

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

# Glanda Pineală. Cercetări morfologice cu implicații clinice.

---

Doctorand **Bogdan Alexandru Gheban**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Maria Crișan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
1. Date istorice	17
2. Date anatomice	19
3. Date histologice	21
4. Date fiziologice	27
5. Date anatomo-patologice	31
5.1. Clasificarea bolilor	31
5.1.1. Patologie non-tumorală	31
5.1.2. Patologie tumorală	32
6. Date clinice	37
6.1. Neuro-psihiatrie	37
6.2. Endocrinologie	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1 – Modificările de îmbătrânire ale glandei pineale.	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	54
3.3. Material și metodă	54
3.4. Rezultate	58
3.5. Discuții	66
4. Studiul 2 – Analiza morfometrică digitală a activității glandei pineale cu implicații clinice.	69
4.1. Introducere	69
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	73
4.3. Material și metodă	73
4.4. Rezultate	74
4.5. Discuții	77
5. Studiul 3 – Tehnici de morfometrie digitală histologică a glandei pineale.	83
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	87
5.3. Material și metodă	87
5.4. Rezultate	92
5.5. Discuții	96
6. Concluzii generale	99
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	101
<b>REFERINȚE</b>	102
<b>ANEXE</b>	113

# INTRODUCERE

Glanda pineală este un organ cu funcție neuroendocrină, de talie mică, situat deasupra cortului cerebelos, adesea neobservat și neglijat în cadrul procedurii standard anatomo-patologic al autopsiei. Deși se cunosc foarte puține, există multe studii care atestă rolul glandei în homeostazie prin mecanisme de feedback complexe, strâns legate de întregul sistem endocrin. De asemenea glanda pineală este în directă legătură cu sistemul imunitar, aparatul vestibular și vizual, echilibrul psihic al omului, ritmul circadian, imaginație, cogniție și sexualitate.

Rolul acestei glande a fost mult timp subdimensionat și ignorat, dar odată cu avansarea tehnologică a cercetării, tot mai multe studii sunt efectuate asupra ei, și cercetarea hormonului principal sintetizat, melatonina, a prins avânt tot mai mare în ultimii 40 ani, datorită multitudinii de efecte benefice și modulatorie care îl prezintă asupra corpului uman. Există o tendință de mistificare a glandei pineale, cu multiple teorii alternative, non-științifice care se răspândesc pe diverse platforme digitale pseudoștiințifice.

Majoritatea studiilor din literatură sunt efectuate folosind metode radio-imagistice, studiile histologice fiind limitate preponderent la model animal, cele umane fiind foarte reduse ca număr, cu eșantion limitat și inegal reprezentat geografic, aspect important datorită variabilității sezoniere și circadiene ce le prezintă glanda pineală.

Nu există la ora actuală nici un studiu național de natură histopatologică care să abordeze acest organ, în mod particular în cadrul autopsiilor. La nivel internațional a existat o explozie a cercetărilor adresate glandei pineale, mai ales histologic, între anii 1960 și 1990, ulterior fiind o pauză, neexplicată, a publicațiilor. În ultimii 10 ani s-a redeschis interesul față de acest organ, în mod special datorită noilor proprietăți terapeutice pe care melatonina le prezintă.

Teza de doctorat cuprinde trei studii de cercetare translațională, care au ca obiective realizarea unor analize și măsurători morfometrice digitale asupra a 72 de glande pineale umane, recoltate de la cadavre, în cadrul autopsiei de rutină, din cadrul secțiilor de Anatomie Patologică din Cluj-Napoca, ale Spitalului Clinic Județean de Urgență și Spitalul Clinic de Copii. Abordarea histologică digitală este o tehnică recent implementată care oferă date obiective matematice, care împreună cu examinarea clasică la microscopul optic, aduce informații mult mai concrete și puțin supuse bias-ului observatorului. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul cadrelor didactice ale catedrei de Biostatistica și Metodologia Cercetării Științifice a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Colorațiile imunohistochimice au fost efectuate în cadrul laboratorului de Anatomie patologică a Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Prof. Dr. Octavian Fodor", iar lamele microscopice au fost scanate digital, la magnificație de 40x, în cadrul secției de Anatomie Patologică a Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca.

Studiile din cadrul cercetării sunt de tip retrospective, observaționale și analitice.

Primul studiu urmărește analiza microscopică digitală a proceselor de îmbătrânire ale parenchimului pineal, în funcție de grupele de vârstă ale pacienților decedați. Au fost examinate calcificările glandei pineale folosind microscopie cu lumină polarizată în cadrul Catedrei de Anatomie Patologică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, iar morfometria a fost efectuată folosind software specializat precum CaseViewer de 3DHISTECH, Adobe Photoshop și ImageJ. Au fost examinate cu precădere procesele de glioză ce înlocuiesc parenchimul secretor, folosind markerul imunohistochimic glial fibrillary acidic-protein (GFAP) și cuantificarea procentajului de parenchim pozitiv, precum și intensitatea colorației. De asemenea au fost calculate volumele glandulare și procentajul de

parenchim înlocuit cu calcificările și chistele pineale de natură glială. Datele obținute au fost analizate statistic și comparate cu studiile din literatură efectuate folosind metodologie microscopică non-digitală.

Al doilea studiu abordează în mod particular parenchimul activ, secretor al glandei, folosind doi markeri imunohistochimici neuroendocrini synaptofizică (SYN) și enolaza neuron-specifică (NSE), precum și neurofilament (NF). A fost evaluat procentajul de parenchim pozitiv și intensitatea colorațiilor, folosind software specializat de analiză de imagine, au fost colectate datele clinice ale pacienților decedați, cu accent pe patologia de natură endocrină și neurologică și analiză statistică pentru corelarea implicațiilor clinice a datelor morfometrice.

Al treilea studiu a abordat tehnicile de morfometrie histologică digitală cele mai facile în analiza glandei pineale, precum și dezvoltarea unui software propriu numit MorphoRGB. Aplicația dezvoltată are ca și scop facilitarea tehnicilor de morfometrie care urmăresc cuantificarea imunohistochimică, fiind mult mai ușor de folosit față de variantele existente și consacrate. S-a urmărit procentajul pozitiv imunohistochimic, precum și intensitatea colorațiilor a patru colorații imunohistochimice, folosind tehnica tradițională optică, software-ul consacrat în cercetare ImageJ și MorphoRGB, cu aplicarea testelor statistice în vederea aprecierii semnificației statistice dintre metodologiile abordate.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **Ipoteza de lucru/obiective**

Teza de doctorat este împărțită în trei studii. Toate cele trei studii presupun recoltarea și analiza histologică a glandei pineale, folosind tehnici de colorație imunohistochimică, scanare digitală, software specializat de analiză de imagine, tehnici de morfometrie și teste statistice. Am dezvoltat această temă de cercetare doctorală pornind de la două idei principale. În primul rând, există foarte multe speculații legate de glanda pineală, marea majoritate fiind pseudoștiințifică, iar dorința de a demistifica aceste teorii, prin știință bazată pe dovezi, a fost un factor motivant. De asemenea lipsa studiilor desfășurate pe acest organ, atât la nivel internațional, cât mai ales la nivel național, a fost un alt promotor pentru alegerea temei. Literatura actuală, recentă, se concentrează preponderent pe studii histologice efectuate experimental, pe șoareci, dar numărul este foarte restrâns, majoritatea studiilor histologice fiind publicate în anii 1980, folosind tehnici subiective. Majoritatea studiilor se concentrează pe efectele farmacologice ale melatoninei sau pe morfometrie obținută imagistic, și mai puțin accent se pune pe morfologia glandei pineale, și modificările pe care le întâlnim la acest nivel în funcție de îmbătrânire și comorbidități.

Materialul de studiu este obținut în urma autopsiilor de rutină efectuate în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca și al Spitalului de Urgență de Copii Cluj-Napoca, prin recoltarea glandei pineale și a structurilor adiacente, precum și din colectarea datelor clinice de interes, în mod special patologie endocrină, metabolică și neurologică. Obiectivele principale ale studiilor au fost elucidarea modificărilor morfologice care apar la nivelul parenchimului glandular pineal, pe măsură ce avansăm în vârstă sau în funcție de diferite comorbidități precum diabetul zaharat de tip 2, obezitatea, pancreatita cronică, hipertensiunea arterială și demența. Un al obiectiv principal a fost descoperirea de tehnici adecvate de morfometrie histologică digitală, folosind țesut scanat, pentru analiza unui organ endocrin, de talie redusă, pentru obținerea unor date obiective și corecte. Rezultatele semnificativ statistice obținute au fost redactate, discutate și publicate în literatura internațională.

### **Metodologie generală**

Au fost recoltate 112 glande pineale în cadrul autopsiilor de rutină efectuate pe cadavre umane în perioada ianuarie 2017 – martie 2019, în cadrul secțiilor de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Județean de Urgență și a Spitalului Clinic de Copii Cluj-Napoca, România și Spitalului Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca, România. Patruzeci de glande au fost considerate nepotrivite pentru analiză din cauza leziunilor patologice vasculare din vecinătate sau a autolizei avansate. 72 de cazuri de autopsii aleatorii la copii și adulți decedați din diverse cauze au fost selectate. În studii au fost incluse 33 de cazuri de sex feminin și 39 de cazuri de sex masculin, 6 pacienți având vârsta cuprinsă între 0-25 de ani, 21 cu vârsta între 46-65 și 45 au avut vârsta între 66 și 96 de ani. Studiile a fost realizate în conformitate cu Declarația de la Helsinki și protocolul a fost aprobat de comitetul de etică al Universității de Medicină și Farmacie Cluj-Napoca (05.07.2018). Datele antropometrice, clinice, histologice și morfometrice au fost colectate anonim.

Odată recoltată glanda pineală, a fost fixată în formaldehidă 10%, secționată sagital și longitudinal, și apoi prelucrată conform tehnicii histologice standard: deshidratare prin trecere în soluții de concentrație crescândă de alcool etilic și înlocuirea acestuia prin trecerea în soluții de alcool/xilen de concentrație crescândă pentru ca odată ajuns la xilen 100% să se încorporeze piesa în parafină histologică. Toate blocurile de parafină obținute au fost secționate obținând secțiuni tisulare de 3 micrometrii depuse pe lame de sticlă. Acestea au fost deparafinate și apoi colorate manual cu hematoxină-eozină (H&E) și folosind anticorpii Ready-to-use imunohistochimici: GFAP, Sinaptofizină, Enolaza neuron specifică și Neurofilament, utilizând apoi un kit de detecție imunohistochimic și soluție de spălare 10x concentrată pe lamele acoperite cu silan. Lamele colorate au fost scanate digital la rezoluție de 40x utilizând un scanner de lame 3D HISTECH PANNORAMIC SCAN II. Analiza morfometrică a fost realizată folosind software-ul 3D HISTECH Case-Viewer, Adobe Photoshop CC 2019 și ImageJ – Fiji.

Datele care prezintă distribuție normală au fost descrise ca medie și abatere standard (SD), în timp ce datele care prezintă distribuție non-normală au fost descrise ca interval median și intercvartil (IQR). Variabilele nominale au fost descrise folosind frecvențe relative (procente). Testele Kolmogorov-Smirnov au fost folosite pentru a evalua normalitatea variabilelor cantitative. Diferențele dintre loturile investigate au fost evaluate cu ajutorul unor teste parametrice (test t student și ANOVA) pentru variabilele continue cu distribuție normală și teste neparametrice (testul Mann-Whitney U, Wilcoxon) pentru variabilele continue cu distribuție nenormală. Au fost aplicate teste post-hoc cu corecții comune (Bonferroni, Tukey, Tamhane) pentru a investiga diferențele pe perechi între grupurile investigate. Pentru proporții, s-a aplicat testul Fisher sau testul chi-pătrat Pearson, pe baza numărărilor adecvate ale tabelelor de frecvențe așteptate. Corelațiile și regresii liniare au fost utilizate pentru evaluarea asocierii dintre variabilele numerice. Modelele de regresie logistică univariate și multivariate au fost utilizate pentru a modela influența variabilelor dihotomice asupra rezultatelor investigate. Toate testele au fost considerate semnificative la valorile  $p < 0,05$ . Intervalele de încredere (95% CI) au fost calculate pentru a facilita interpretarea anumitor rezultate. Descrierea statistică și analizele au fost efectuate folosind IBM SPSS Statistics 25 și Microsoft Excel 2016.

## **Studiu 1. Modificările de îmbătrânire ale glandei pineale.**

### **Ipoteza de lucru**

Scopul acestui studiu, retrospectiv observațional și translațional, este de a furniza date histologice și morfometrice referitoare la modificările morfologice survenite la vârstă înaintată, comparativ cu tinerii. Au fost apreciate gradul de calcificare, particularitățile acestor calcificări, volumul glandei, țesutul glial și

chistele gliale în relație cu vârsta, sexul și datele clinice ale pacienților, care sunt atât pacienți de vârstă pediatrică, cât și de vârstă adultă.

## **Material și metodă**

Studiul a fost conceput conform metodologiei generale descrisă la pagina 48 privind tehnica de prelevare și prelucrare a glandei pineale umane. În vederea efectuării unor analize morfometrice asupra celor 72 glande pineale selectate, au fost efectuate colorații uzuale H&E, precum și colorația imunohistochimică GFAP. Datele analitice asupra calcificărilor au fost efectuate folosind tehnica microscopiei cu lumină polarizată. A fost utilizat scorul IRS în vederea cuantificării imunoreactivității anticorpului GFAP. Procentajul imunopozitiv de țesut a fost convertit din pigmentul DAB, contra colorat cu hematoxilină, cu filtrul specializat de spectru Roșu/Verde/Albastru al programului de vizualizare a lamelor digitale CaseViewer, fiind apoi cuantificat utilizând funcțiile analitice ale programului ImageJ/Fiji.

## **Rezultate și concluzii**

Treizeci și trei de femei și 39 de bărbați au fost incluși în studiu, grupați în trei grupe de vârstă: 0–25, 46–65 și 66–96 de ani. Volumul maxim al glandei a fost găsit în intervalul de vârstă 46–65. Volumul mediu global a fost de 519 mm<sup>3</sup>, principalele tipuri arhitecturale au fost lobulare și insulară, iar procentul mediu de calcifiere pineală a fost de 15% din glandă, atingând vârful în grupa de vârstă 66–96, cu formă predominant globulară.

Chisturile gliale au fost găsite în 20,8% din cazuri. Intensitatea colorației imunohistochimice GFAP a fost maximă la grupa de vârstă pediatrică, dar extinderea țesutului glial a fost mult mai mare la pacienții vârstnici. Procesul degenerativ al glandei pineale poate fi cuantificat prin măsurarea parenchimului normal, a calcificărilor, a țesutului glial și a chisturilor gliale. Morfometric s-au observat câteva diferențe în comparație cu studii similare efectuate în literatură. Studiul actual, din păcate, nu are o grupă de vârstă 26–45 de ani. Tehnicile digitale par să ofere o analiză mai exactă, dar a prezentat rezultate similare studiilor efectuate peste 40 cu ani în urmă, oferind deci informații importante despre tendințele evolutive. Creșterea țesutului glial, calcificările și chisturile gliale au rol definitoriu ca modificări legate de vârstă ale glandei pineale.

Studiul proceselor degenerative care apar la nivelul glandei pineale ar putea explica anumite tulburări neurologice și endocrine pe care le prezintă pacienții vârstnici, fără nicio altă cauză cunoscută, deoarece calcificările și creșterea țesutului glial vor scădea activitatea secretorie normală a glandei pineale, în special în ceea ce privește melatonina și serotonina. Prezența chisturilor pineale în studiul nostru a fost de 3 ori mai mică decât cea prezentată de Sigurdardottir LG et al, iar prezența calcificărilor a fost cu 6% mai mică în studiul nostru decât cel islandez, sugerând că modificările s-ar putea datora luminii sezoniere diferite, perioada de expunere pe care o are populația islandeză, în comparație cu expunerea la lumină sezonieră normală din Europa de Est.

## **Studiu 2. Analiza morfometrică digitală a activității glandei pineale cu implicații clinice.**

### **Ipoteza de lucru**

Scopul acestui studiu este de a furniza date anatomice și histo-morfometrice obținute prin tehnici digitale din glandele pineale umane, examinate post-mortem, folosind colorații de Hematoxilină-Eozină și imunohistochimice neuroendocrine, apreciind procentul de parenchim secretor activ, stocarea veziculelor neuro-hormonale, volumul țesutului glial, prezența chisturilor gliale în relație cu vârsta, sexul și prezența unor comorbidități precum obezitatea, diabetul zaharat tip 2, demența, hipertensiunea arterială, ateroscleroza,

cașexia, gușa și pancreatita cronică atât la copii cât și la adulți. Datele morfometrice de la markerii neuroendocrini și structurali au vizat identificarea variațiilor cu privire la patologia preexistentă pe care o prezentau pacienții.

## **Material și metodă**

Pentru conceperea studiului s-a respectat metodologia generală. Cele 72 de glande pineale au fost colorate uzual H&E și imunohistochimic folosind Synaptofizină, Enolaza neuron specifică și Neurofilament. A fost efectuată scanarea digitală și prelevate imagini pentru analiză folosind aplicația ImageJ/Fiji. Imunoreactivitatea anticorpilor folosiți a fost cuantificată prin scorul IRS.

## **Rezultate și concluzii**

Acest studiu evidențiază și posibilitatea evaluării glandei pineale în timpul autopsiilor medico-legale și de rutină, în special pentru pacienții cu afecțiuni endocrine, neurologice, și tulburări psihiatrice, eventual schimbând rezultatul diagnosticului autopsiei sau oferind o mai bună perspectivă asupra cazului.

Principalul punct forte al studiului constă în numărul mare de glande pineale umane care au fost examinate folosind programul de scanare digitală și analiză a imaginilor. Deși ar fi fost de dorit un număr mai mare de subiecți pediatrici, există în prezent foarte puține studii pe oameni, indiferent de grupa de vârstă, în literatura științifică. Creșterea parenchimului secretor a fost observată la pacienții cu pancreatită cronică, hipertensiune arterială și adenom al glandei suprarenale. Activitate redusă a fost observată la pacienții cu diabet de tip 2, obezitate, calcifiere pineală avansată, demență mixtă și vârstă de peste 45 ani, scăzând progresiv. Nu au existat modificări asociate cu gușa, cașexia sau ateroscleroza poligonului Willis. Nu au fost găsite diferențe semnificative între gen.

Activitatea glandei pineale poate fi evaluată prin evaluarea imunohistochimică cantitativă a markerilor neuroendocrini și structurali ai pinealocitelor precum și observarea țesutului glial și a calcificărilor. Este nevoie de cercetări suplimentare pentru a evalua impactul clinic al acestor modificări morfologice asupra sistemelor neuroendocrine, cu implicații clinice în endocrinologie, neurologie și chiar psihiatrie. Tehnicile digitale oferă o analiză mai exactă a datelor histologice. Aceste descoperiri oferă o nouă perspectivă, morfo-funcțională, cu privire la rolul glandei pineale în diferite patologii subliniind faptul că studierea acesteia nu ar trebui neglijată în evaluarea clinică, imagistică și în autopsia standard.

## **Studiu 3. Tehnici de morfometrie digitală histologică a glandei pineale.**

### **Ipoteza de lucru**

Studiul își propune să ofere un instrument pentru morfometria digitală a preparatelor histologice, MorphoRGB, în special a glandei pineale și a altor organe de dimensiuni mici, care sunt ușor de digitalizat în întregime. Instrumentul nostru oferă o abordare simplificată a unei acțiuni deja posibile care poate fi efectuată folosind programe de analiză de imagine consacrate, cum ar fi ImageJ, în special pentru preparate histologice digitale care au instrumente RGB (Roșu-Verde-Albastru) precum SlideViewer de la 3DHISTECH. Instrumentul oferă date morfometrice prin analiza caracteristicilor histologice specifice oferite de colorațiile imunohistochimice, permițându-ne astfel să evaluăm mai bine diferite caracteristici patologice ale unui organ sau caracteristici morfo-funcționale, în special în cazul utilizării pe organe endocrine, precum glanda pineală. Obiectivul nostru este de a oferi un instrument ne-inferior, dar simplificat și ușor de utilizat în analiza imaginii digitalizate și al lamelor microscopice integral scanate, element util în domeniul diagnostic al histopatologiei și cercetarea histologică.

### **Material și metodă**

Au fost folosite 72 cazuri și colorațiile imunohistochimice SYN, NF, NSE, GFAP. S-a efectuat scanarea digitală a preparatelor microscopice, precum și interpretarea optică. Am comparat evaluarea optică manuală a patologului cu rezultatele oferite de ImageJ și programul nostru original, MorphoRGB, accesibil folosind acest link web: <https://morphometry.newlatitudes.ro/>. Programul interpretează valorile RGB ale fiecărui pixel individual al țesutului digitalizat. Pe măsură ce imaginea este analizată, se face o sumă de valori pentru fiecare canal RGB separat. În cele din urmă, prin împărțire, programul oferă automat valorile proporției fiecărui canal pentru întreaga imagine. Procesul de analiză durează 1-3 secunde, în funcție de performanțele computerului utilizat. Diagramele Bland-Altman au fost reprezentate pentru a ilustra acordul dintre ImageJ și MorphoRGB în ceea ce privește procentul mediu de GFAP, NSE, NF și SYN, precum și intensitatea anticorpilor dintre analiza optică și ImageJ.

## Rezultate și concluzii

Obiectivul studiului a fost de a folosi programele utilizate în mod curent pe scară largă, cum ar fi SlideViewer și ImageJ, într-o metodologie modernă și obiectivă pentru a efectua morfometria histologică a glandei pineale. Am dezvoltat propriul program, MorphoRGB în scopul de a crea o interfață mai ușor de utilizat pentru anumite funcții morfometrice.

Corelații puternice și semnificative statistic au fost găsite și reprezentate folosind diagrame Bland-Altman între cele două software de analiză a imaginii în cazul procentului și intensității medii ale GFAP, NSE, NF și SYN. Software-uri precum SlideViewer și ImageJ, cu propriul software MorphoRGB, au fost utilizate pentru a efectua morfometria histologică a glandei pineale. Morfometria digitală a unui organ mic, cum ar fi glanda pineală, este ușor de realizat utilizând lame microscopice scanate digital și software-ul de analiză digitală a imaginilor, cu potențial utilizare în medii clinice. MorphoRGB nu este inferior față de ImageJ, oferind date puțin mai precise și este mai ușor de utilizat în ceea ce privește măsurătorile procentului de parenchim colorat prin imunohistochimie. Tehnicile morfometrice descrise au valoare potențială în practica curentă, modelele experimentale pe animale mici și glandele pineale umane, sau alte organe endocrine de dimensiune redusă care pot fi incluse complet într-o secțiune întreagă a lamei microscopice. Software-ul utilizat are aplicabilitate în cuantificarea colorațiilor imunohistochimice.

## Concluzii generale

Studiile de cercetare au avut ca obiectiv analiza histologică digitală, prin metode de morfometrie, a 72 de glande pineale umane recoltate în cadrul autopsiilor anatomo-patologice din cadrul activității spitalicești. Nu există multe studii histologice în literatură, care să folosească țesut uman pineal într-o cantitate semnificativă, evaluând țesut din majoritatea grupelor de vârstă, cu diferite comorbidități.

Principalele modificări ale glandei pineale, observate în primul studiu, legate de vârstă includ înlocuirea parenchimului secretor normal al glandei pineale cu țesut glial, calcificări și chisturi gliale. Nu există diferențe semnificative legate de sex. Arhitectura glandei are, de asemenea, un model în schimbare pe măsură ce trece în vârstă, observându-se dispoziție celulară în placarde la populația pediatrică, lobulară la adulți și insulară la vârstnici.

Calcificările extrapineale, cunoscute și sub denumirea de calcificări metastatice, au un rol important în calcificarea globală a glandei pineale. Natura acestor calcificări trebuie studiată în continuare, lumina polarizată oferind date de bază pentru a lucra. Există diferite constatări găsite, pe baza locațiilor geografice, cu privire la aceste modificări degenerative, principalele diferențe fiind variațiile sezoniere ale expunerii la lumină pe glob.

Studiul al doilea a cuantificat parenchimul secretor activ al glandei pineale în diferite comorbidități ale pacienților autopsiați. Nu au fost găsite diferențe semnificative între gen.



Creșterea parenchimului secretor a fost observată la pacienții cu pancreatită cronică, hipertensiune arterială și adenom al glandei suprarenale.

Activitate redusă a glandei pineale a fost observată la pacienții cu diabet de tip 2, obezitate, calcifiere pineală avansată, demență mixtă și vârstă înaintată.

Volumul total al glandei pineale a fost observat a fi crescut la pacienții cu obezitate și pancreatita cronică, și scăzut la pacienții cu demența mixtă.

Nu au existat modificări morfologice observabile la pacienții care au prezentat fie gușă, cașexie sau identificarea aterosclerozei poligonului Willis în cadrul autopsiei.

Descoperirile accidentale ale chistelor la nivelul glandei pineale au fost mai frecvente la pacienții ce prezentau pancreatită cronică, adenom glandei suprarenale, gușă și diabet zaharat de tip 2.

Este nevoie de cercetări suplimentare pentru a evalua impactul clinic al acestor modificări morfologice asupra sistemului neuroendocrin, cu implicații clinice în endocrinologie, neurologie și chiar psihiatrie.

O abordare histologică care utilizează tehnologia digitală oferă date obiective pentru a sprijini multe dintre studiile morfologice optice anterioare ale glandei pineale. Ambele studii morfometrice folosesc programul de referință ImageJ, în paralel cu evaluarea optică tradițională pentru a asigura obținerea de date obiective, un aspect inovativ pentru literatura actuală, majoritatea studiilor histologice ale glandei pineale fiind efectuate în epoca pre-digitală, unele fiind supuse unei subiectivități inevitabile.

Tehnicile morfometrice descrise în studiul al treilea au o valoare potențială pentru practica curentă, în special în cazul modelelor experimentale pe animale mici precum și pentru glandele pineale umane, sau alte organe endocrine mici care pot fi incluse complet într-o imagine scanată integral, împreună cu utilizarea imunohistochemiei care vizează aprecierea funcției unei structuri morfologice.

MorphoRGB este un program alternativ pentru utilizatorii care au dificultăți cu diferitele interfațe ale programelor de specialitate precum ImageJ. Programul dezvoltat în cadrul tezei oferă facilitatea obținerii unor date cantitative imunohistochemice, folosind lame scanate integral digital și prelucrate prin programe ce folosesc filtre de tip RGB pentru diferențierea elementelor de colorație histologică. Astfel se poate obține o analiză mai eficientă a țesuturilor pentru diverse activități de diagnostic sau cercetare histopatologică.

Sunt necesare cercetări ulterioare folosind diferiți anticorpi pentru colorații imunohistochemice, diferite organe, cum ar fi paratiroida și diverse alternative hardware și software, cu speranța de a viza o abordare digitală, ușor de utilizat, ca standard de aur pentru histopatologi.

## **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Acest proiect de cercetare a fost ales din dorința de a contribui la cunoștințele asupra glandei pineale, care este relativ puțin studiată în lume. Cu atât mai puține studii există dintr-o perspectivă histologică, în mod particular pe țesut uman.

A fost folosite tehnici de colorare imunohistochemica, microscopie optica clasică cu lumină polarizată, scanarea digitală a lamelor microscopice, precum și utilizarea de software specializat pe analiză de imagine. Pentru a facilita tehnicile digitale, am dezvoltat un software propriu de analiză de imagine numit MorphoRGB care l-am folosit în paralel cu tehnicile consacrate, și am obținut rezultate semnificativ statistice care dovedesc eficiența aplicației, precum și utilizarea sa facilă de către operatori ne-experimentați, programele actuale fiind dificile de utilizat.

Aceste tehnici au făcut posibilă analiza histo-morfometrică mai detaliată a glandei pineale decât există până acum în literatura internațională, majoritatea studiilor fiind pe animale de experiment și non-digitale, învechite. Folosind aceste date histologice ale glandei pineale, am obținut corelații clinice cu valoare statistică semnificativă pentru a confirma anumite teorii pre-existente și a formula noi ipoteze de interes pentru comunitatea științifică.

---

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS

# The pineal gland. Morphological research with clinical implications.

---

PhD student **Bogdan Alexandru Gheban**

---

PhD supervisor Prof.dr. **Maria Crişan**

---



## TABLE OF CONTENT

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
1. History	17
2. Anatomy	19
3. Histology	21
4. Physiology	27
5. Anatomic pathology	31
5.1. Disease classification	31
5.1.1. Non-tumoral pathology	31
5.1.2. Tumoral pathology	32
6. Clinical data	37
6.1. Neuro-psychiatry	37
6.2. Endocrinology	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
1. Work hypothesis/objectives	45
2. General methodology	47
3. Study 1 – Age-related changes of the pineal gland	51
3.1. Introduction	51
3.2. Work hypothesis/objectives	54
3.3. Material and method	54
3.4. Results	58
3.5. Discussions	66
4. Study 2 – Digital morphometric analysis of pineal gland activity with clinical implications	69
4.1. Introduction	69
4.2. Work hypothesis/objectives	73
4.3. Material and method	73
4.4. Results	74
4.5. Discussions	77
5. Study 3 – Digital histological morphometry techniques of the pineal gland	83
5.1. Introduction	83
5.2. Work hypothesis/objectives	87
5.3. Material and method	87
5.4. Results	92
5.5. Discussions	96
6. General conclusions	99
7. Originality and innovative contributions of the Ph.D. thesis	101
<b>REFERENCES</b>	102
<b>ANNEXES</b>	113

# INTRODUCTION

The pineal gland is a small neuroendocrine organ located above the cerebellar tent, often unnoticed and neglected in the standard anatomopathological autopsy procedure. Although very little is known, many studies attest to the gland's role in homeostasis through complex feedback mechanisms closely related to the entire endocrine system. The pineal gland is also directly related to the immune system, the vestibular and visual apparatus, the human mental balance, circadian rhythm, imagination, cognition, and sexuality.

The role of this gland has long been undersized and ignored. Still, with the technological advancement of research, more and more studies are being done on it, and research into the primary synthesized hormone, melatonin, has gained momentum over the past 40 years, highlighting beneficial and modulating effects on the human body. There is a tendency to mystify the pineal gland, with multiple alternatives and non-scientific theories spreading on various pseudo-scientific digital platforms.

Most studies in the literature are performed using radio-imaging methods, histological studies being limited mainly to animal models, human studies being very small in number, with limited and uneven geographical representation, important aspect due to seasonal and circadian variability of the pineal gland.

Currently, no national histopathological studies address this organ, particularly in autopsies. Internationally, there was an explosion of research on the pineal gland, especially histologically, between 1960 and 1990, followed by an unexplained pause in publications. In the last ten years, the interest in this organ has reopened, primarily due to melatonin's new therapeutic properties.

The doctoral thesis includes three translational research studies, which aim to perform digital morphometric analyzes and measurements on 72 human pineal glands collected from corpses, during the routine autopsy, within the departments of Pathological Anatomy in Cluj-Napoca of the Emergency County Clinical Hospital and the Children's Clinical Hospital. The digital histological approach is a recently implemented technique that provides objective mathematical data, which, together with the classical examination under an optical microscope, brings much more factual information and little subject to the observer's bias. The statistical analysis was performed with the help of teachers from the Department of Biostatistics and Methodology of Scientific Research of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Immunohistochemical staining was performed in the pathological anatomy laboratory of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor", and the microscopic slides were digitally scanned, at a magnification of 40x, within the Pathological Anatomy section of the Oncological Institute Prof. Dr. Ion Chiricuță "Cluj-Napoca.

The research studies are retrospective, observational, and analytical.

The first study aims at a digital microscopic analysis of the aging processes of the pineal parenchyma according to the age groups of the deceased patients. Pineal gland calcifications were examined using polarized light microscopy in the Department of Pathological Anatomy of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, and morphometry was performed using specialized software such as CaseViewer by 3DHISTECH, Adobe Photoshop, and ImageJ. The processes of glucose that replace the secretory parenchyma were mainly examined using the glial fibrillary acidic-protein immunohistochemical marker (GFAP) and the quantification of the percentage of positive parenchyma, as well as the intensity of the staining. Glandular volumes and the percentage of parenchyma replaced with calcifications and glial pineal cysts were also calculated. The data obtained were statistically analyzed and compared with studies in the literature using a non-digital microscopic methodology.

The second study addresses, in particular, the active parenchyma and secretory gland, using two neuroendocrine immunohistochemical markers, synaptophysin (SYN) and neuron-specific enolase (NSE) as well as neurofilament (NF). The percentage of positive parenchyma and the intensity of staining were evaluated using specialized image analysis software. Clinical data of deceased patients were collected, focusing on endocrine and neurological pathologies and statistical analysis to correlate the clinical implications of morphometric data.

The third study looked at the most accessible digital histological morphometry techniques in pineal gland analysis and developed its own software called MorphoRGB. The application developed aims to facilitate morphometry techniques that aim at immunohistochemical quantification, being much easier to use compared to existing and established variants. The positive immunohistochemical percentage was followed, as well as the intensity of the stains of four immunohistochemical stains, using the traditional optical technique, the research software ImageJ and MorphoRGB, with the application of statistical tests to assess the statistical significance between the methodologies approached.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Work hypothesis/Objectives**

The doctoral thesis is divided into three studies. All three studies involve the collection and histological analysis of the pineal gland using immunohistochemical staining techniques, digital scanning, specialized image analysis software, morphometry techniques, and statistical tests. We developed this topic of doctoral research starting from two main ideas. First, there is a lot of speculation about the pineal gland, the vast majority being pseudo-scientific, and the desire to demystify these theories through evidence-based science has been a motivating factor. Also, the lack of studies carried out on this body, both at the international and especially at national levels, was another promoter for choosing the topic. The current, recent literature focuses mainly on histological studies performed experimentally on mice, but the number is minimal, most histological studies being published in the 1980s, using subjective techniques. Most studies focus on the pharmacological effects of melatonin or imaging morphometry, and less emphasis is placed on the morphology of the pineal gland and the changes we experience at this level depending on aging and comorbidities.

The research material is obtained from routine autopsies performed at the Cluj-Napoca County Emergency Clinical Hospital and the Cluj-Napoca Children's Emergency Hospital by harvesting the pineal gland and adjacent structures and collecting clinical data of interest, especially endocrine, metabolic and neurological pathology. The main objectives of the studies were to elucidate the morphological changes that occur in the pineal glandular parenchyma as we age or depending on various comorbidities such as type 2 diabetes, obesity, chronic pancreatitis, hypertension, and dementia. Another main objective was the discovery of appropriate digital histological morphometry techniques using scanned tissue to analyze a small endocrine organ to obtain objective and correct data. The statistically significant results were written, discussed, and published in the international literature.

### **General methodology**

One hundred twelve pineal glands were collected during routine autopsies performed on human corpses between January 2017 and March 2019 in the Pathological Anatomy departments of the Emergency County Clinical Hospital and the Children's Clinical Hospital Cluj - Napoca, Romania, and the County Clinical Hospital Emergency, Cluj-Napoca, Romania. Forty glands were considered unsuitable for

analysis due to neighboring vascular pathological lesions or advanced autolysis. Seventy-two cases of random autopsies in children and adults who died of various causes were selected. The study included 33 female and 39 male subjects, six patients aged 0-25 years, 21 aged 46-65, and 45 aged 66 to 96. The studies were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the ethics committee of the University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca (05.07.2018). Anthropometric, clinical, histological, and morphometric data were collected anonymously.

Once harvested, the pineal gland was fixed in 10% formaldehyde, cut sagittally and longitudinally, and then processed according to standard histological technique: dehydration by switching to solutions of increasing concentration of ethyl alcohol and replacing it by switching to solutions of alcohol / xylene concentration increasing so that once 100% xylene is reached, the piece can be incorporated into histological paraffin. All paraffin blocks were sectioned to obtain 3-micrometer tissue sections deposited on glass slides. These were deparaffinized and then stained manually with hematoxylin-eosin (H&E) and immunohistochemical Ready-to-use antibodies: GFAP, Synaptophysin, neuron-specific Enolase, and Neurofilament, then using an immunohistochemical detection kit and 10x concentrated wash solution. covered with silane. The colored slides were digitally scanned at 40x resolution using a HISTECH PANNORAMIC SCAN II 3D slide scanner. Morphometric analysis was performed using 3D software HISTECH Case-Viewer, Adobe Photoshop CC 2019, and ImageJ - Fiji.

Data with normal distribution were described as mean and standard deviation (SD), while data with non-normal distribution were expressed as the median and interquartile range (IQR). Nominal variables were described using relative frequencies (percentages). Kolmogorov-Smirnov tests were used to assess the normality of quantitative variables. The differences between the investigated groups were evaluated using parametric tests (student t-test and ANOVA) for continuous variables with normal distribution and nonparametric tests (Mann-Whitney U test, Wilcoxon) for continuous variables with the abnormal distribution. Post-hoc tests with common corrections (Bonferroni, Tukey, Tamhane) were applied to investigate the differences in pairs between the investigated groups. For proportions, the Fisher test or the Pearson chi-square test was applied based on the appropriate counts of the expected frequency tables. Linear correlations and regressions were used to evaluate the association between numerical variables. Univariate and multivariate logistic regression models were used to model the influence of dichotomous variables on the investigated results. All tests were considered significant at p values <0.05. Confidence intervals (95% CI) were calculated to facilitate the interpretation of specific results. Statistical description and analysis were performed using IBM SPSS Statistics 25 and Microsoft Excel 2016.

## **Study 1 – Age-related changes of the pineal gland**

### **Work hypothesis/Objectives**

This retrospective observational and translational study aims to provide histological and morphometric data on morphological changes in old age compared to young people. The degree of calcification, the peculiarities of these calcifications, the volume of the gland, the glial tissue, and the glial cysts about the age, sex, and clinical data of the patients, who are both pediatric and adult patients, were assessed.

### **Material and method**

The study was designed according to the general methodology described on page 48 for the technique of sampling and processing the human pineal gland. To perform morphometric analyzes on the 72 selected pineal glands, the usual H&E staining was performed, as well as the GFAP immunohistochemical staining. Analytical data on calcifications were performed using polarized light

microscopy. The IRS score was used to quantify the immunoreactivity of the GFAP antibody. The immunopositive percentage of tissue was converted from the DAB pigment against staining with hematoxylin with the specialized Red / Green / Blue spectrum filter of the CaseViewer digital slide visualization program and then quantified using the analytical functions of the ImageJ / Fiji program.

## **Results and conclusions**

Thirty-three women and 39 men were included in the study, grouped into three age groups: 0–25, 46–65, and 66–96 years. The maximum volume of the gland was found in the age range 46–65. The average global volume was 519 mm<sup>3</sup>, the main architectural types were lobular and insular, and the average percentage of pineal calcification was 15% of the gland, reaching the peak in the age group 66–96, with a predominantly globular shape.

Glial cysts were found in 20.8% of cases. The intensity of GFAP immunohistochemical staining was maximal in the pediatric age group, but glial tissue expansion was much more significant in elderly patients. The degenerative process of the pineal gland can be quantified by measuring normal parenchyma, calcifications, glial tissue, and glial cysts. Morphometrically, some differences were observed compared to similar studies performed in the literature. Unfortunately, the current study does not have a 26–45 age group. Digital techniques seem to provide a more accurate analysis but have shown similar results to studies conducted over 40 years ago, providing critical information about evolutionary trends. Glial tissue growth, calcifications, and glial cysts have a defining role as age-related changes in the pineal gland.

The study of degenerative processes in the pineal gland could explain certain neurological and endocrine disorders in elderly patients without any other known cause, as calcifications and glial tissue growth will decrease the normal secretory activity of the pineal gland especially in terms of concerns melatonin and serotonin. The presence of pineal cysts in our study was three times lower than that presented by Sigurdardottir LG et al., and the presence of calcifications was 6% lower in our study than in Iceland, suggesting that the changes may be due to different seasonal light, the exposure period of the Icelandic population compared to the exposure to normal seasonal light in Eastern Europe.

## **Study 2 – Digital morphometric analysis of pineal gland activity with clinical implications**

### **Work hypothesis/Objectives**

This study aims to provide anatomical and histo-morphometric data obtained by digital techniques from human pineal glands, examined post-mortem, using Hematoxylin-Eosin staining and neuroendocrine immunohistochemistry, assessing the percentage of active secretory parenchyma, storage of neuro-hormonal vesicles, glial tissue volume, the presence of glial cysts concerning age, sex and the presence of comorbidities such as obesity, type 2 diabetes, dementia, hypertension, atherosclerosis, cachexia, goiter and chronic pancreatitis in both children and adults. Morphometric data from neuroendocrine and structural markers aimed to identify variations in pre-existing pathology of patients.

### **Material and method**

The general methodology was used to design the study. The 72 pineal glands were usually stained H&E and immunohistochemically using synaptophysin, neuron-specific enolase, and neurofilament. Digital scanning was performed, and images were taken for analysis using the ImageJ / Fiji application. The immunoreactivity of the antibodies used was quantified by the IRS score.

### **Results and conclusions**

This study also highlights the possibility of evaluating the pineal gland during forensic and routine autopsies, especially for patients with endocrine, neurological, and psychiatric disorders, possibly changing the outcome of the autopsy diagnosis or providing a better perspective on the case.

The study's main strength is the large number of human pineal glands examined using the digital scanning and image analysis program. Although more pediatric subjects would have been desirable, there are currently very few studies on humans, regardless of age group, in the scientific literature. Increased secretory parenchyma has been observed in patients with chronic pancreatitis, hypertension, and adrenal adenoma. Reduced activity has been observed in patients with type 2 diabetes, obesity, advanced pineal calcification, mixed dementia, and age over 45 years, progressively decreasing. No changes were associated with goiter, cachexia, or Willis polygon atherosclerosis. No significant gender differences were found.

The activity of the pineal gland can be assessed by quantitative immunohistochemical evaluation of the neuroendocrine and structural markers of pinealocytes, as well as the observation of glial tissue and calcifications. Further research is needed to assess the clinical impact of these morphological changes on neuroendocrine systems, with clinical implications in endocrinology, neurology, and even psychiatry. Digital techniques provide a more accurate analysis of histological data. These findings offer a new, morpho-functional perspective on the role of the pineal gland in various pathologies, emphasizing that its study should not be neglected in clinical evaluation, imaging, and standard autopsy.

## **Study 3 – Digital histological morphometry techniques of the pineal gland**

### **Work hypothesis/Objectives**

The study aims to provide a tool for digital morphometry of histological preparations, MorphoRGB, especially the pineal gland and other small organs, which are easily digitized in their entirety. Our tool provides a simplified approach to an already possible action that can be performed using established image analysis programs such as ImageJ, especially for digital histological preparations with RGB (Red-Green-Blue) instruments such as SlideViewer from 3DHISTECH. The instrument provides morphometric data by analyzing the specific histological features provided by immunohistochemical staining, thus allowing us to assess better different pathological features of an organ or morpho-functional features, primarily when used on endocrine organs such as the pineal gland. Our goal is to provide a non-inferior tool but simplified and easy to use in the analysis of the digitized image and fully scanned microscopic slides, a useful element in the field of diagnostic histopathology and histological research.

### **Material and method**

Seventy-two cases and immunohistochemical staining SYN, NF, NSE, and GFAP were used. Digital scanning of microscopic preparations as well as optical interpretation was performed. We compared the manual optical assessment of the pathologist with the results provided by ImageJ and our original program, MorphoRGB, accessible using this web link: <https://morphometry.newlatitudes.ro/>. The program interprets the RGB values of each pixel of the digitized tissue. As the image is analyzed, a sum of values is made for each RGB channel separately. Finally, splitting the program automatically provides the values of each channel's proportion for the entire image. The analysis takes 1-3 seconds, depending on the computer's performance. Bland-Altman diagrams were plotted to illustrate the agreement between ImageJ and MorphoRGB regarding the average percentage of GFAP, NSE, NF, and SYN and the intensity of antibodies between optical and ImageJ analysis.

### **Results and conclusions**

The aim of the study was to use widely used programs, such as SlideViewer and ImageJ, in a modern and objective methodology to perform histological morphometry of the pineal gland. We developed our



own program, MorphoRGB, in order to create an easier-to-use interface for certain morphometric functions.

Strong and statistically significant correlations were found and represented using Bland-Altman diagrams between the two image analysis software for the average percentage and intensity of GFAP, NSE, NF, and SYN. Software such as SlideViewer and ImageJ, with our own MorphoRGB software, were used to perform histological morphometry of the pineal gland. Digital morphometry of a small organ, such as the pineal gland, is easy to achieve using digitally scanned microscopic slides and digital image analysis software, with potential use in clinical settings. MorphoRGB is not inferior to ImageJ, providing slightly more accurate data and is easier to use in measuring the percentage of stained parenchyma by immunohistochemistry. The morphometric techniques described have potential value in current practice, experimental models on small animals and human pineal glands, or other small endocrine organs that can be completely included in an entire section of the microscopic slide. The software used has applicability in the quantification of immunohistochemical staining.

## General conclusions

The research studies aimed at the digital histological analysis, by morphometry methods, of 72 human pineal glands collected during the anatomopathological autopsies within the hospital activity. There are not many histological studies in the literature that use human pineal tissue in a significant amount, evaluating tissue from most age groups with different comorbidities.

The main age-related changes in the pineal gland observed in the first study include the replacement of the normal secretory parenchyma of the pineal gland with glial tissue, calcifications, and glial cysts. There are no significant gender differences. The architecture of the gland also has a changing pattern as it ages, with cellular arrangement in placards being observed in the pediatric population, lobular in adults, and insular in the elderly.

Extrapineal calcifications, also known as metastatic calcifications, play an important role in the global calcification of the pineal gland. The nature of these calcifications needs to be further studied, with polarized light providing primary data for working. There are various findings found, based on geographical locations, regarding these degenerative changes, the main differences being the seasonal variations in light exposure around the globe.

The second study quantified the active secretory parenchyma of the pineal gland in various comorbidities of autopsied patients. No significant gender differences were found.

Increased secretory parenchyma has been observed in patients with chronic pancreatitis, hypertension, and adrenal adenoma.

Reduced pineal gland activity has been observed in patients with type 2 diabetes, obesity, advanced pineal calcification, mixed dementia, and old age.

The total volume of the pineal gland was observed to be increased in patients with obesity and chronic pancreatitis and decreased in patients with mixed dementia.

There were no observable morphological changes in patients with either goiter, cachexia, or identification of Willis polygon atherosclerosis at autopsy.

Accidental findings of cysts in the pineal gland were more common in patients with chronic pancreatitis, adrenal adenoma, goiter, and type 2 diabetes.

Further research is needed to assess the clinical impact of these morphological changes on the neuroendocrine system, with clinical implications in endocrinology, neurology, and even psychiatry.

A histological approach using digital technology provides objective data to support many of the previous optical and morphological studies of the pineal gland. Both morphometric studies use the ImageJ reference program, in parallel with the traditional optical evaluation to ensure objective data, an innovative

aspect for the current literature, most histological studies of the pineal gland being performed in the pre-digital age, some being subject to inevitable subjectivity.

The morphometric techniques described in the third study have potential value for current practice, especially in experimental models on small animals as well as human pineal glands or other small endocrine organs that can be fully included in a fully scanned image, along with the use of immunohistochemistry aimed at assessing the function of a morphological structure.

MorphoRGB is an alternative program for users who have difficulty with the various interfaces of specialized programs such as ImageJ. The program developed in the thesis offers the facility to obtain quantitative immunohistochemical data using entirely digitally scanned slides and processed by programs that use RGB-type filters to differentiate the histological staining elements. Thus, a more efficient tissue analysis can be obtained for various diagnostic or histopathological research activities.

Further research is needed using different antibodies for immunohistochemical staining, different organs, such as the parathyroid gland, and various hardware and software alternatives in the hope of a digital, easy-to-use approach as the gold standard for histopathologists.

## **Originality and innovative contributions of the Ph.D. thesis**

This research project was chosen out of a desire to contribute to the knowledge of the pineal gland, which is relatively little studied in the world. There are even fewer studies from a histological perspective, particularly on human tissue.

Immunohistochemical staining techniques, classical polarized light optical microscopy, digital scanning of microscopic slides, as well as the use of specialized image analysis software were used. To facilitate digital techniques, we developed our image analysis software MorphoRGB, which we used in parallel with established techniques. We obtained statistically significant results that prove the efficiency of the application, as well as its easy use by inexperienced operators. Current programs are challenging to use.

These techniques have made possible a more detailed histo-morphometric analysis of the pineal gland than exists so far in the international literature, most studies being on experimental and non-digital animals, obsolete. Using these histological data of the pineal gland, we obtained clinically relevant clinical correlations to confirm certain pre-existing theories and formulate new hypotheses of interest to the scientific community.