



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00448**

(22) Data de depozit: **29/06/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/06/2019** BOPI nr. **6/2019**

(41) Data publicării cererii:
27/11/2015 BOPI nr. **11/2015**

(73) Titular:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "VICTOR BABEȘ" DIN
TIMIȘOARA, PIAȚA EFTIMIE MURGU
NR. 2 A, TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:
• VĂDUVA ADRIAN OVIDIU,
STR. PAVEL DAN NR. 41B, TIMIȘOARA,
TM, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 7234308 B1; US 6558629 B1;
US 5550033; US 2014/0234895 A1

(54)

DISPOZITIV ȘI METODĂ PENTRU CRIOINCLUDERE A MATERIALULUI TISULAR ÎN VEDEREA EXAMINĂRII MICROSCOPICE



RO 130705 B1

1 Invenția se referă la un dispozitiv portabil destinat crioincluderii materialului tisular în
vederea examinării microscopice, utilizată cu precădere în spitale și laboratoare de cercetare.

3 Este cunoscut, din practica medicală și literatura de specialitate, faptul că materialul
tisular recoltat intra-operator poate fi înghețat folosind un mediu de includere de tipul OCT-
5 - Sakura Tek (optimum cutting temperature compound - amestec apos de glicoli și rășini),
pentru a fi apoi secționat și examinat în microscopie optică, în vederea punerii unui diagnos-
7 tic intra-operator (examen extemporaneu). De asemenea, multe tehnici de cercetare și diag-
nostic necesită procesarea materialului tisular în stare înghețată. În principal sunt folosite
9 două metode:

- înghețare la -20°C , urmată de secționare imediată;

11 - înghețare la -80°C , urmată de stocare în congelatoare de temperatură ultra-joasă
(ultra-low temperature freezer). Stocarea la -80°C permite temporizarea secționării mate-
13 rialului, ceea ce înseamnă că materialul rămâne viabil câteva luni. În momentul procesării,
blocul de gheață ce conține țesutul trebuie încălzit la -20°C , pentru a putea fi prelucrat, iar
15 temperatura de prelucrare poate varia în funcție de țesut.

Pentru ambele procedee este necesar ca timpul de înghețare să fie redus pentru a
17 limita inducerea de artefacte de înghețare (cristalele aciculare de gheață) care rup membra-
nele celulelor, denaturând proba cu material tisular de cercetat.

19 În mod uzual, pentru procesarea de înghețare (sau „la gheață”) a fragmentelor de
țesut, procedura de înghețare se realizează în interiorul criotomului, aparatul ce realizează
21 și secționarea materialului rezultat. Se folosește o piesă "port obiect" peste care se depune
un strat de mediu de înghețare (OCT - optimum cutting temperature compound), iar în acesta
23 se așază țesutul de interes pentru investigare medicală sau în scop de cercetare. Piesa port
obiect astfel formată este introdusă în camera criotomului la o temperatură medie de -20°C ,
25 pentru a îngheța țesutul de investigat. Răcirea poate fi grăbită prin folosirea extractoarelor
de căldură (piese metalice cu suprafață plană), care se pun peste piesa „port obiect” de
27 înghețat. Ulterior înghețării se poate efectua în bune condiții secționarea mecanică a mate-
rialului tisular, și etalarea pe lama folosită ca suport pentru explorarea microscopică.

29 Dezavantajele acestei tehnici uzuale sunt următoarele:

- răcirea se produce mai lent și facilitează apariția artefactelor induse de îngheț;

31 - necesită un criotom, aparat voluminos, dificil de transportat în diverse locații;

33 - materialul recoltat trebuie transportat de la locul recoltării până în laboratorul de pro-
cesare, și în acest interval de timp intermediar unii compuși intracelulari cu durata de viață
scurtă pot fi deja metabolizați, și nu mai pot fi evidențiați;

35 - în general nu se recomandă ca materialul înghețat intermediar la -20°C să fie apoi
stocat la -80°C ;

37 - pentru stocare la -80°C , metoda cea mai răspândită este de a îngheța rapid piesa
în azot lichid, tehnică ce necesită personal calificat și proceduri speciale de manevrare a
39 agentului frigorific.

Este cunoscută invenția **US 2002162337 (A1)**, intitulată „*Apparatus and method for
41 precision cryoembedding of tissue samples*”, în care, în scopul crioincluderii țesutului tisular
de investigat, se folosește un aparat ce constă într-un ansamblu compus dintr-un set de cuve
43 de includere, port-piese și blocuri de răcire care se introduc peste port-piese, cu accesorii
de manipulare a pieselor. Aparatul poate fi răcit de surse externe, sau utilizat în interiorul
45 unui criotom. Aparatul este destinat a fi folosit la -25°C ... -30°C .

Dezavantajele acestui aparat sunt următoarele:

47 - aparatul nu poate fi folosit pentru a produce blocuri de gheață ce includ material
tisular la o temperatură mai joasă de -30°C . Pentru stocarea de lungă durată a materialului
49 tisular, este necesară înghețarea la -80°C într-o singură etapă, și cât mai rapid posibil;

RO 130705 B1

- aparatul nu prezintă înveliș izolator, ceea ce face ca încălzirea dispozitivului să fie rapidă, iar intervalul de folosire în afara unei incinte răcite (de tipul criotomului) este limitat;	1
- aparatul prezintă un număr mare de piese mobile;	3
- aparatul nu este dotat cu un termometru propriu pentru monitorizarea temperaturii de includere.	5
Se cunoaște, de asemenea, invenția WO 2007028243 (B1) , ce utilizează un aparat și o metodă constând dintr-o platformă de înghețare introdusă într-o cutie izolatoare din polistiren, o matriță de înghețare și un port obiect. Aparatul în general este răcit cu zăpadă carbonică, dar poate folosi și alte surse, cum este azotul lichid sau compresor propriu de răcire.	7
Dezavantajele acestui aparat sunt următoarele:	9
- unele surse de răcire necesită material adițional și, eventual, personal calificat în manevrarea lor (zăpadă carbonică, azot lichid);	11
- învelișul izolator este din polistiren, care este inferior poliuretanului din punct de vedere al calităților izolatoare și al rezistenței la manipulare;	13
- aparatul nu este dotat cu un termometru propriu pentru monitorizarea temperaturii de includere;	15
- aparatul nu prezintă un înveliș exterior cu rezistență chimică crescută.	17
Aparatele și metodele cunoscute prezintă în general următoarele dezavantaje:	
- lipsa portabilității și autonomia scăzută de utilizare;	19
- număr mai mare de piese în alcătuirea aparatului;	
- necesitatea unui agent frigorific (de exemplu, azot lichid), corelată cu necesitatea unei calificări suplimentare pentru manevrarea azotului lichid;	21
- înghețarea în două trepte (-20°C și apoi -80°C);	23
- absența monitorizării temperaturii pentru asigurarea condițiilor optime de înghețare;	
- rezistență mecanică și chimică scăzută a învelișului exterior;	25
- imposibilitatea stocării blocului de gheață pentru procesare ulterioară.	
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui dispozitiv de crioincludere a materialului tisular de investigat, care să fie portabil, ușor de manipulat, care să permită înghețarea țesutului la temperatură ultra-scăzută (-80°C), fără pericolul formării artefactelor sau alterarea țesutului, și care să fie utilizabil autonom, cu posibilitatea monitorizării temperaturii, și cu rezistență mecanică și chimică sporită a învelișului exterior.	27
Dispozitivul pentru crioincluderea materialului tisular, în vederea examinării microscopice, conform invenției, ce are în compunere un bloc din metal cu conductivitate termică și căldură specifică crescută, prevăzut cu niște locașuri tronconice cu rol de cavități formatoare, pentru includerea țesuturilor într-o masă de gheață, rezolvă problema tehnică și înlătură dezavantajele menționate prin aceea că blocul din metal este montat într-o cuvă, fiind înglobat într-un strat izolator, din poliuretan, care îmbracă la interior cuva, și care se îmbină etanș, printr-o renură de profil pătratic, prevăzută pe suprafața de închidere, cu un strat superior din material izolator de poliuretan, care căptușește un capac ce determină, împreună cu cuva, un spațiu interior cu rol de cameră de înghețare, și care prezintă pe suprafața de închidere o adâncitură cu profil similar, în care pătrunde renura, capacul fiind prevăzut cu niște dopuri tronconice pe direcția axelor de simetrie ale locașurilor tronconice din blocul de metal, atât stratul izolator, cât și stratul superior fiind acoperite cu câte un înveliș exterior din material plastic.	31
Prin învelișul tip carcasă, pe lateral, este montat un termometru de contact, care pătrunde cu o sondă de detecție sub formă de tijă, în blocul de metal pentru monitorizarea temperaturii acestuia. La partea superioară a ansamblului de tip cuvă se dispune un ansamblu amovibil, de tip capac de carcasă, format dintr-un strat superior din material izolator de	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 130705 B1

1 poliuretan, și un înveliș exterior din material plastic, ce realizează, prin suprapunere peste
stratul menționat și învelișul ansamblului tip cuvă, un spațiu pentru o cameră de înghețare,
3 deoarece marginile stratului și ale învelișului depășesc înălțimea blocului de metal. Pe
suprafața de închidere a celor două ansambluri se realizează, pentru etanșare și poziționare
5 fermă, o adâncitură de profil pătratic în stratul superior, în care pătrunde o renură de profil
pătratic și dimensiuni corespondente unei asamblări cu joc de pe stratul izolator al cuvei,
7 asemănătoare montajului de tip mamă-tată. Ansamblul amovibil de tip capac de carcasă este
prevăzut cu niște dopuri în dreptul axei locașurilor de formare pentru includere a țesuturilor
9 în masa de gheață, dopuri ce susțin niște piese „port-obiect” pe care se crioinclude materialul
tisular.

11 Metoda pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice,
conform invenției, se realizează prin următoarele etape succesive:

13 1. Dispozitivul constituit din ansamblul de tip cuvă, fără ansamblul mobil de tip
capac-carcasă, se introduce și se menține în congelatorul de temperatură ultrajoasă până
15 la obținerea temperaturii de -80°C a blocului de metal.

17 2. Capacul de carcasă prevăzut cu dopurile și piesele „port-obiect” se montează la
deschiderea congelatorului, și înainte de a scoate restul ansamblului din mediul de -80°C .

19 3. Se transportă dispozitivul cuvă cu capac în condiții normale de temperatură, la
locul recoltării.

21 4. În momentul în care este necesară operațiunea de includere, se detașează ansam-
blul mobil de tip capac, se așază în cuva de includere, în locașurile corespunzătoare frag-
mentul de țesut de interes, peste care se toarnă mediul de înghețare (OCT), astfel încât
23 nivelul acestuia să depășească ușor planul superior al blocului de metal.

25 5. Se așază ansamblul mobil de tip capac peste carcasa dispozitivului cu piesele
„port obiect” deasupra, mediul de înghețare situat deasupra planului blocului intrând cu
șanțurile piesei „port obiect”, și facilitând legarea eșantioanelor cu material tisular.

27 6. După înghețare, prin rotirea dopurilor, se obține detașarea blocului de gheață cu
țesut tisular înglobat, format pe placa circulară a piesei „port obiect”.

29 7. Piesa „port obiect” cu șanțuri unidirecționale permite ca, prin presarea blocului de
gheață, cu material tisular, în direcția șanțurilor, să se obțină detașarea acestuia, putând fi
31 utilizat imediat, sau stocat pentru utilizare ulterioară.

33 Dispozitivul pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării micro-
scopice, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

35 - portabilitatea de a asigura disponibilitatea procesului de înghețare a țesutului la
locul recoltării acestuia, minimizând timpul scurs între momentul obținerii fragmentului de
țesut și crioinclusiunea acestuia;

37 - autonomia crescută de utilizare, prin scăderea transferului termic cu mediul ambiant,
datorită izolării camerei de înghețare;

39 - număr scăzut de piese din care este constituit dispozitivul;

41 - nu necesită agent frigorific suplimentar (de exemplu, azot lichid, zăpadă carbonică);

43 - dispozitivul poate fi folosit de oricine, fără a necesita o calificare și abilitare în
utilizarea sa;

45 - înghețarea se face rapid la temperatură ultrascăzută (-80°C);

47 - controlul temperaturii prin prezența termometrului asigură condițiile optime de
înghețare;

49 - rezistență mecanică și chimică crescută a învelișului exterior (PVC);

51 - oferă posibilitatea stocării blocului de gheață pentru procesare ulterioară, atât în
camera de înghețare (temporar), cât și prin transfer ulterior, în congelatoare de temperatură
ultrajoasă.

RO 130705 B1

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile ce reprezintă: 1

- fig. 1, secțiune longitudinală a dispozitivului; 3
- fig. 2, un port obiect ce permite detașarea blocului de gheață cu eșantionul de pe acesta. 5

Dispozitivul pentru crioincluderea materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform invenției, este alcătuit dintr-un ansamblu de tip cuvă **A**, care, împreună cu un ansamblu de tip capac de carcasă **B**, delimitează o cameră de înghețare în care se realizează și stochează eșantioane cu material tisular pentru investigații microscopice. În ansamblul de tip cuvă **A** se montează un bloc **1** solid de metal cu conductivitate termică și căldură specifică crescută, de regulă aluminiu (fig. 1). Acesta este prevăzut cu mai multe locașuri **2** tronconice, care au rolul cavităților formatoare pentru includerea țesuturilor în masă de gheață. Dimensiunile și numărul locașurilor **2** sunt variabile în funcție de necesitatea de investigație a diferitelor țesuturi și, ca atare, vor determina dimensiunea minimă a blocului **1**. Grosimea blocului **1** este cea care determină în final autonomia dispozitivului deoarece cu cât blocul este mai gros, având o masă mai mare, inerția termică este mai mare, iar încălzirea lui se va realiza într-un interval de timp mai mare. 7 9 11 13 15 17

Blocul **1** de metal este înglobat într-un strat **3** izolator, de poliuretan, de forma ansamblului tip cuvă **A**, liber la partea superioară în dreptul locașurilor **2**. La exterior stratul izolator **3** de forma unei cuve este cuprins într-un înveliș **4** de tip carcasă, din material plastic, de regulă din PVC - policlorură de vinil - care asigură structura suport și de rezistență a dispozitivului. Prin învelișul **4** tip carcasă, pe lateral, este montat un termometru de contact **5** care pătrunde cu o sondă **6** de detecție, sub formă de tijă, în blocul **1**, pentru monitorizarea temperaturii blocului **1** de metal. Afișajul termometrului se află la exterior, pe laterală, aplicat peste învelișul **4**, de tip carcasă, extern. La partea superioară a ansamblului de tip cuvă **A**, format din blocul **1**, stratul izolator **3**, învelișul **4** și termometrul de contact **5**, se dispune un ansamblu amovibil de tip capac de carcasă **B**, format dintr-un strat superior **7**, din material izolator de poliuretan, și un înveliș exterior din material plastic realizează, prin suprapunere peste stratul **3** și învelișul **4**, un spațiu pentru o cameră **8** de înghețare, deoarece marginile stratului **3** și ale învelișului **4** depășesc înălțimea blocului **1**. Pe suprafața de închidere a celor două ansambluri se realizează, pentru etanșare și poziționare fermă, o adâncitură de profil pătratic în stratul superior **7**, în care pătrunde o renură de profil pătratic și dimensiuni corespundente unei asamblări cu joc de pe stratul izolator **3**, asemănătoare montajului de tip mamă-tată. 19 21 23 25 27 29 31 33

În corpul stratului superior **7** sunt așezate, pe aceleași axe verticale cu cele ale locașurilor tronconice **2** din blocul **1**, și corespundente cu numărul acestora, niște dopuri **9** tronconice, de grosimea stratului superior **7**, care, la partea superioară, sunt prevăzute cu niște proeminențe **10** de formă cilindrică, ce constituie zone de apucare pentru extragerea prin apucare-tragere a dopurilor **9** atunci când se dorește accesul operatorului pentru manipularea selectivă a unui eșantion de țesut înghețat, în vederea secționării unor lame pentru examinare microscopică. 35 37 39

În dopurile **9** cu orientare axial-centrală este inserată o piesă **11** "port obiect", având o tijă inserată în dopul **9** și, la partea opusă, o platformă de tip placă circulară **12** (fig. 2), care, la partea dinspre camera de înghețare, în zona cavității locașurilor **2** de formare prin crioincludere a eșantioanelor de țesut, are prevăzute niște striiațiuni **13** unidirecționale, în formă de V. Pe placa circulară **12**, în procesul de crioincludere, în limitele determinate de locașul **2** se formează prin înghețare un eșantion **14** care include țesutul de investigat. Striațiunile unidirecționale asigură rămânerea materialului tisular pe placa circulară **12**, atunci 41 43 45 47

RO 130705 B1

1 când, la scoaterea eșantionului, operatorul rotește tija **11** pentru desprinderea de locașul **2**
2 formator a eșantionului crioinclus **14**. Prin aplicarea unei forțe în sensul striățiunilor, prin alu-
3 necare, eșantionul **14** se va detașa de placa circulară **12**, ceea ce va permite reutilizarea
4 acesteia în cadrul aceleiași sesiuni de includere. Pentru creșterea autonomiei, respectiv,
5 pentru stocarea temporară a eșantioanelor **14** se poate folosi un congelator portabil de tem-
6 peratură ultrajoasă. Camera de înghețare poate fi folosită pentru stocarea temporară a blocu-
7 rilor de gheață detașate, până la mutarea lor în congeloare dedicate. În situația în care
8 numărul de blocuri formate în această etapă este mai mic decât numărul de cuve de inclu-
9 dere, detașarea blocului de gheață de cuva de includere se va realiza doar în momentul
10 mutării blocului în criotom, pentru secționare, sau în congelator de temperatură ultrajoasă,
11 pentru stocare.

12 Metoda pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice,
13 conform invenției, se realizează prin următoarele etape succesive:

14 1. Dispozitivul constituit din ansamblul de tip cuvă, având stratul **3**, învelișul **4** și blocul
15 **1**, cu termometrul de contact **5**, fără ansamblul mobil de tip capac, se introduce și se menține
16 în congelatorul de temperatură ultrajoasă până la obținerea temperaturii de -80°C a blocului
17 de metal.

18 2. Capacul de carcasă, format din stratul superior **7**, prevăzut cu dopurile **9** și piesele
19 **11** „port-obiect”, se montează la deschiderea congelatorului și înainte de a scoate restul
20 ansamblului din mediu de -80°C .

21 3. Se transportă dispozitivul cuvă cu capac, în condiții normale de temperatură, la
22 locul recoltării.

23 4. În momentul în care este necesară operațiunea de includere, se detașează
24 ansamblul mobil de tip capac, se așază în cuva de includere în locașurile **2** fragmentul de
25 țesut de interes, peste care se toarnă mediul de înghețare ($^{\circ}\text{OCT}$), astfel încât nivelul
26 acestuia să depășească ușor planul superior al blocului de metal.

27 5. Se așază ansamblul mobil de tip capac peste carcasa dispozitivului cu piesele **11**
28 „port-obiect” deasupra, mediul de înghețare situat deasupra planului blocului intrând în
29 șanțurile piesei **11** „port-obiect”, și facilitând legarea eșantioanelor cu material tisular.

30 6. După înghețare, prin rotirea tijei piesei **11** "port-obiect", se obține detașarea blocu-
31 lui de gheață cu materialul tisular înglobat, format pe placa circulară **12**, de locașurile **2** de
32 cuvă de includere.

33 7. Piesa **11** „port-obiect”, cu șanțuri unidirecționale, permite ca, prin presarea blocului
34 de gheață, cu material tisular, în direcția șanțurilor, să se obțină detașarea acestuia, putând
35 fi utilizat imediat, sau stocat pentru utilizare ulterioară.

RO 130705 B1

Revendicări

1. Dispozitiv pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice, care are în componență un bloc din metal (1), cu conductivitate termică și căldură specifică crescute, prevăzut cu niște locașuri tronconice (2), cu rol de cavități formatoare pentru includerea țesuturilor într-o masă de gheață, **caracterizat prin aceea că** blocul din metal (1) este montat într-o cuvă (A), fiind înglobat într-un strat izolator (3) din poliuretan, care îmbracă la interior cuva (A), și care se îmbină etanș, printr-o renură de profil pătratic, prevăzută pe suprafața de închidere, cu un strat superior (7) din material izolator de poliuretan, care căptușește un capac (B) ce determină, împreună cu cuva (A), un spațiu interior cu rol de cameră de înghețare, și care prezintă pe suprafața de închidere o adâncitură cu profil similar, în care pătrunde renura, capacul (B) fiind prevăzut cu niște dopuri tronconice (9) pe direcția axelor de simetrie ale locașurilor tronconice (2) din blocul de metal (1), atât stratul izolator (3), cât și stratul superior (7) fiind acoperite cu câte un înveliș exterior (4, 8) din material plastic.
2. Dispozitiv pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** lungimea dopurilor tronconice (9) este egală cu grosimea stratului superior (7), dopurile fiind prevăzute la partea superioară cu niște proeminențe (10) de configurație cilindrică, pentru apucarea dopurilor în vederea extragerii acestora, atunci când se dorește manipularea selectivă a unui eșantion de țesut înghețat.
3. Dispozitiv pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** o cuvă (A) este prevăzută cu un termometru de contact (5) montat lateral, aflat în legătură cu o sondă de detecție (6) sub formă de tijă, care pătrunde prin învelișul exterior (4), prin stratul izolator (3), până în blocul de metal (1).
4. Dispozitiv pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** dopurile tronconice (9) au inserate la partea inferioară câte o piesă port-obiect (11), constituită dintr-o tijă inserată în dop, și continuată la capătul opus cu o platformă circulară (12), a cărei suprafață dinspre locașul tronconic (2) este prevăzută cu niște striții (13) unidirecționale, cu profilul în forma literei V.
5. Metodă pentru crioinclusiunea materialului tisular în vederea examinării microscopice, care cuprinde etapa de introducere a cuvei (A) în congelatorul de temperatură ultra joasă, și menținerea acesteia până la obținerea temperaturii de -80°C a blocului de metal (1), indicată de un termometru (5), urmată de transportarea dispozitivului în condiții normale de temperatură la locul recoltării, și amplasarea fragmentelor de țesut de interes în locașurile tronconice (2) ale blocului de metal (1), peste care se toarnă mediul de înghețare OCT, astfel încât nivelul acestuia să depășească ușor planul superior al blocului de metal (1), **caracterizată prin aceea că**, la obținerea temperaturii de -80°C a blocului de metal, se montează capacul (B) prevăzut cu dopurile tronconice (9) și piesele port-obiect (11) peste cuvă (A), înainte de a scoate din mediul de temperatură -80°C, capacul (B) detașându-se în momentul efectuării operațiunii de includere, pentru a permite amplasarea fragmentelor de țesut, și re poziționându-se apoi peste cuvă (A), astfel încât mediul de înghețare să intre în strițiile (13) de pe platforma piesei port-obiect (11), iar după înghețare, detașarea blocului de gheață cu materialul tisular înglobat de niște locașuri (2) făcându-se prin rotirea piesei port-obiect (11) și prin presarea blocului de gheață în direcția strițiilor (13).

(51) Int.Cl.

G01N 1/28 (2006.01);

G01N 1/42 (2006.01);

A01N 1/02 (2006.01)

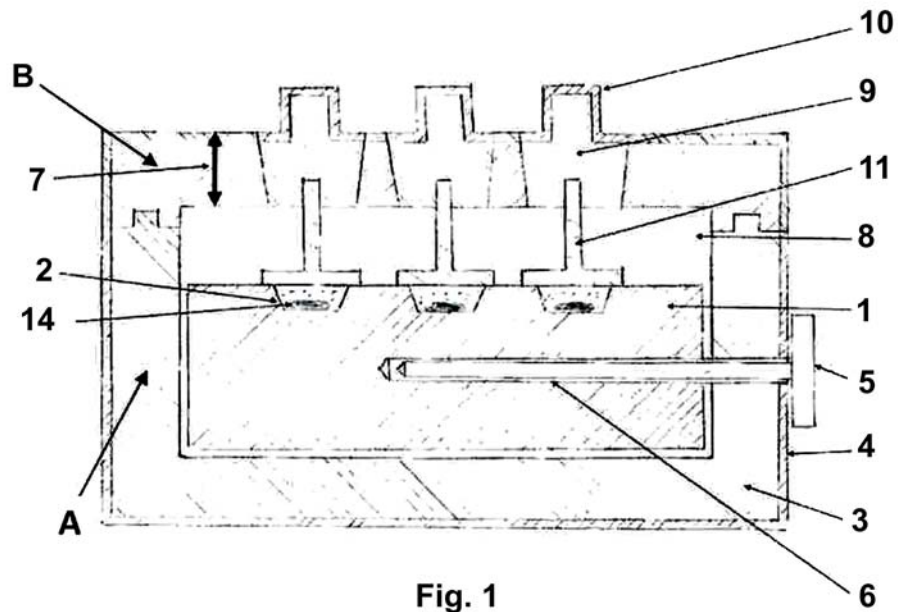


Fig. 1

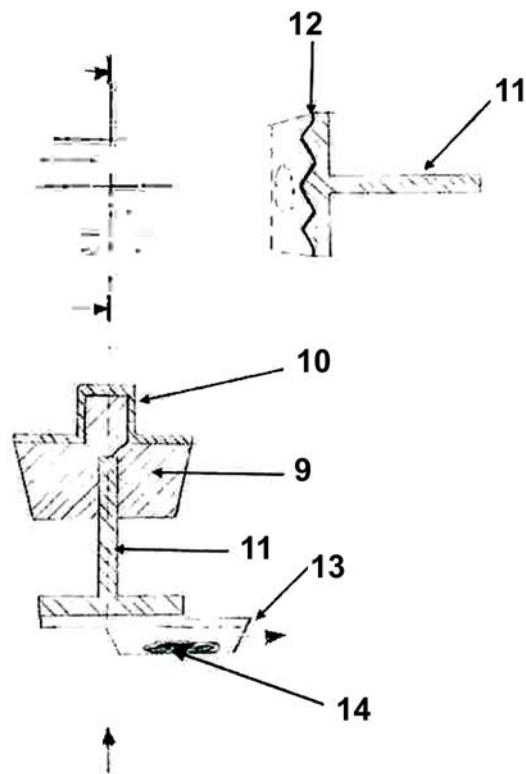


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 221/2019