



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127486** (13) **U**
(51) МПК
C12M 3/06 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2018 00060</p> <p>(22) Дата подання заявки: 02.01.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2018</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2018, Бюл.№ 15</p>	<p>(72) Винахідник(и): Злепко Сергій Макарович (UA), Кривонос Валерій Єгорович (UA), Тимчик Сергій Васильович (UA), Чернишова Тетяна Анатоліївна (UA), Злепко Олександра Сергіївна (UA), Азархов Олександр Юрійович (UA), Павлов Володимир Сергійович (UA), Кривонос Валерій Валерійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, Хмельницьке шосе, 95, м. Вінниця, 21021 (UA)</p>
--	---

(54) ПРИСТРІЙ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН В КРОВІ

(57) Реферат:

Пристрій для виявлення циркулюючих пухлинних клітин в крові містить камеру для венозної крові, ексцентричні затискачі, корпус з повітряним каналом, пружне кільце, скляний градуйований циліндр, який знаходиться в прозорому пластиковому кожусі з двома трубками. На дні скляного градуйованого циліндра розташована решітка з отворами, на якій закріплений калібрований фільтр. Корпус герметично з'єднаний зі склянкою для прийому рідин та виконаний з виступом, на якому встановлена пружна решітка, що виконана з харчової гуми, з діаметром каліброваних отворів, рівним 3 мкм. На пружному кільці, виконаному з силікону, змонтована друга решітка з отворами і каліброваним фільтром, виконаним з полікарбонату, з діаметром каліброваних отворів, рівним 8 мкм, з можливістю контакту з прокладкою ущільнювача, виконаною з силікону, та розташованим на ній циліндром для заливки рідини з венозною кров'ю і жорстко зафіксованим на корпусі.

UA 127486 U

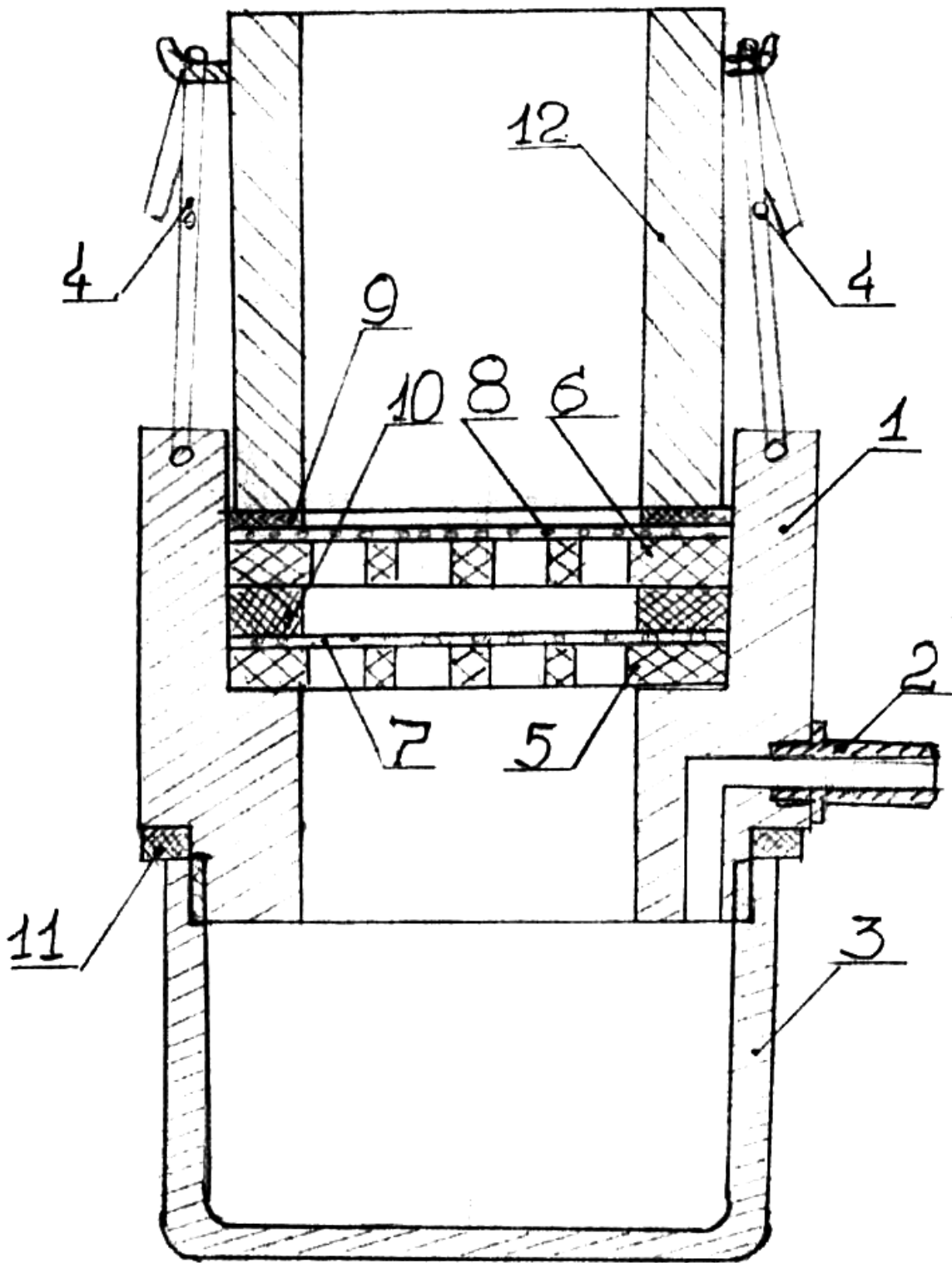


Fig. 1

Корисна модель належить до медицини. Пристрій може бути використаний в лабораторних методах дослідження при встановленні діагнозу і лікуванні злоякісних новоутворень, шляхом виявлення та підрахунку циркулюючих пухлинних клітин (ЦПК), що вийшли в кровотік в результаті процесу метастазування.

5 В даний час визначення ЦПК є новим незалежним прогностичним фактором прогнозу ракового захворювання [див. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res. 2006, 12. 6403-9. Dawood S, Broglio K, Valero V, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? Cancer. 2008, 113 (9). 2422-30. Ly A., Lester SC, Dillon D. Prognostic factors for patients with breast cancer: traditional and new. Surgical pathology. 2012 5. 775-785.] Прогностична цінність виявлення ЦПК була підтверджена в ряді досліджень.

15 Відомий пристрій, в якому в посудині для периферійної крові, розміщений високочутливий силіконовий чип розміром з пластикову картку, на поверхню якого нанесені магнітні намистинки, покриті антитілами, які здатні розпізнавати білок, наявний в більшості ракових пухлин. Чип закріплений до механізму, що здійснює коливальні рухи. Цей відомий пристрій реалізує метод виділення ЦОК по системі Sell Search (система імуномагнітного виділення ЦОК), яка схвалена в США.

20 Недоліками пристрою є: висока вартість, складність і трудомісткість процесу визначення ракових клітин в периферійній крові, велика тривалість дослідження та отримання його результату, низька достовірність.

25 Найбільш близьким аналогом до корисної моделі є "Пристрій для мікропросіювання венозної крові" [патент RU № 2414710, м. кл. G01N 33/574, G01N 33/49, C12M 3/06, опуб. 2011.03.20], що містить камеру для венозної крові, ексцентричні затискачі, корпус з повітряним каналом, скляний градуйований циліндр, який знаходиться в прозорому пластиковому кожусі з двома трубками, нижня трубка необхідна для подачі підігрітої до +36 °С води, верхня трубка - для виходу повітря, на дні скляного градуйованого циліндра розташована пластмасова решітка з отворами (в подальшому решітка), на ній за допомогою металевого кільця закріплений калібрований фільтр, при цьому діаметр отворів у каліброваного фільтра дорівнює 5 мкм, всередині скляного градуйованого циліндра встановлений поршень зі штоком, в поршні виконані два різних за діаметром канали, між якими розташовано металеву кульку з можливістю випуску повітря зі скляного градуйованого циліндра, який має вхідний отвір для подачі венозної крові і вихідний отвір для відтоку венозної крові, з можливістю зміни положень "закрито" і "відкрито".

35 До недоліків даного пристрою відносять: втрати ЦПК при фільтрації крові, що знижує вірогідність отриманого результату аналізу; відсутність герметизації між скляним циліндром, пластмасовими ґратами, металевим кільцем і каліброваним фільтром; нерівномірність створюваного тиску на рідину з венозною кров'ю в скляному циліндрі на початку і кінці фільтрації.

40 При створенні тиску на рідину з венозною кров'ю, згідно з законом Паскаля, вона поширюється у всіх напрямках з однаковою силою. Забезпечити поєднання деталей з повітряними зазорами між ними менше 5 мкм без герметизації неможливо. Продавлювання рідини з венозною кров'ю призведе до її просочуванню між стінкою циліндра, пластмасовими ґратами, металевим кільцем і каліброваним фільтром, це викличе втрату ЦПК. У початковий момент фільтрації створюється надлишковий тиск, при цьому рідина з клітинами крові прагне переміститися в напрямку з меншим опором, це місця протікання (відсутність герметизації). Лейкоцити з ЦПК і іншими клітинами скупчуються в цих місцях щільним шаром, візуалізація ЦПК в цьому випадку неможлива. Відсутній контроль створюваного тиску в скляному циліндрі при просіюванні рідини з венозною кров'ю, що призводить до збільшення похибки при підрахунку ЦПК.

50 Зіткнення дна поршня з поверхнею рідини з венозною кров'ю сприяє осіданню ЦПК на стінку дна поршня, що також може впливати на достовірність результату аналізу. У відомому пристрої діаметр фільтруючих отворів дорівнює 5 мкм. Епітеліальні циркулюючі пухлинні клітини (СТС) виявляються у пацієнтів з недрібноклітинним раком легені та їх діаметр може бути 4 мкм (<http://dayz3.ru/watch/C7PviN11pgg/cirkuliruyushhie-opukholevye-kletki-zhidkostnaya-biopsiya-pri-rake-podzheludochnojj-zhelezy.html>.) В цьому випадку в пристрої виявити ЦПК з діаметром клітини менше 5 мкм неможливо.

60 В основу корисної моделі поставлена задача розробити пристрій для виявлення ЦПК в крові, що дозволяє знизити втрати ЦПК в період проведення аналізу за рахунок забезпечення герметизації, виключення суб'єктивного фактора при створенні тиску на досліджуваний зразок,

забезпечення низького рівномірного тиску на ЦПК при фільтрації і рівномірному розподілі ЦПК на поверхні полікарбонатного фільтра, забезпечення повторного контролю наявності ЦПК за рахунок установки другого полікарбонатного фільтра, що підвищить достовірність результатів дослідження.

5 Поставлена задача вирішується тим, що пристрій для виявлення ЦПК в крові, який містить камеру для венозної крові, ексцентричні затискачі, корпус з повітряним каналом, пружне кільце, скляний градуйований циліндр, який знаходиться в прозорому пластиковому кожусі з двома трубками, на дні скляного градуйованого циліндра розташована решітка з отворами, на якій закріплений калібрований фільтр, згідно з корисною моделлю, корпус герметично з'єднаний зі
10 склянкою для прийому рідин та виконаний з виступом, на якому встановлена пружна решітка, що виконана з харчової гуми, з діаметром каліброваних отворів, рівним 3 мкм, а на пружному кільці, виконаному з силікону, змонтована друга решітка з отворами і каліброваним фільтром, виконаним з полікарбонату, з діаметром каліброваних отворів, рівним 8 мкм, з можливістю контакту з прокладкою ущільнювача, виконаною з силікону, та розташованим на ній циліндром
15 для заливки рідини з венозною кров'ю і жорстко зафіксованим на корпусі.

Суть корисної моделі пояснюється кресленнями, на яких: на фіг. 1 зображено складальне креслення пристрою для виявлення ЦПК в крові, на фіг. 2 зображено структурну схему пристрою для фільтрації венозної крові, на фіг. 3 зображено загальний вигляд мембрани з зонами обстеження, на фіг. 4 зображено результати виявлення ЦПК.

20 Пристрій (фіг. 1) містить: 1 корпус з повітряним каналом, 2 штуцер з прокладкою ущільнювача, 3 склянка для прийому рідини з венозною кров'ю, 4 ексцентричні затискачі, 5 першу решітку з отворами, 6 другу решітку з отворами, 7 перший полікарбонатний фільтр з діаметром каліброваних отворів, рівним 3 мкм, 8 другий полікарбонатний фільтр з діаметром каліброваних отворів, рівним 8 мкм, 9 силіконову прокладку ущільнювача, 10 силіконове кільце, 11 прокладку ущільнювача, 12 циліндр для заливки рідини з венозною кров'ю, 13 пристрій для
25 фільтрації венозної крові в зборі (фіг. 2), 14 манометр, 15 вологовіддільник, 16 регулятор тиску, 17 вакуумний насос, 18 трубопровід. Загальний вигляд мембрани з зонами обстеження, позиція, а - ділянка (фіг. 3), оброблена маркером Cytokeratin clone AE/1 AE/3, б - ділянка, оброблена методом за Романовським-Гімзе. Результати виявлення ЦПК: в - лімфоцит (фіг. 4), д - ЦПК, г - без'ядерна ЦПК (загибель ЦПК в результаті проведених курсів терапії або імунної відповіді організму), к - мікроембола (група клітин ЦПК), з - ядро ЦПК, л - отвір перфорації мембрани, р - цитоплазма, ф - гранули меланоми. Корисна модель для виявлення циркулюючих пухлинних клітин в крові працює наступним чином. У корпус з повітряним каналом 1 закручений повітряний канал штуцер 2 з прокладкою ущільнювача. До корпусу 1 з повітряним каналом прикручують
35 склянкою 3 для прийому рідини з венозною кров'ю, між корпусом з повітряним каналом 1 і склянкою 3 для прийому рідини з венозною кров'ю, розміщена ущільнювача прокладка 11, яка виконана з гуми і забезпечує герметизацію. На виступі корпусу 1 з повітряним каналом встановлена решітка з отворами 5 і полікарбонатний фільтр 7 з діаметром каліброваних отворів, рівним 3 мкм, а на неї встановлено силіконове кільце 10, на якому змонтована
40 додаткова друга решітка 6 з отворами і полікарбонатний фільтр 8, з діаметром каліброваних отворів, рівним 8 мкм., циліндр 12, для заливки рідини з венозною кров'ю встановлений на силіконову прокладку ущільнювача 9, за допомогою ексцентричних затискачів 4 жорстко фіксується до корпусу 1, з повітряним каналом. Жорстка фіксація циліндра для заливки рідини з венозною кров'ю 12, силіконової прокладки 9, силіконового кільця 10, першої та другої решітки з
45 отворами 5 і 6, виконані з харчової гуми, дозволили забезпечити герметизацію в камері фільтрації рідини з венозною кров'ю. Внутрішні діаметри циліндра для заливки рідини з венозною кров'ю 12, силіконової прокладки 9, силіконового кільця 10 і отвори в корпусі з повітряним каналом 1 виконані з однаковим розміром окружності, що дозволяє рідини з венозної кров'ю не осідати у виступах і без втрат пройти через перший і другий полікарбонатні
50 фільтри 7 і 8 без втрат. Пристрій для фільтрації венозної крові в зборі 1 (див. фіг. 2) з'єднане трубопроводом 18 до манометра 14, який приєднаний трубопроводом 18 до вологовіддільника 15. Вологовіддільник 15 підключений до вакуумного насоса 17 через регулятор тиску 16, наприклад, механічний, що зменшує діаметр трубопроводу 18.

Пристрій працює наступним чином. Зразок крові в обсязі 10 мл поміщають в лабораторний посуд і розчиняють в гемолізуючій рідині. Як гемолізуючу рідину використовують дистильовану воду в обсязі 100 мл. Через 20 хвилин еритроцити крові повністю розчиняються. Гемолізат виливали в циліндр для заливки рідини з венозною кров'ю 12. Включають вакуумний насос 17, фіг. 2, за допомогою регулятора 16 встановлюють тиск розрідження в пристрій для фільтрації венозної крові в зборі 1 таким, щоб час фільтрації становив 10-12 хв. Після фільтрації
60 отримують клітинний матеріал. Полікарбонатні фільтри висушують, після чого промивають у

фосфатному буфері двічі по 5 хвилин і забарвлюють за методикою Романовського-Гімзе. При мікроскопіюванні на тлі клітин крові спостерігають ЦПК (якщо вони є). Але так як цитоморфологічні критерії досить суб'єктивні, а кількість клітин пухлини незначна (не видно морфології популяції клітин) для подальшого типування ЦПК використовують імуноцитохімічні

5 типування реактивом Dako (Данія). Апробацію роботи пристрою проведено в онкологічному центрі м. Маріуполя.

Приклад 1. Пацієнт: 1960 р. н., стать жіноча. Обстеження проведено 19.05.2017 р. клінічні дані: Захворювання ректосигмоїдного відділу кишечника, операція проведена в 23.06.16 р., Пройдено 6 курсів хіміотерапії. Дата забору матеріалу 16.05.17 р., Методики забарвлення -

10 забарвлення за Романовським-Гімзе, імуноцитохімічні типування клітин на Cytokeratin clon AE/1 AE/3.

Перед початком виявлення ЦПК отриманий матеріал на фільтрі висушений і відмитий в 96 % спирту. Для забарвлення ЦПК використовували стандартну систему Poly Vue, типування клітин провели згідно з протоколом системи візуалізації.

15

В досліджуваному матеріалі на тлі лімфоцитів крові спостерігається велика кількість апоптичних тілець і окремо розташовані, циркулюючі клітини пухлини в помірній кількості, поодинокі мікроемболи. Реакція на цитокератини виражено позитивна.

Приклад 2. Пацієнт 1974 р. н., стать чоловіча. Клінічні дані: меланома шкіри спини, У 05.20.2016 р. проведена операція, пройдено 6 курсів хіміотерапії. Дата забору матеріалу: 22.05.2017. Методики забарвлення проведена за Романовським-Гімзе, цитохімічне типування. Після фарбування матеріалу за Романовським-Гімзе було проведено цитохімічне типування клітин.

20

Результат цитохімічного типування. Перед початком дослідження отриманий матеріал, розташований на фільтрі, висушений і відмитий в 96 % етиловому спирті, використаний стандартний протокол проведення цитохімічної реакції.

25

В досліджуваному матеріалі виявлено невелику кількість (7) пухлинних клітин меланоми. Реакція на цитохімія позитивна (в цитоплазмі клітин візуалізуються дрібні гранули меланіну).

Результати дослідження наведені на фіг. 4.

Оцінка втрат ЦПК при фільтрації.

30

Для виявлення втрат ЦПК діаметром 8 мкм і вище провели обробку полікарбонатного фільтру з 3 мкм отворами. Методика обробки проведена аналогічно, як для обробки полікарбонатного фільтру з 8 мкм отворами. У зразку не виявлено ЦПК діаметром 8 мкм.

Герметизація склянки для прийому рідини з венозною кров'ю і полікарбонатного фільтру дозволяє уникнути втрат ЦПК при фільтрації рідини з венозною кров'ю.

35

Наявність вакуумного насоса і регулятора дозволяє створити у вакуумній камері необхідний, рівномірний і постійний тиск від початкового моменту процесу фільтрації рідини з венозною кров'ю до його закінчення, що виключає вплив суб'єктивного фактора, при створенні тиску на рідину з венозною кров'ю на відміну пристрою найближчого аналога.

Простота конструкції пристрою для виявлення ЦПК в крові дозволяє знизити витрати часу на складання та розбирання пристрою, проведення стерилізації деталей пристрою, скоротивши тим самим час проведення аналізу.

40

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Пристрій для виявлення циркулюючих пухлинних клітин в крові, що містить камеру для венозної крові, ексцентричні затискачі, корпус з повітряним каналом, пружне кільце, скляний градуйований циліндр, який знаходиться в прозорому пластиковому кожусі з двома трубками, на дні скляного градуйованого циліндра розташована решітка з отворами, на якій закріплений калібрований фільтр, який **відрізняється** тим, що корпус герметично з'єднаний зі склянкою для прийому рідин та виконаний з виступом, на якому встановлена пружна решітка, що виконана з харчової гуми, з діаметром каліброваних отворів, рівним 3 мкм, а на пружному кільці, виконаному з силікону, змонтована друга решітка з отворами і каліброваним фільтром, виконаним з полікарбонату, з діаметром каліброваних отворів, рівним 8 мкм, з можливістю контакту з прокладкою ущільнювача, виконаною з силікону, та розташованим на ній циліндром для заливки рідини з венозною кров'ю і жорстко зафіксованим на корпусі.

45

50

55

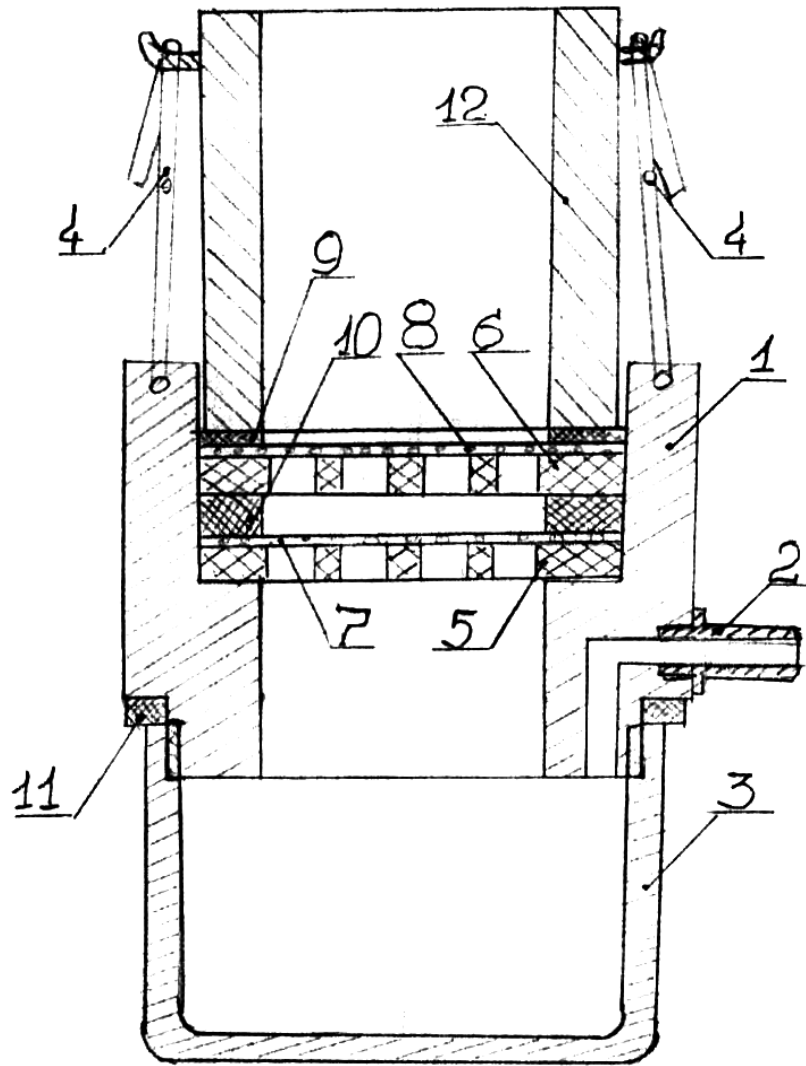


Fig. 1

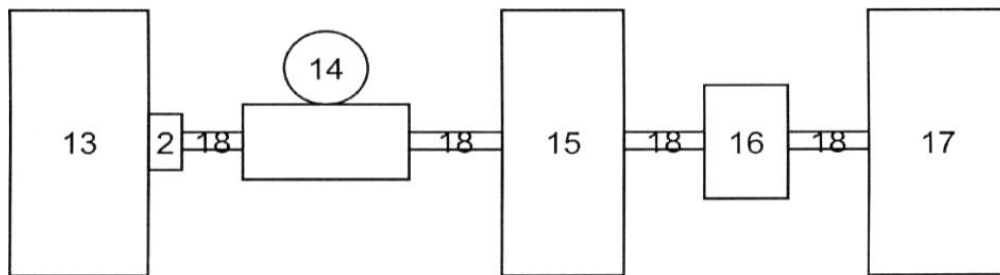
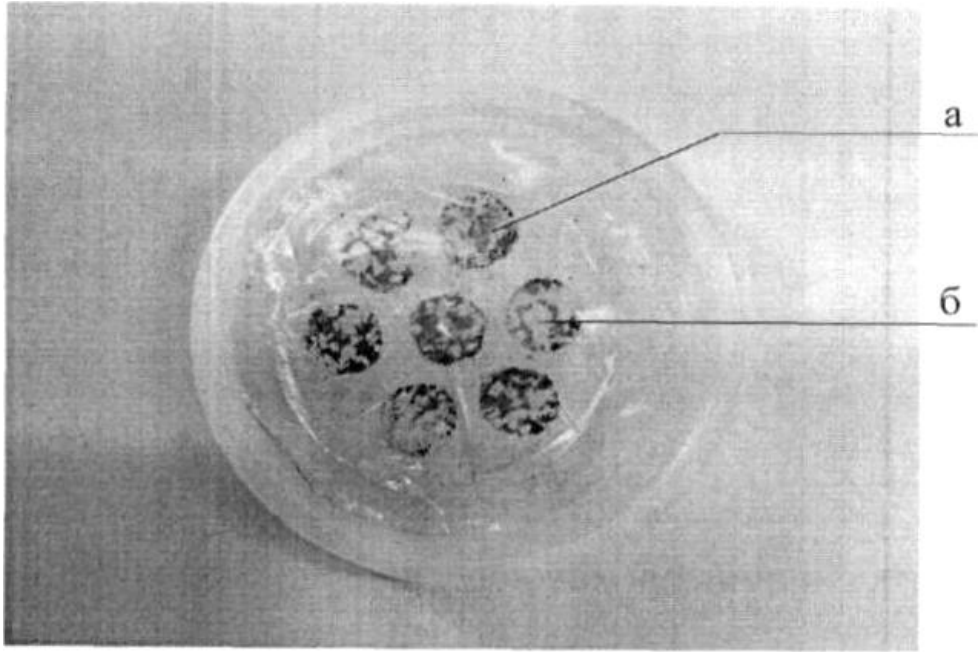
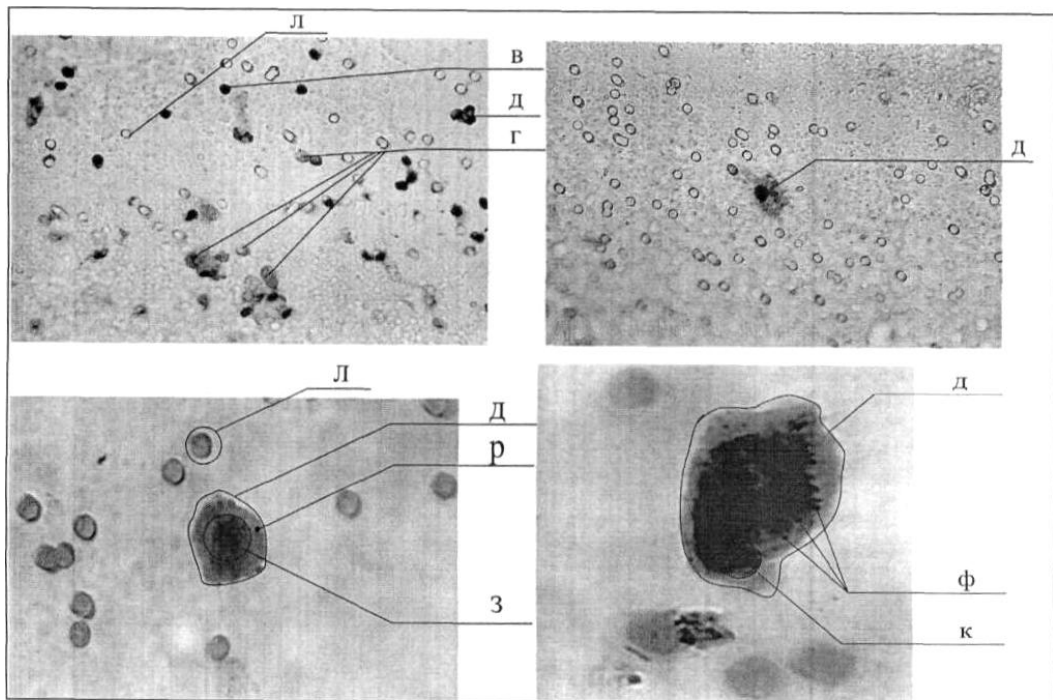


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601