proliferation marker Ki-67 was also performed. The specimens were evaluated using light microscopy.

The study showed that ionic liquids can be used in pathomorphological diagnostics, as an effective replacement for formalin. Material fixed in ionic liquid does not change its volume nor the color of the tissue, which remains unchanged. The staining color of the tissue fixed in ionic liquid is more intense than the color of the tissue fixed in 10% buffered formalin. Used ionic liquids are non-toxic and do not evaporate and that is why they are health hazards free.

The aim of the study was achieved. Ionic liquid (1-butyl-3-pentylloxymethylimidazolium tetrafluoroborate) is an effective substitute for formalin in diagnostics of head and neck cancer.

ANEKS 1 – ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

Uchwałą nr 486/07, z dnia 10 maja 2007 roku, Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, zatwierdziła badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej.

ANEKS 2 – WIDMA

Widmo 1. ^1H NMR tetrafluoroboranu 1-butylo-3-propoksymetyloimidazoliowego.

Widmo 2. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 1-butylo-3-propoksymetyloimidazoliowego.

Widmo 3. ^1H NMR tetrafluoroboranu 3-butoksymetylo-1-butyloimidazoliowego.

Widmo 4. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 3-butoksymetylo-1-butyloimidazoliowego.

Widmo 5. ^1H NMR tetrafluoroboranu 3-pentylksymetylo-1-butyloimidazoliowego.

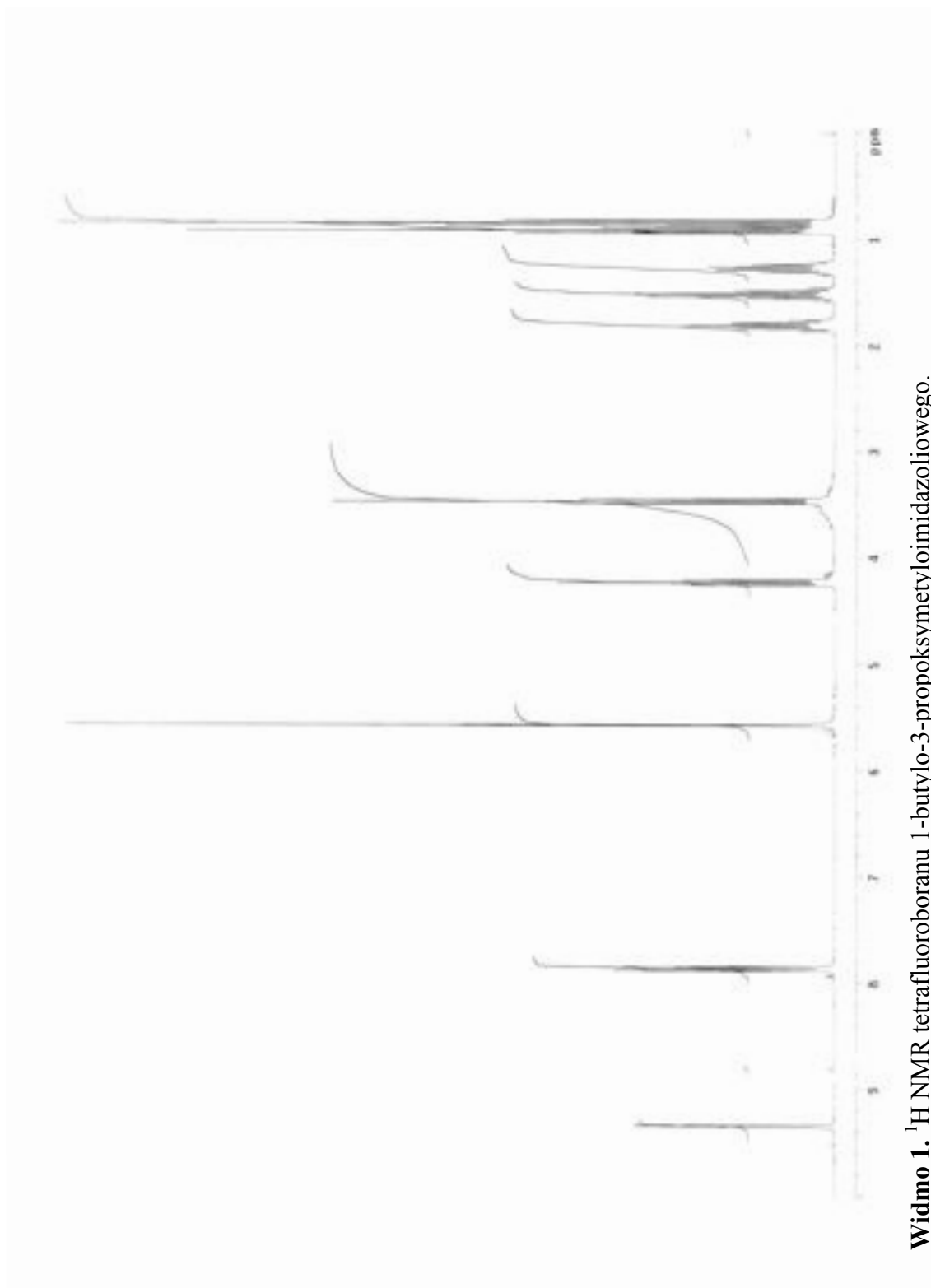
Widmo 6. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 3-pentylksymetylo-1-butyloimidazoliowego.

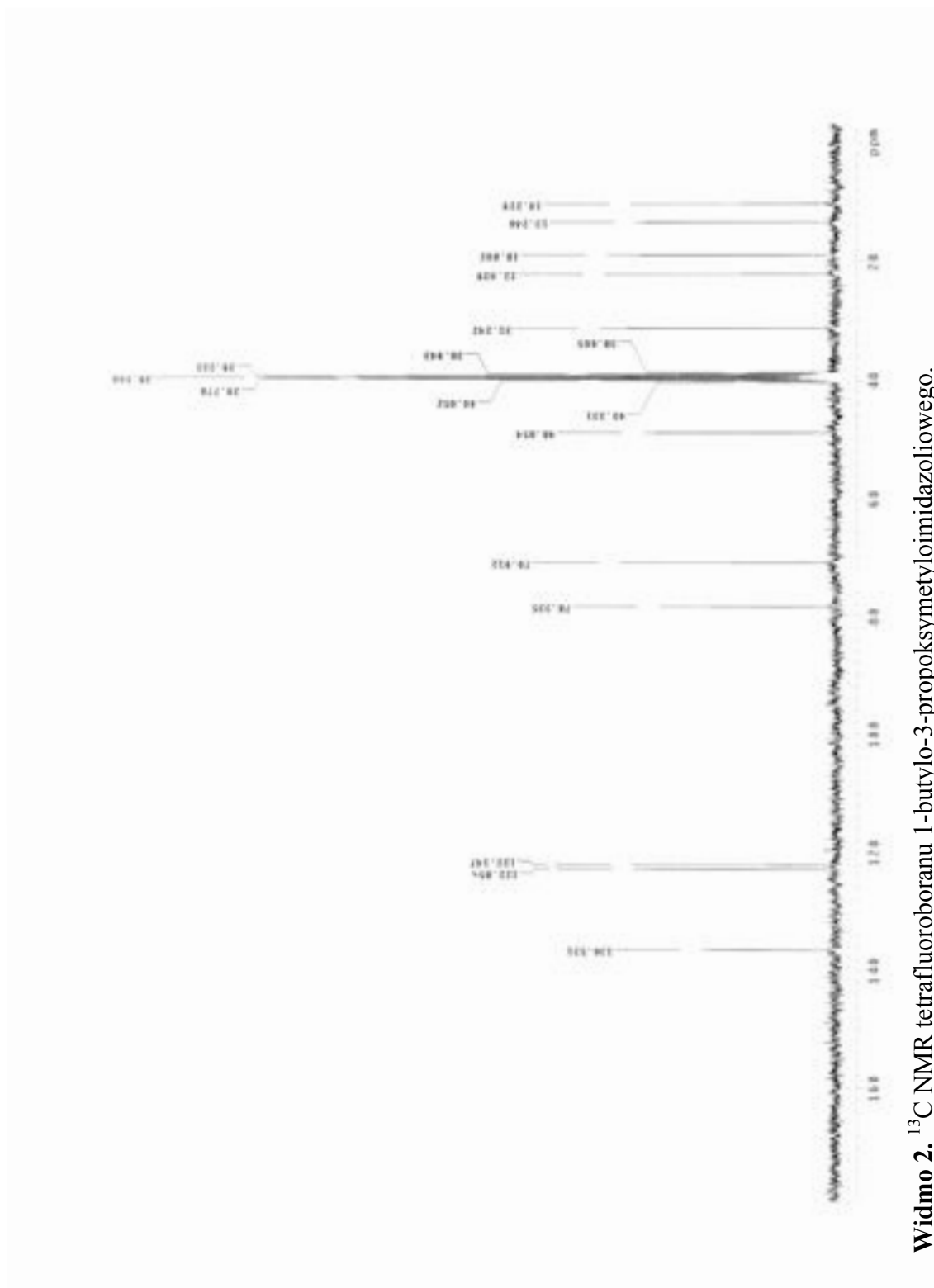
Widmo 7. ^1H NMR tetrafluoroboranu 1-butylo-3-oktylksymetyloimidazoliowego.

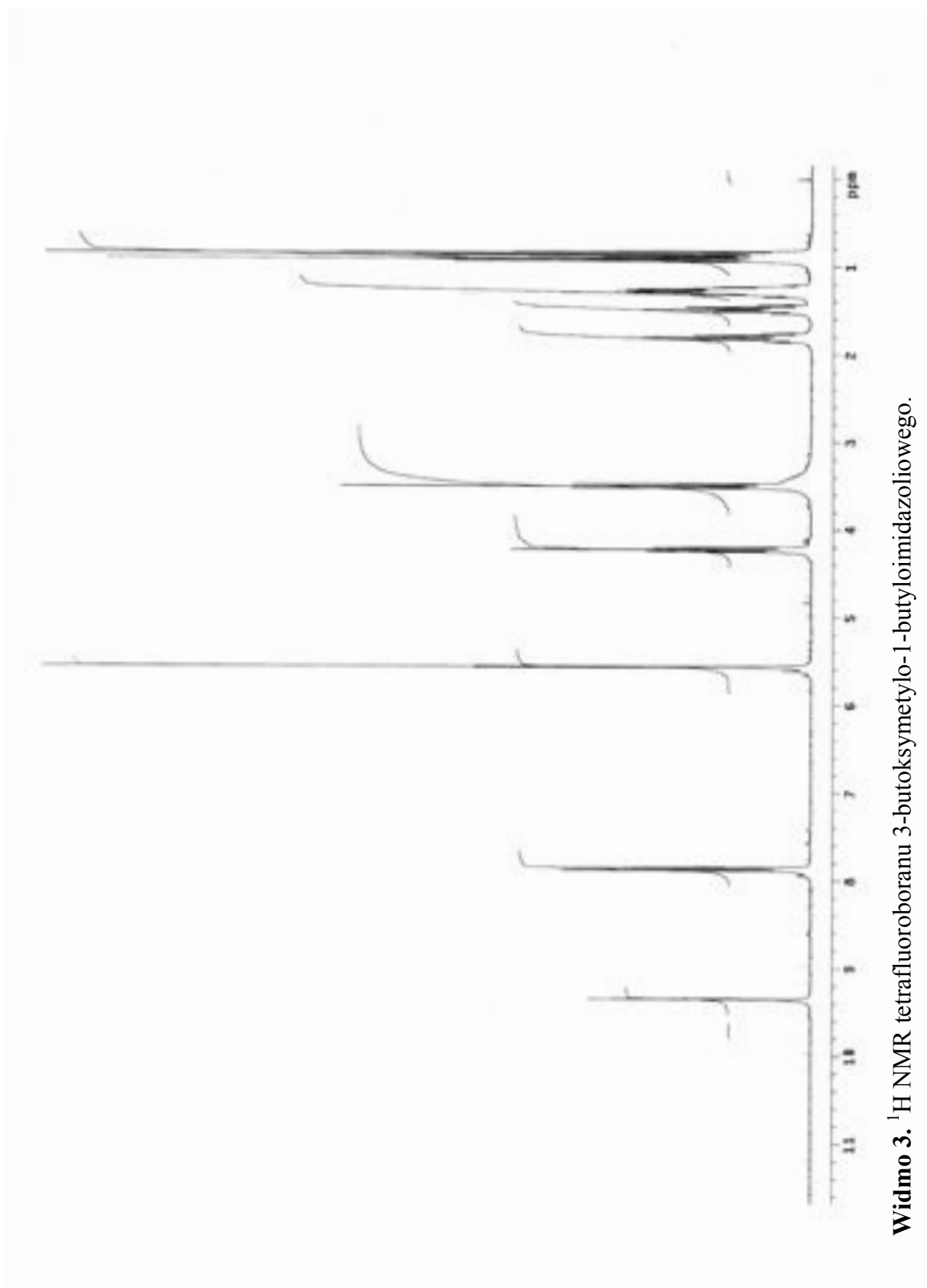
Widmo 8. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 1-butylo-3-oktylksymetyloimidazoliowego.

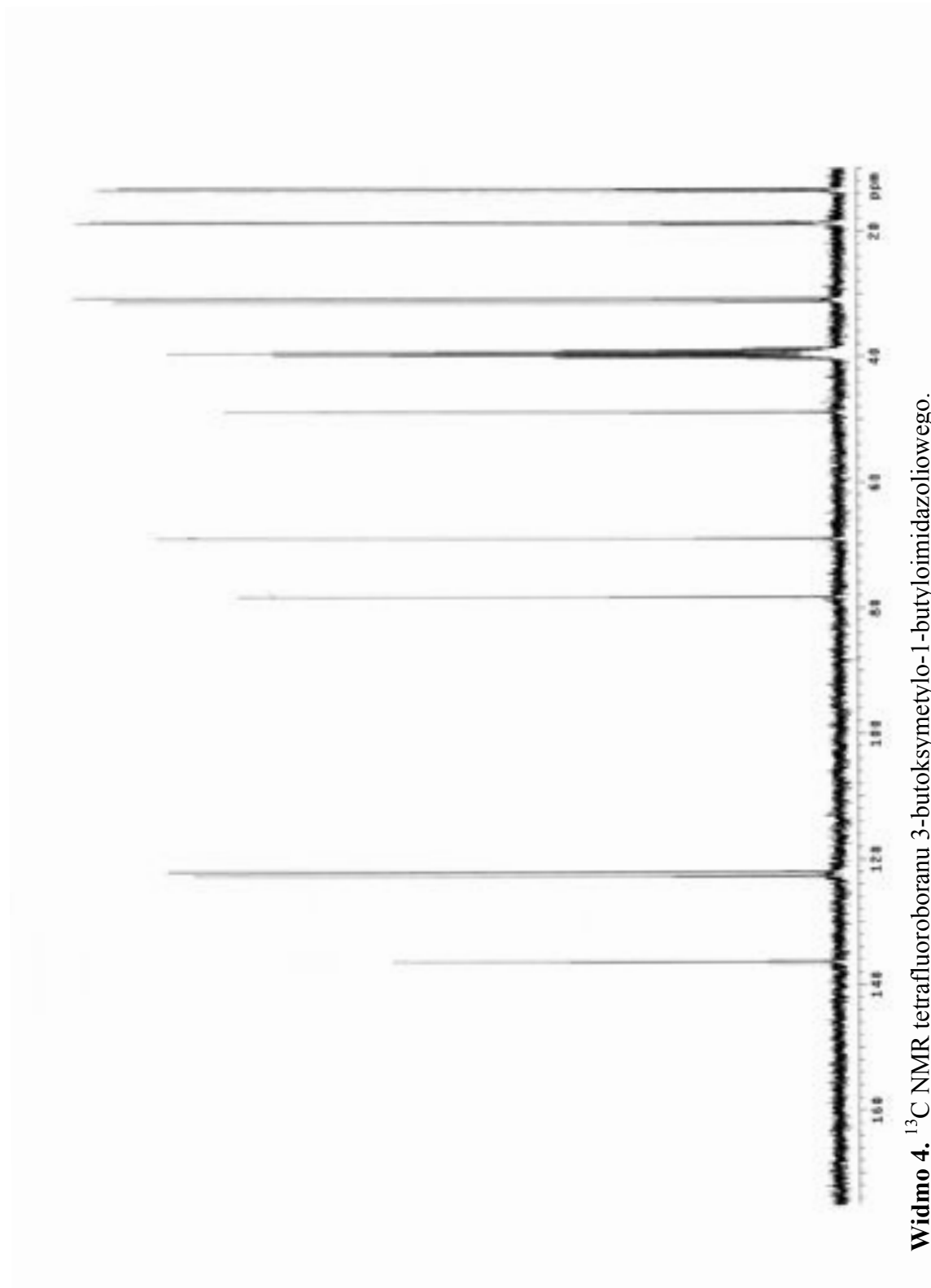
Widmo 9. ^1H NMR tetrafluoroboranu 1-butylo-3-nonylksymetyloimidazoliowego.

Widmo 10. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 1-butylo-3-nonylksymetyloimidazoliowego.

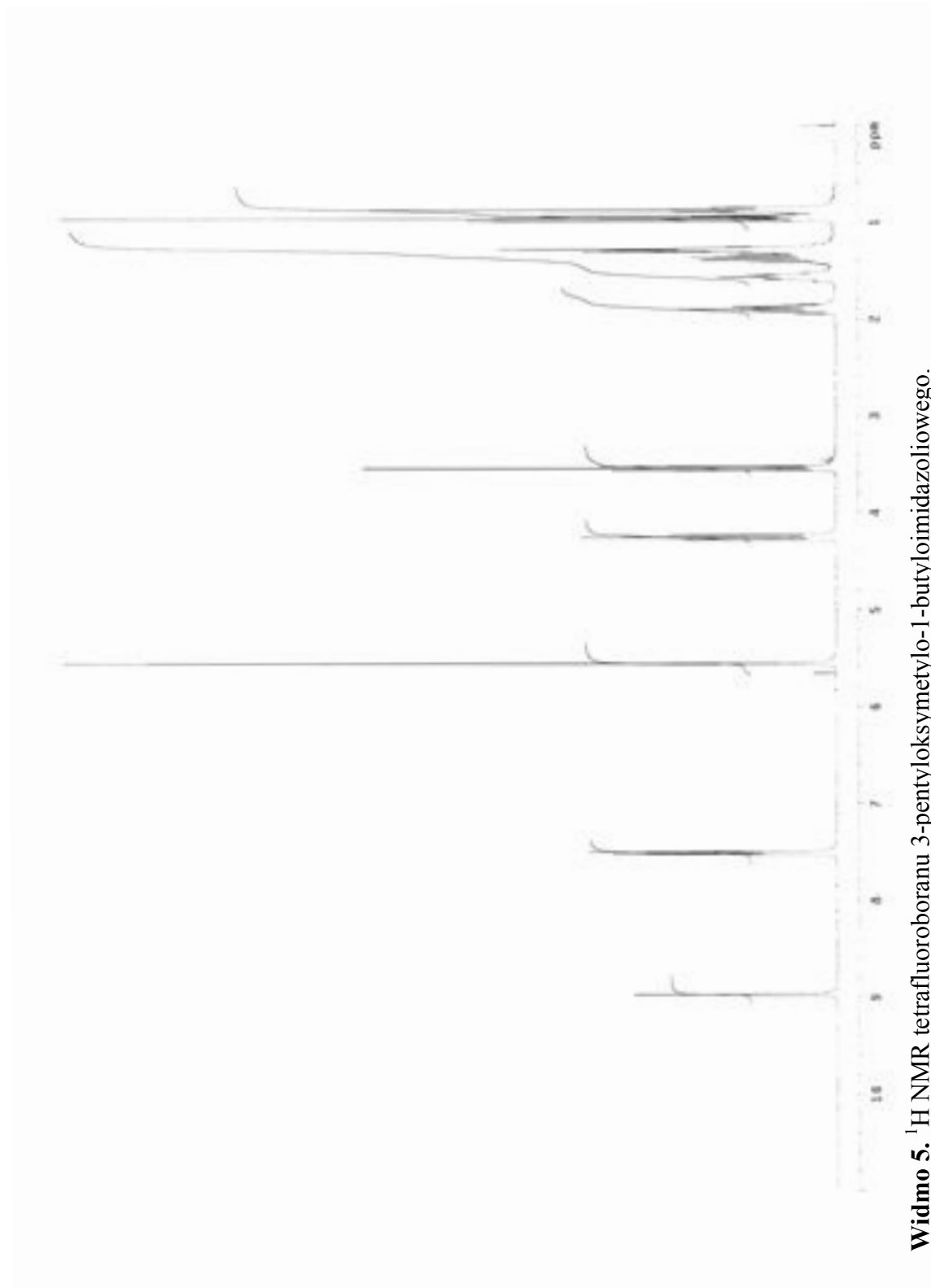




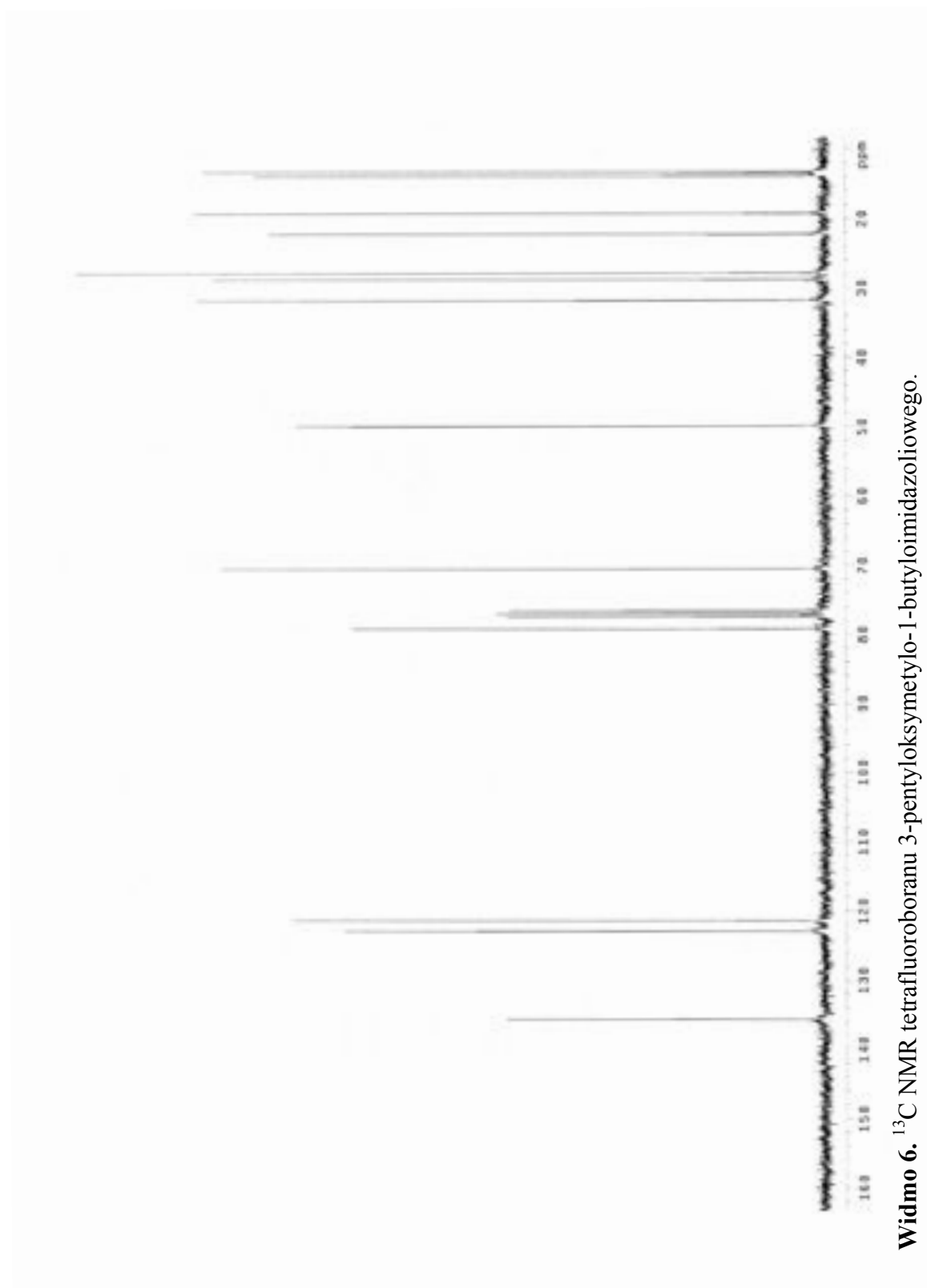


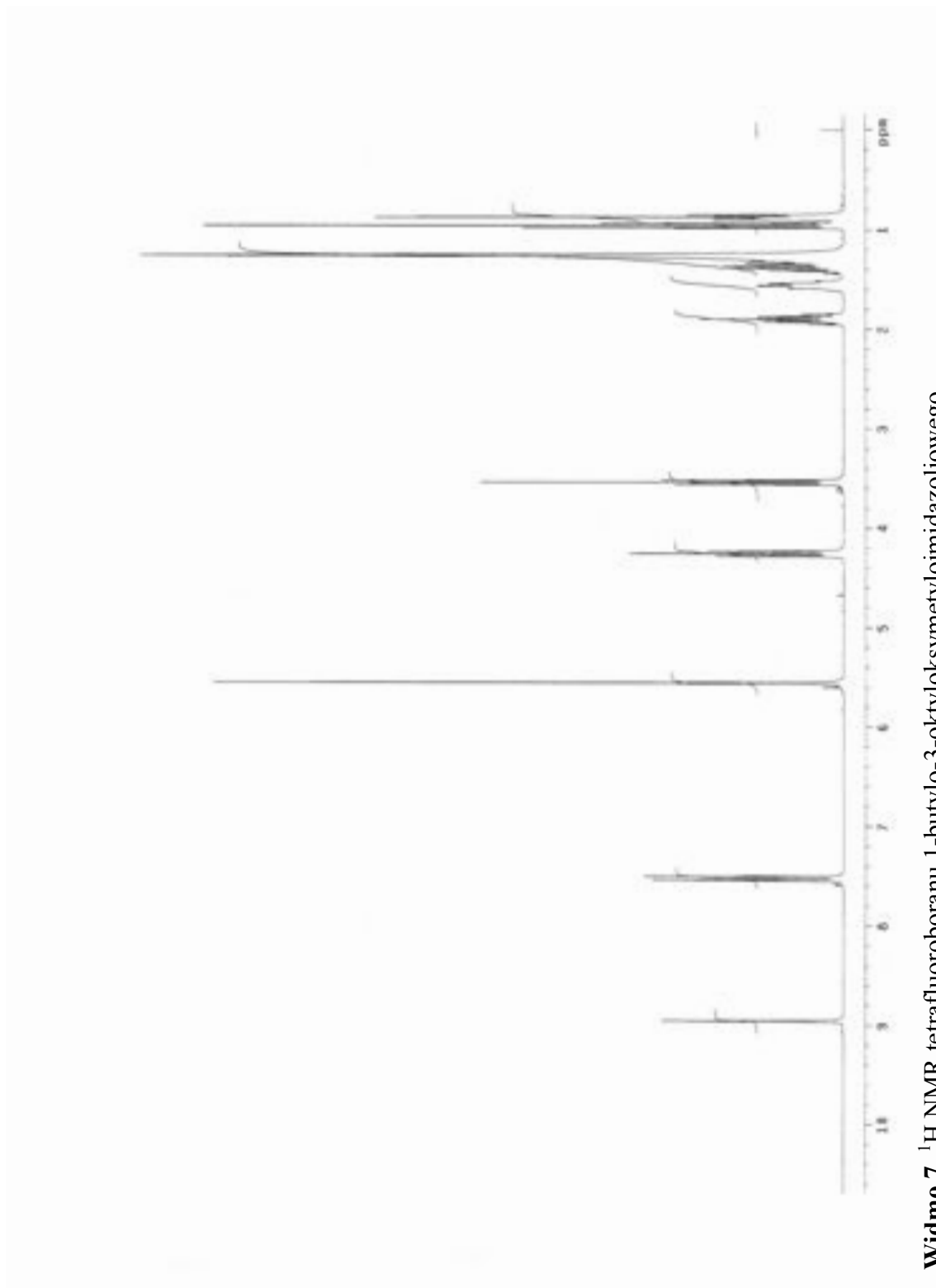


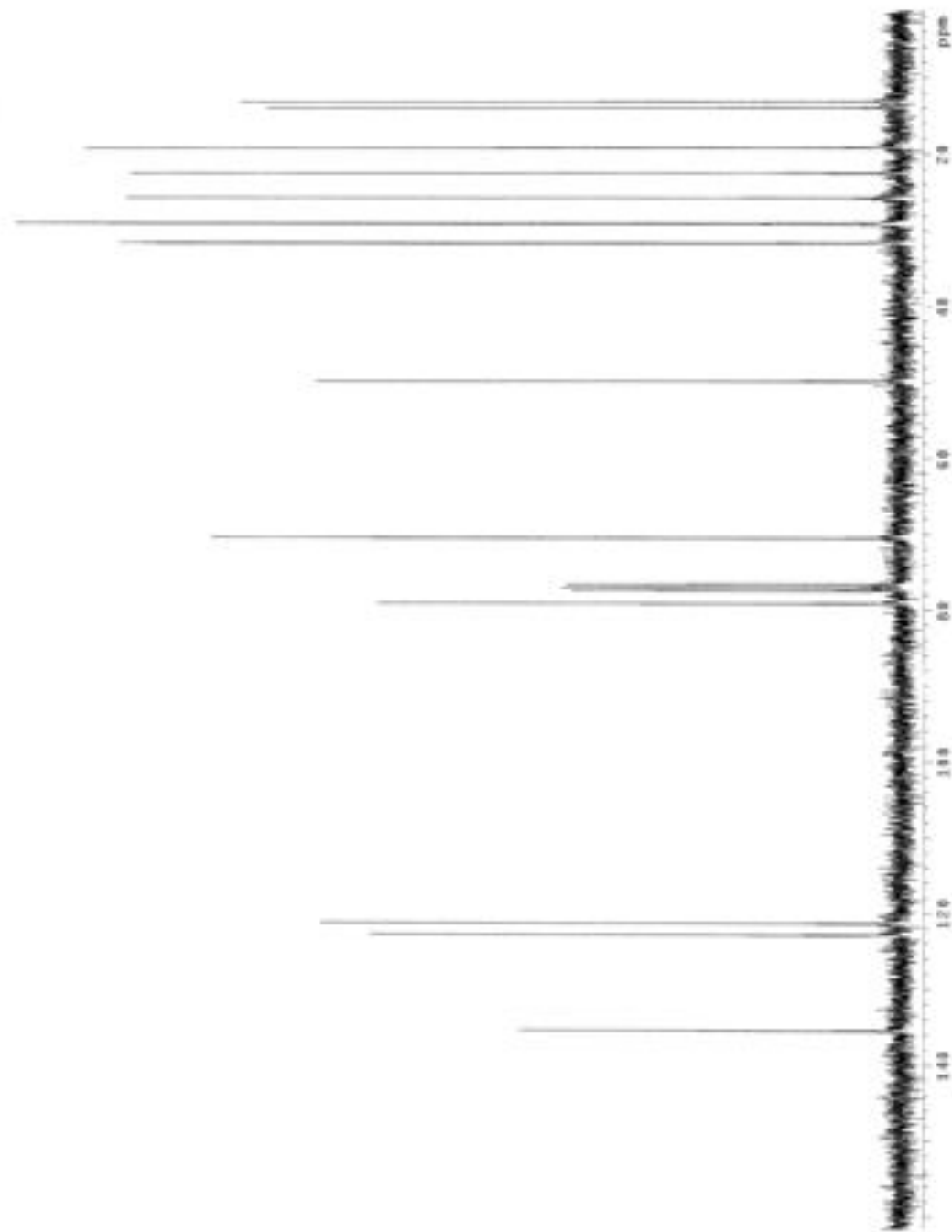
Widmo 4. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 3-butoksymetylo-1-1-butyloimidazoliowego.



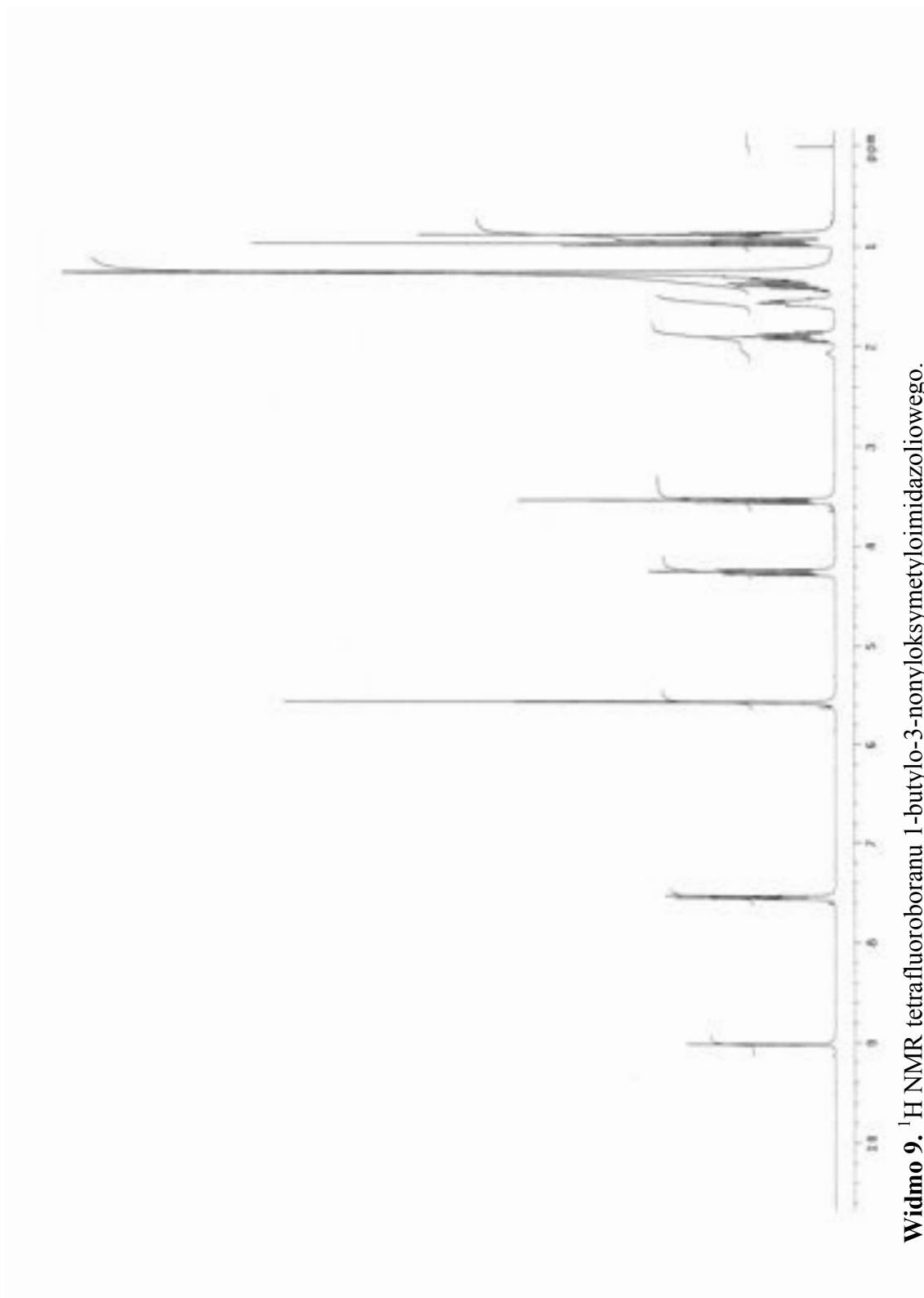
Widmo 5. ^1H NMR tetrafluoroboranu 3-pentylloxymetylo-1-butylimidazoliowego.

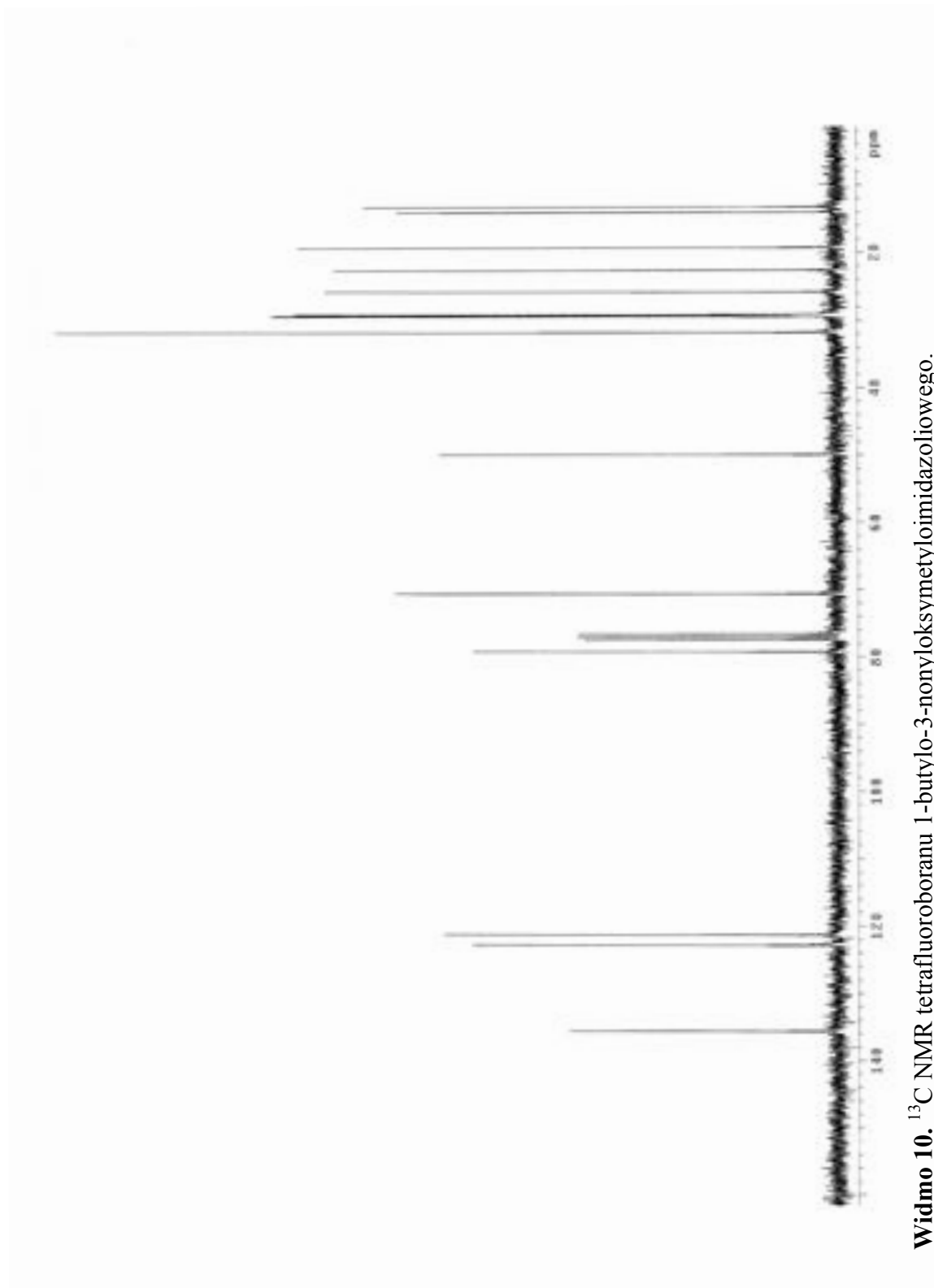






Widmo 8. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 1-butyl-3-(3-oktyloksymetyloimidazoliowego).





Widmo 10. ^{13}C NMR tetrafluoroboranu 1-butyl-3-nonyloxymetyloimidazoliowego.