

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202492148 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.17

(51) Int. Cl. G01N 1/30 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.03.15

(54) СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦА ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОРИСТОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

(31) 22162464.6

(32) 2022.03.16

(33) EP

(86) PCT/EP2023/056553

(87) WO 2023/174977 2023.09.21

(71) Заявитель:
ВИВАСКОУП ГМБХ (DE)

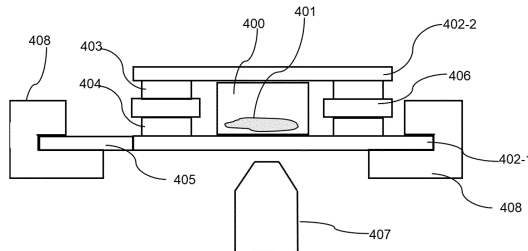
(72) Изобретатель:

Банки Роберто (DE), Крешенци
Анна, Ди Маттео Франческо Мария,
Таффон Кьяра (IT)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к способу подготовки образца для микроскопического исследования, включающему стадии использования пористого материала на основе хитозана, имеющего взаимосвязанные поры размером от 5 до 700 мкм и общую пористость (объемную долю) от 40 до 90%, добавления по меньшей мере одного биопсийного образца, содержащего ткань и/или эукариотические, и/или прокариотические клетки, и/или эукариотические клетки, содержащие вирусные частицы, к пористому материалу на основе хитозана; и добавления (C₁-C₆)алкилового спирта или его смесей.



202492148

A1

A1

202492148

СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦА ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОРИСТОГО МАТЕРИАЛА
НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

Изобретение относится к способу подготовки образцов для микроскопического исследования, в частности, для патологической оценки свежих биопсийных образцов с использованием пористого материала на основе хитозана.

Использование материала на основе хитозана для включения цитологических препаратов описано в WO 2018/083616 A1, а также Bruschini, S. et. al. в статье *“CytoMatrix for a reliable and simple characterization of lung cancer stem cells from malignant pleural effusions”* в J. Cell Physiol. 2020; 235; 1877-1887. В этой статье описано использование материала на основе хитозана под названием «CytoMatrix» в качестве основы для определения характеристик ограниченного количества раковых клеток, выделенных из злокачественных плевральных выпотов (МРЕ) пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Образцы клеток нагружают на клеточный блок CytoMatrix™, после чего фиксируют формалином и заключают в парафин. Затем клеточный блок разрезают на срезы толщиной 5 мкм с помощью микротомы, и срезы монтируют на предметные стекла для микроскопического исследования.

Общепринятые рабочие процессы гистопатологического исследования включают фиксацию в формалине в течение нескольких часов, заливку биопсийного материала в так называемые «смолы для заливки», такие как Cyromatrix™, или парафин, разрезание залитых блоков на срезы, монтировку срезов на предметное стекло микроскопа с последующим окрашиванием, например, обычно окрашиванием гематоксилин-эозином. Эти стадии занимают много времени, требуют трудоемкого лабораторного оборудования и, как правило, их сложно настроить и синхронизировать с хирургическими рабочими процессами. В таких рабочих процессах гистопатологического исследования срезы могут быть разрушены и, таким образом, непригодными (например, при разрезании на срезы), и, следовательно, информация о срезах для диагностики теряется.

Новый материал на основе хитозана описан в WO 2018/083616 A1, который в настоящее время коммерчески доступен под торговой маркой CytoMatrix™, который является пригодным для подготовки образцов для гистопатологического исследования. Согласно рабочему процессу, раскрытому в техническом описании CytoMatrix™, образец погружают в формалин по меньшей мере на 6-8 часов, если биопсийный образец предварительно обрабатывают перед загрузкой на CytoMatrix™, или по меньшей мере на 12 часов, если образец непосредственно наносят на CytoMatrix™ (см. <https://cytomatrix.it>).

Это означает, что результаты биопсии доступны только на следующий день после биопсии, а медицинский работник, например хирург, узнает о результатах диагностики или успешности процедуры биопсии только гораздо позже.

Поэтому желательно, особенно для медицинского работника и пациентов, получать результаты биопсии сразу же после, предпочтительно во время процедуры биопсии.

Авторы изобретения обнаружили, что можно использовать пористый материал на основе хитозана, описанный в WO 2018/083616 A1, в частности, материал, доступный под торговой маркой CytoMatrix™, для подготовки образцов для микроскопического исследования без затратной по времени фиксации биопсийного образца посредством погружения в формалин на несколько часов.

Таким образом, изобретение относится к новой процедуре подготовки образцов для быстрой микроскопической оценки патологических биопсийных материалов, которые оцениваются в течение короткого периода времени, предпочтительно во время процедуры биопсии, которая может представлять собой сеанс биопсии или хирургическую операцию, например, удаление злокачественных (например, раковых или инфекционных) тканей.

Это является выгодным, поскольку пациент все еще находится на месте, и врач может сразу же принять решение о дальнейших действиях (например, хирургическом вмешательстве или повторной биопсии) на основании оценки результатов биопсии, в частности, информации, полученной с помощью микроскопических изображений.

Новый способ быстрой патологической оценки в соответствии с изобретением обеспечивает множество преимуществ для медицинского работника (например, хирурга, эндоскописта, операционного/больничного персонала), а также для пациентов с точки зрения затрат, потенциальной боли и страданий для пациентов, а также сокращает рабочее время. Поскольку гистопатолог может оценить образцы биопсии немедленно и во время процедуры биопсии.

Исследование биопсийного образца проводят не на разрезанных срезах, а на изображениях оптических срезов. Изображения оптических срезов представляют собой изображения тонких срезов биопсийных образцов. Их получают с использованием соответствующих технологий микроскопической визуализации, таких как технология конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. При использовании оптического секционирования изображений, в отличие от использования разрезанных срезов, подготовленных в соответствии с традиционными рабочими процессами гистопатологического исследования, биопсийные материалы остаются нетронутыми. В стандартных рабочих процессах гистопатологического исследования некоторые срезы образцов разрушаются и теряются впустую во время разрезания, и, следовательно,

информация о срезах, необходимая для диагностики, теряется. Кроме того, оптическое секционирование изображений занимает меньше времени, менее трудоемко и не требует громоздкого лабораторного оборудования. Кроме того, подготовка биопсийного образца и его исследование могут быть синхронизированы с хирургическими рабочими процессами.

Кроме того, место для оценки микроскопических данных, например, в виде цифровых микроскопических изображений, может находиться на месте или за его пределами, т.е. в непосредственной близости от места, где была взята биопсия, или может быть предоставлено в режиме реального времени стороннему эксперту.

Результаты гистопатологического исследования могут помочь хирургу в проведении операции. На основании результатов хирург может принять немедленное решение о лечении, если это необходимо, уже в операционной. Например, если биопсия дает положительный результат на раковые клетки, хирург удаляет опухоль или несколько ее краев, чтобы пациенту не пришлось проходить ту же процедуру снова и позже. Таким образом, мгновенная оценка биопсийного образца помогает хирургу удалить все злокачественные ткани и исключает возможность рецидива опухоли. Или, если биопсия показала отрицательный результат на раковые клетки, хирург случайно не удалит больше здоровых тканей, чем необходимо. Это выгодно для пациента, поскольку можно избежать негативных физиологических и психологических побочных эффектов удаления здоровых тканей и не слишком сильно изменить внешний вид пациента (например, форму лица или тела). Кроме того, удаление лимфатических узлов во время онкологической операции может быть отменено, если при тонкоигольной аспирационной биопсии лимфатических узлов не обнаружено раковых клеток. При операции по удалению злокачественной опухоли молочной железы подмышечные узлы удаляются в качестве стандартного способа предосторожности.

Как правило, если требуется повторная биопсия по вышеуказанным причинам или из-за плохого качества или недостаточного количества биопсийного материала для постановки диагноза, медицинский работник и пациент все еще находятся на месте, и повторная биопсия может быть проведена немедленно.

Еще одним преимуществом изобретения, помимо простоты подготовки образца, является возможность использования настольного микроскопа (такого как, например, VivaScope™ 2500), и, таким образом, исследование биопсийного образца может быть выполнено в стерильных условиях, т.е. в операционной или в стерильном операционном отделении больницы.

Таким образом, в варианте осуществления 1 изобретение относится к способу подготовки образца для микроскопического исследования, включающему следующие

стадии:

стадия (i): использование твердого или пластичного пористого материала на основе хитозана, имеющего взаимосвязанные поры размером от 5 мкм до 700 мкм и общую пористость (объемную долю) от 40% до 90%;

стадия (ii): добавление по меньшей мере одного биопсийного образца, содержащего ткань и/или эукариотические, и/или прокариотические клетки, и/или эукариотические клетки, содержащие вирусные частицы, к пористому материалу на основе хитозана; и

стадия (iii): добавление (C₁-C₆)-алкилового спирта или его смесей.

В варианте осуществления 2 изобретение относится к способу, описанному в варианте осуществления 1, в котором пористый материал на основе хитозана получают путем обеспечения раствора хитозана и/или лактозилированного хитозана или раствора винилового производного хитозана, при этом указанное виниловое производное используют отдельно или в смеси с сульфгидрильным производным хитозана, при этом все соединения имеют молекулярную массу от 50 кДа до 200 кДа и растворяются в кислотном растворе полярной неорганической или органической кислоты, с последующей гелификацией указанного раствора с получением гидрогеля и лиофилизацией полученного гидрогеля с получением пористого материала.

В варианте осуществления 3 изобретение относится к способу согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, в котором (C₁-C₆)-алкиловый спирт или его смеси, используемые на стадии (iii), содержат по меньшей мере 5% воды или водного буфера.

В варианте осуществления 4 изобретение относится к способу согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, дополнительно включающему стадию (iv), а именно окрашивание биопсийного образца путем добавления по меньшей мере одного флуоресцентного красителя, который предпочтительно выбран из красителей типа 2,3-бензохинолина, акридинового оранжевого, акрифлавина, профлавина и акридинового желтого, красителей типа тиазина, толуидинового синего и метиленового синего, цветов трихромной окраски по Массону, метилового синего, анилинового синего, быстрого зеленого FCF, водного синего, гематоксилина, эозина, бромистого этидия, родамина 123, Syber Green, Acid Fusion, сириуса красного, Col-F, нильского синего, нильского красного, масляного красного O, аурамина O, нейтрального красного, патентованного синего, флуоресцеина, индоцианина зеленого (ICG), метилового зеленого, пиронина Y и их комбинаций. Среди ранее упомянутых красителей предпочтительно использовать 2,3-бензохинолиновые красители, в частности, акридиновый оранжевый. Краситель может

содержать линкерную молекулу, такую как антитело или лектин. Если краситель связан с линкерной молекулой, то линкер взаимодействует с клетками и/или тканью биологического образца.

В варианте осуществления 5 изобретение относится к способу согласно любому из варианту осуществления 1 - варианту осуществления 4, в котором пористый материал на основе хитозана используют в форме плиты или блока, где по меньшей мере одна поверхность плиты или блока способна принимать биопсийные образцы в полном объеме, собранные посредством инцизионной биопсии, стереотактической биопсии, стеральной биопсии, биопсии ворсин хориона, конусной биопсии, эндоскопической биопсии, игольной биопсии (чрескожной биопсии), тонкоигольной аспирационной биопсии (FNA), тонкоигольной биопсии (FNB), биопсии хирургической маленькой иглой, микроигольной биопсии, толстоигольной биопсии или биопсии клеточной суспензии.

Форму и размер (ширину, длину и высоту) пористого материала на основе хитозана выбирают таким образом, чтобы он соответствовал требованиям, предъявляемым к держателю препарата микроскопа, используемого для патологического исследования, в частности, для оптического секционирования изображения, а также для возможности приема как можно большего объема биопсийного образца и, в частности, без необходимости фрагментации образца. Используя способ согласно изобретению, можно исключить разрезание пористого материала на основе хитозана на срезы после монтирования образца на подложку и перед микроскопическим исследованием, что, опять же, упрощает подготовку образца по сравнению со стандартными способами подготовки к гистопатологическому исследованию с использованием фиксированных формалином срезов для микроскопической оценки.

В одном из вариантов осуществления изобретения длина и/или ширина или диаметр по меньшей мере одной поверхности плиты или блока, которая способна принимать биопсийный образец, адаптирован к типу биопсийных образцов, для которых они будут использованы, и к размеру держателя образца используемого микроскопа. Специалист в данной области может легко определить подходящий размер. Например, если полученные при микроигольной биопсии образцы исследуют с помощью микроскопа типа VivaScope™ 2500 способом согласно изобретению, то длина одной стороны плиты или блока предпочтительно составляет по меньшей мере 0,8 см.

При использовании конфокальной микроскопии, в частности, микроскопа типа VivaScope™ 2500, размер блока или плиты зависит от жесткости пористого материала на основе хитозана, и в контексте варианта осуществления 2 или CytoMatrix™ размер предпочтительно находится в диапазоне от 0,8 см x 0,8 см x 0,2 см до размера 1,5 см x 1,5

см x 0,2 см, включая размеры, такие как 0,8 см x 1,5 см (ширина x длина). Возможны меньшие и большие размеры.

Микроскоп VivaScope™ 2500 использует лазерную сканирующую конфокальную технологию для получения высококачественных изображений оптических срезов с клеточным разрешением. Он обеспечивает оптическое лазерное сканирование срезов без использования длительного и трудоемкого разрезания микротомом при обычных цито- или гистопатологических процедурах и позволяет быстро получать изображения образцов в течение нескольких минут. В дополнение к этому, оцифрованные изображения могут быть переданы гистопатологу удаленно в режиме реального времени.

Адаптация размера CytoMatrix™ от размеров коммерчески доступных в настоящее время блоков 0,8 см x 0,8 см к размерам, указанным в настоящем документе, позволяет загружать больше биопсийных образцов на один и тот же CytoMatrix™ и, следовательно, позволяет визуализировать несколько биопсийных образцов всего лишь за один сеанс визуализации. Поскольку специалист по биопсии или хирург обычно делает несколько биопсий за один сеанс, выбор большего размера позволяет сократить общее время микроскопической визуализации в пользу более быстрой диагностики.

В варианте осуществления 6 пористый материал на основе хитозана, используемый на стадии (i) способа согласно изобретению, используется в решетчатом ящике, открытом сверху, имеющем по меньшей мере одно отделение, которое приспособлено к желаемому размеру плиты или блока. Использование пористого материала на основе хитозана в таком ящике является выгодным для облегчения обращения часто с эластичным пористым материалом на основе хитозана.

В варианте осуществления 7 образец, подготовленный в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, монтируют на держатель препарата или образца, который будут использовать в микроскопии для исследования биопсийных образцов, что представляет стадию (v) способа согласно изобретению.

Подходящие держатели образцов включают держатели, в которых образец зажат между первой пластиной, содержащей окно, через которое проходит оптический луч, и второй пластиной. Для скрепления первой и второй пластины они могут содержать магнитные средства, так что первая и вторая пластина притягиваются магнитной силой. Такие держатели препаратов известны и описаны в DE 102019101035 A1. Для точности микроскопической оценки важно, чтобы образец был надежно закреплен на держателе исследуемого под микроскопом образца во время получения данных микроскопического исследования об изображениях оптических срезов. В противном случае, если микроскопический образец начнет перемещаться во время сбора данных - независимо от

перемещений столика микроскопа - сканирование изображений оптических срезов будет невозможно.

Авторы изобретения обнаружили, что выгодно использовать магнитный держатель образцов, описанный в DE 102019101035 A1, однако модифицированный тем, что в нем отсутствует эластичная подушка и используются разделители. Разделитель устанавливается между магнитами нижней и верхней пластины, не изменяя или только частично изменяя магнитное притяжение между магнитами нижней и верхней пластины. Использование разделителя необходимо, поскольку магнитное давление может сжать и повредить образец для микроскопического исследования. Такой держатель препарата показан в качестве примера на фиг. 3 и фиг. 4.

Таким образом, изобретение также относится к подготовке образца для микроскопического исследования, как описано в настоящем документе, в частности, в соответствии с вышеупомянутыми вариантами осуществления, с использованием магнитного держателя препарата, показанного на фиг. 3 и фиг. 4, содержащего разделители, установленные между магнитными затворами верхней и нижней пластины держателя препарата. Изобретение также относится к магнитному держателю образца, как описано в настоящем документе.

В дополнение к вышеупомянутому преимуществу, монтирование образца для микроскопического исследования на магнитном держателе по изобретению обеспечивает плоскостность поверхности изображения, а также его правильную локализацию в пределах фокусного расстояния объектива микроскопа. Это имеет решающее значение для получения фокального изображения, т.е. оптического секционирования изображения биопсийных образцов и, таким образом, диагностики.

Материалом разделителя может быть неорганический или органический, натуральный или синтетический эластомер, пластиомер или любой тип полимерной глины или пластилина.

Кроме того, изобретение относится к образцу, подготовленному с помощью способов по изобретению, а также к набору, содержащему материал на основе хитозана и магнитный держатель образца, включающий разделитель.

Кроме того, изобретение относится к применению образца, подготовленного с помощью способа согласно изобретению, в частности, как описано в вариантах осуществления выше, для немедленного (мгновенного) исследования биопсийных образцов после сбора. Немедленное означает, что свежевзятый биопсийный образец может быть визуализирован после проведения биопсии без выполнения длительной стадии фиксации с использованием формалина в течение по меньшей мере 6 часов.

Временные рамки для биопсийных образцов, которые следует считать «свежими», обычно находятся в диапазоне от непосредственно после биопсии до момента времени, когда образец начинает разрушаться без применения к образцу способов консервации.

Авторы изобретения обнаружили, что стадия (iii), а именно добавление по меньшей мере одного (C₁-C₆)-алкилового спирта, усиливает проникновение флуоресцентного красителя в биопсийный образец, и полагают, что он также частично фиксирует биопсийный образец в пористом материале на основе хитозана. Используемый (C₁-C₆)-алкиловый спирт представляет собой, например, метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, 2-метил-1-пропанол, 2-метил-2-пропанол, циклогексанол, предпочтительно этанол. Концентрация используемого спирта предпочтительно находится в диапазоне от 50% (об./об.) до 95% (об./об.), предпочтительно в диапазоне от 65% (об./об.) до 75% (об./об.). Спирт может быть доведен до желаемой концентрации путем добавления воды или подходящих водных буферных растворов. Подходящими буферными растворами являются те, которые оказывают стабилизирующее действие на клетки, содержащиеся в биопсийном образце. Специалист знает, как выбрать соответствующие буферные растворы с учетом исследуемого биопсийного образца.

Авторы изобретения обнаружили, что в этом отношении этанол является особенно подходящим, особенно если его использовать в концентрации от 65% об./об. до 75% об./об., поскольку он обеспечивает хороший эффект пермеабилзации без повреждения клеточной морфологии биопсийного образца. Особенно предпочтительно использовать 70% об./об. этанола.

Спирт используют в соответствующем количестве, которое может находиться в диапазоне от 50 мкл до 2 мл. Это в основном зависит от размера используемого пористого материала на основе хитозана и объема биопсийного образца. Если для микроскопической оценки используют микроскоп типа VivaScope™ 2500, то подходящим является от 50 мкл до 500 мкл, в зависимости от объема исследуемых биопсийных образцов. Спирт усиливает пермеабилзацию биопсийных образцов и, следовательно, во время окрашивания вызывает быстрое и эффективное проникновение флуоресцентного красителя в биопсийный образец, часто всего за несколько секунд, и способствует однородному окрашиванию по всему биопсийному образцу. Таким образом, обработка спиртом обеспечивает однородное окрашивание биопсийного образца, которое необходимо для оценки/диагностики. Без вышеописанных эффектов (например, проникновения флуоресцентного красителя в биопсийный образец под действием спирта) часть подробной клеточной морфологии, которая необходима для точной оценки биопсийного образца, не может быть визуализирована на полученных изображениях. Благоприятный

эффект добавления спирта проиллюстрирован на фиг. 2a/2b и фиг. 2c/2d.

Количество красителя, добавляемого на стадии (iv), зависит от типа красителя и биопсийного образца, в частности, от типа биологического материала, подлежащего исследованию, и может быть определено квалифицированным специалистом с помощью стандартных экспериментов или описано производителем красителя. После добавления красителя отдельно или в виде комбинации красителей и после короткого инкубационного периода избыток красителя удаляют путем промывания образца соответствующим, предпочтительно водным и буферным раствором.

На стадии (iv) способа согласно изобретению может быть использован любой подходящий краситель, который способен визуализировать клетки и/или ткани и может быть использован со способами микроскопического исследования. Предпочтительно использовать флуоресцентные красители отдельно или в сочетании с другими (флуоресцентными) красителями. Предпочтительными являются флуоресцентные красители. Краситель(и) могут взаимодействовать с клетками и/или тканями образца напрямую или опосредованно через линкерные молекулы, способные связывать клетки и/или ткани, такие как, например, антитела и лектины.

В качестве примера подходящих красителей можно упомянуть следующие красители, обычно используемые для окрашивания биопсийных образцов:

- красители типа 2,3-бензохинолина, такие как акридиновый оранжевый, акрифлавин, профлавин и акридиновый желтый и их производные;
- красители типа тиазина, такие как толуидиновый синий и метиленовый синий и их производные;
- цвета трихромных красителей Массона, метиловый синий, анилиновый синий, быстрый зеленый FCF, водяной синий, гематоксилин и эозин, и их производные;
- бромистый этидий, родамин 123, Syber Green, Acid Fusion, сириус красный, Col-F, нильский синий, нильский красный, масляный красный O, аурамин O, нейтральный красный, патентованный синий, флуоресцеин, индоцианин зеленый (ICG), метиловый зеленый, пиронин Y и их производные.

Они могут быть использованы отдельно или в виде смеси как минимум двух красителей.

Как упоминалось выше, подходящий пористый материал на основе хитозана готовят в соответствии со способами, описанными в WO 2018/083619 A1, для получения материала, имеющего взаимосвязанные поры размером от 5 мкм до 700 мкм и общую пористость (объемную долю) от 40% до 90%. Для определения размеров пор можно использовать сканирующие электронные микроскопы (SEM). То же самое относится и к

определению общей пористости. Материал может быть получен путем обеспечения раствора хитозана и/или лактозилированного хитозана или раствора винилового производного хитозана, при этом указанное виниловое производное используют отдельно или в смеси с сульфгидрильным производным хитозана, при этом все соединения имеют молекулярную массу от 50 кДа до 200 кДа и растворяются в кислотном растворе полярной неорганической или органической кислоты, с последующей гелификацией указанного раствора с получением гидрогеля и лиофилизацией полученного гидрогеля с получением пористого материала.

Пористый материал на основе хитозана придает биопсийным образцам целостность, что позволяет с ним обращаться, и при использовании материал защищает биопсийные образцы от потери или повреждения во время дальнейшей обработки, а именно окрашивания и визуализации. И после этого, может быть выполнено хранение образца и при необходимости проведен дополнительный патологический анализ, такой как иммуноокрашивание или анализ ДНК.

Биопсийные образцы представляют собой биологические образцы, содержащие ткань и/или эукариотические, и/или прокариотические клетки, и/или эукариотические клетки, содержащие вирусные частицы. Образцы могут быть получены из содержащих клетки физиологических жидкостей, таких как кровь, моча, мокрота, выпот, лаваж, слюна и другая водянистая влага, или путем проведения биопсии, такой как инцизионная биопсия, цитологическая биопсия шейки матки, бритвенная биопсия, щеточная биопсия (например, цитологические образцы кожи), биопсия путем взятия мазка, стереотактическая биопсия, стеральная биопсия, биопсия ворсин хориона, коническая биопсия, эндоскопическая биопсия, биопсия с использованием адгезивного пластыря, а также путем проведения игольной биопсии (чрескожной биопсии), такой как тонкоигольная аспирационная биопсия (FNA), тонкоигольная биопсия (FNB), биопсия хирургической маленькой иглой, микроигольная биопсия и толстоигольная биопсия. В способе согласно изобретению предпочтительно используют биопсийные образцы, полученные при игольной биопсии, такой как тонкоигольная аспирационная биопсия, биопсия хирургической маленькой иглой, тонкоигольная биопсия и микроигольная биопсия, в частности, при FNA и FNB.

FNA и FNB являются известными методами биопсии (см. DOOLEY, William C. *Biopsy Techniques in Non-palpable or Palpable Breast Lesions*. In: *Breast Disease*. Springer, Cham, 2016. S. 3-11, or TIAN, Li, et al. *Evaluation of 22G fine-needle aspiration (FNA) versus fine-needle biopsy (FNB) for endoscopic ultrasound-guided sampling of pancreatic lesions: a prospective comparison study*. *Surgical endoscopy*, 2018, 32. Jg., Nr. 8, S. 3533-3539).

В то время как биопсийные образцы, полученные при игольной биопсии и щеточной биопсии, могут быть непосредственно помещены на пористый материал на основе хитозана, часто бывает предпочтительно концентрировать клетки физиологических жидкостей перед добавлением в пористый материал. Концентрирование образца предпочтительно проводят путем центрифугирования. Полученный содержащий клетки осадок может быть ресуспендирован в соответствующем количестве подходящего раствора, который предпочтительно представляет собой защищающий клетки буферный раствор. Кроме того, собранный биологический материал, полученный при биопсии на основе липкого пластыря или щеточной биопсии, необходимо предварительно обработать перед добавлением на пористый материал на основе хитозана, поскольку клетки удаляются с пластыря или щетки, например, с помощью защищающего клетки буферного раствора. Клетки в полученном растворе образца могут быть концентрированы путем центрифугирования и загружены на пористый материал на основе хитозана, как описано ранее.

Биопсийные образцы, особенно те, которые получены при тонкоигольной аспирационной биопсии, биопсии хирургической маленькой иглой, тонкоигольной биопсии и микроигольной биопсии, часто бывают хрупкими, непрочными и не имеют целостности. С ними нельзя обращаться надлежащим образом в соответствии со стандартными процедурами подготовки цитологических образцов. Обработка часто приводит как минимум к частичной потере образца и, что еще хуже, к повреждению клеток. Результат исследования может быть, таким образом, неполным и по меньшей мере частично неверным и, таким образом, вводящим в заблуждение.

После выполнения способов согласно изобретению образец, содержащий материал на основе хитозана и биопсийный образец, можно сохранить и обработать в соответствии со стандартными подготовками гистологических образцов, например, как описано в WO 2018/083616 A1.

Все доступные микроскопы могут быть использованы для исследования образцов, подготовленных с помощью способов согласно изобретению, предпочтительными являются микроскопы, которые способны создавать изображения оптических срезов, как описано выше. Предпочтительно использовать лазерные сканирующие конфокальные микроскопы. Такими микроскопами являются, например, микроскопы серий VivaScope™, продаваемые MAVIG GmbH (Германия), или HistologScanner™, продаваемые Saman Tree Medical SA (Швейцария).

Также подходят другие микроскопы, способные создавать изображения оптических срезов, например:

- многофотонные флуоресцентные микроскопы,
- двухфотонные или трехфотонные флуоресцентные микроскопы, например, FD1070 от компании Femto Diagnostics B.V. (Нидерланды),
- оптическая когерентная томография, например, от фирмы Perimeter Medical Imaging, Торонто (Канада),
- оптическая когерентная томография полного поля, например, Light-CT Scanner от компании LLTech.,
- микроскопия с УФ-поверхностным возбуждением, например, от компании Muse Microscopy Inc. Irvine, CA (США),
- подповерхностная визуализация высокого и сверхвысокого разрешения,
- вынужденное рамановское рассеяние,
- вынужденная рамановская гистология, например, от компании InVenioImaging Inc., Santa Clara, CA (США),
- микроскопия с генерацией множественных гармоник, генерация второй гармоники (SHG) или генерация третьей гармоники (THG).

Изобретение проиллюстрировано на чертежах и в экспериментах, которые более подробно описаны ниже, без ограничения или лимитирования применения чертежами или примерами.

На фиг. 1a показана загрузка полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии материала 101 на материал 100 на основе хитозана с помощью шприца, используемого для FNA.

На фиг. 1b представлен вид сверху полученного при FNA биопсийного образца 101 на материале 100 на основе хитозана после обработки спиртом и окрашивания акридиновым оранжевым перед получением изображения. Изображение изменено путем инвертирования цветов. Пунктирная линия характеризует границы загруженного биопсийного образца.

На фиг. 1c показана загрузка полученного при тонкоигольной биопсии биопсийного образца 103, имеющего трубчатую форму/структуру, на материал 100 на основе хитозана.

Фиг. 1d представляет собой вид сверху полученного при тонкоигольной биопсии биопсийного образца 101 на материале 100 на основе хитозана после обработки спиртом и окрашивания акридиновым оранжевым перед получением изображения. Изображение изменено путем инвертирования цветов. Трубочатые фрагменты ткани, полученной при FNB, являются хрупкими. Материал на основе хитозана поддерживает структуру FNB и защищает ее от повреждений или утраты.

На фиг. 2а на верхнем снимке показано микроскопическое изображение полученного при FNA биопсийного образца, загруженного на материал на основе хитозана, окрашенного акридиновым оранжевым, но без обработки спиртом. На нижнем снимке показан выделенный в прямоугольную рамку указанный участок в увеличенном масштабе. Морфология образца с трудом поддается идентификации.

На фиг. 2b на верхнем снимке показано микроскопическое изображение того же полученного при FNA биопсийного образца, что и на фиг. 2а, загруженного на материал на основе хитозана, который был снова окрашен и обработан спиртом перед повторным окрашиванием. На нижнем снимке показан выделенный в прямоугольную рамку указанный участок в увеличенном масштабе. Морфология образца теперь поддается идентификации, и детали морфологии необходимы для правильной оценки/диагностики биопсийного образца.

На фиг. 2с, на верхнем снимке показано микроскопическое изображение первой половины полученного при FNA биопсийного образца (разделенного на 2 половины), загруженного на материал на основе хитозана и окрашенного акридиновым оранжевым без добавления спирта. На нижнем снимке показан выделенный в прямоугольную рамку указанный участок в увеличенном масштабе. Морфология образца с трудом поддается идентификации.

На фиг. 2d на верхнем снимке показано микроскопическое изображение второй половины того же полученного при FNA биопсийного образца, который использовали для подготовки образца, показанного на фиг. 2с, загруженного на материал на основе хитозана, обработанного спиртом, а затем окрашенного акридиновым оранжевым. На нижнем снимке показан выделенный в прямоугольную рамку указанный участок в увеличенном масштабе. Морфология образца теперь поддается идентификации, и детали морфологии необходимы для правильной оценки/диагностики биопсийного образца.

На фиг. 3 показан вид сверху магнитного держателя препарата, содержащего базовую пластину 302-1, имеющую магнитные элементы 304 с противоположными полярностями и поддерживающую пластину 302-2, имеющую магнитные элементы 303. Микроскопический образец показан как материал 300 на основе хитозана прямоугольной формы, на который загружен биопсийный образец. Материал на основе хитозана может иметь выемку для приема биопсийного образца.

На фиг. 4 схематически показан вид сбоку магнитного держателя образца, состоящего из базовой пластины 402-1 и поддерживающей пластины 402-2. Магнитные элементы 403 и магнитные элементы 404 с противоположной полярностью выступают из базовой пластины 402-1 и поддерживающей пластины 402-2, соответственно. Разделитель

406, изготовленный из эластичного материала, расположен между магнитными элементами и магнитными элементами с противоположной полярностью с обеих сторон пластин и, таким образом, фиксирует материал 400 на основе хитозана, на который загружен биопсийный образец 401. Разделитель 306 модулирует магнитную силу магнитных элементов 403 и 404, чтобы защитить биопсийный образец-хитозан 400, 401 от сжатия. Материал хитозана 400 и биопсийный образец 401 помещают вверх дном на поддерживающей пластине 402-2. Базовая пластина 402-1 содержит секцию захвата или ручки 405, которая может быть покрыта белой краской и которая может быть использована для написания заметок на ней или в качестве ручки держателя образца.

На фиг. 4 дополнительно показано, как биопсийный образец-хитозан 400, 401 с держателем образца монтируется на столик микроскопа 408, аналогично столику микроскопа типа микроскопа VivaScope™ 2500. Объектив 407 микроскопа визуализирует хитозан-биопсийный образец 400, 401 через базовую пластину 402-1. Пластины удерживают хитозан-биопсийный образец неподвижными во время визуализации с помощью объектива микроскопа и обеспечивают плоскую поверхность для оптического секционирования изображения.

На фиг. 5а показан схематический вид решетчатого ящика 501, который содержит четыре отделения, каждое из которых может принять одну плиту материала. Решетчатый ящик представляет собой коммерчески доступную кассету для обработки или размещения биопсийного образца.

На фиг. 5b показан решетчатый ящик 501, содержащий пористый материал на основе хитозана в форме плиты 500.

Если не указано иное, используются следующие устройства, материалы и химические препараты:

Используемый пористый материал на основе хитозана представляет собой CytoMatrix™, производимый компанией UCS Diagnostic Srl. CytoMatrix™ используется в качестве блока ячеек размером около 1,2 см x 1,2 см (длина x ширина) и высотой около 0,2 см. Для подготовки образца CytoMatrix™ помещают в кассету для обработки или размещения биопсийного образца, как показано на фиг. 5. Такие кассеты известны и могут быть приобретены под брендами Swingsette™, Slimsette™ или Unisetete™.

PBS-буфер: Фосфатно-солевой буферный раствор готовят следующим образом: добавляют 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,44 г Na₂HPO₄ и 0,24 г KH₂PO₄ к 800 мл дистиллированной воды. После смешивания pH доводят с помощью HCl до pH 7,4. Далее смесь разбавляют дистиллированной водой до конечного объема 1 литр.

Для окрашивания используют акридиновый оранжевый (CAS № 494-38-2).

Для исследования используют конфокальный микроскоп VivaScope™ 2500 от компании MAVIG GmbH.

А: Исследование физиологических жидкостей, таких как выпоты, моча, мокрота и другие клеточные суспензии

Биопсийный материал, состоящий из образца клеточной суспензии, центрифугируют при силе в диапазоне от 50 до 1500 RCF (относительные центробежные силы, также известные как «g») в течение 5-10 минут. Время и сила центрифугирования зависят от различных параметров, например, плотности клеточного типа и вязкости раствора, и их адаптируют к биопсийному образцу согласно известным методикам.

Полученный клеточный осадок собирают и супернатант отбрасывают. Клеточный осадок ресуспендируют и фиксируют в фиксирующем растворе в течение 30 секунд при соотношении 1:1 объема клеточного осадка к объему фиксирующего раствора. Фиксирующий раствор содержит абсолютный этанол и забуференный формалин в соотношении 1:1. Фиксация необходима для сохранения формы клеток интактной.

Суспензию центрифугируют в диапазоне от 50 до 1500 RCF в течение 10 минут. Клеточный осадок собирают и супернатант отбрасывают.

На CytoMatrix™ загружают от 50 мкл до 100 мкл материала из клеточного осадка, добавляют 2-3 капли (около 150 мкл) 70% этанола в буфере PBS на загруженный материал и смесь инкубируют в течение примерно 10 секунд. После этого в то же место добавляют 2-3 капли (около 150 мкл) акридинового оранжевого. Еще через 20 секунд, которые представляют время инкубации для окрашивания образца, указанный образец для микроскопического анализа промывают буфером PBS для удаления избытка красителя.

Образец монтируют на держатель препарата и исследуют с помощью микроскопа, который способен создавать изображения оптических срезов. Оценка изображений выполняется программным обеспечением или человеком.

В: Использование свежих биопсийных образцов - подготовка образцов

После загрузки свежих биопсийных образцов на CytoMatrix™ на загруженный материал добавляют 2-3 капли (около 150 мкл) 70% этанола в буфере PBS и смесь инкубируют в течение примерно 10 секунд. После этого в то же место добавляют 2-3 капли (около 150 мкл) акридинового оранжевого. Еще через 20 секунд, которые представляют время инкубации для окрашивания образца, указанный образец для микроскопического анализа промывают буфером PBS для удаления избытка красителя.

Загрузка полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии образца на CytoMatrix™ схематически показана на фиг. 1a, и на фиг. 1b показан вид сверху образца для микроскопической оценки после обработки спиртом и окрашивания.

Загрузка полученного тонкоигольной биопсии (FNB) образца схематически показана на фиг. 1с, и на фиг. 1с показан вид сверху для микроскопической оценки после обработки спиртом и окрашивания.

Образец монтируют на держатель препарата и исследуют с помощью микроскопа, который способен создавать изображения оптических срезов. Оценка изображений выполняется программным обеспечением или человеком.

C: Микроскопическое исследование с использованием конфокальной микроскопии

Образец монтируют на держатель препарата, как показано на фиг. 4, путем фиксации образца между двумя стеклянными предметными стеклами (402-1 и 402-2), которые содержат магнитные крепежные средства (403 и 404). Предметные стекла притягиваются друг к другу магнитной силой и, таким образом, удерживают образец (400 и 401) надежно фиксированным между предметными стеклами. Чтобы избежать повреждения образца, между магнитами помещается пластичный материал, в данном случае коммерчески доступный Play-Doh, производимый компанией Hasbro, чтобы увеличить пространство между предметными стеклами и ослабить давление на образец, которое возникает из-за магнитного притяжения.

Образец визуализируют с помощью микроскопа VivaScope™ 2500 в течение нескольких минут. Микроскоп создает оцифрованные изображения в виде оптических срезов для оценки программным обеспечением или человеком.

D: Сравнительные примеры

D.1: Два измерения проводят на одном и том же образце, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии, с добавлением спирта и без него

Образец 1 (сравнения) подготавливают путем загрузки биопсийного образца на CytoMatrix™ с последующим окрашиванием акридиновым оранжевым и промыванием буфером PBS в соответствии с протоколом, указанным в пункте B, но без добавления 70% этанола в буфер PBS.

Образец 2 подготавливают с использованием образца 1 после измерения путем добавления 70% этанола в буфер PBS с последующим окрашиванием акридиновым оранжевым и промыванием буфером в соответствии с протоколом, указанным в пункте B.

Промывание буфером PBS должно удалить избыток красителя из образца.

Оба образца анализируют с помощью конфокального микроскопа VivaScope™ 2500 от компании MAVIG GmbH, и результаты показаны на фиг. 2а (образец 1) и фиг. 2b (образец 2). Можно ясно видеть, что микроскопическая морфология более выражена в образце 2, который подготовлен согласно изобретению. Детали микроскопической морфологии необходимы для правильной оценки/диагностики.

D.2: Два измерения проводили на образце, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии, разделенном на две части, с добавлением спирта или без него

Образец 3 (сравнения) готовили путем загрузки одной части образца, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии, на CytoMatrix™ с последующим окрашиванием акридиновым оранжевым и промыванием буфером PBS в соответствии с протоколом, приведенным в пункте B, но без добавления 70% этанола в буфер PBS.

Образец 4 готовили с использованием другой части образца, полученного при тонкоигольной биопсии, использованного при подготовке образца 3, путем добавления 70% этанола в буфер PBS с последующим окрашиванием акридиновым оранжевым и промыванием буфером в соответствии с протоколом, указанным в пункте B.

Оба образца исследовали с помощью конфокального микроскопа VivaScope™ 2500 от компании MAVIG GmbH, и результаты показаны на фиг. 2c (образец 3) и фиг. 2d (образец 4). Можно ясно видеть, что микроскопическая морфология более выражена в образце 4, который подготовлен согласно изобретению.

Список ссылочных номеров:

100 = Материал на основе хитозана

101 = Образец, полученный при тонкоигольной биопсии (FNA)

102 = Шприц для тонкоигольной аспирационной биопсии

103 = Биопсийный образец, имеющий трубчатую структуру, полученный при тонкоигольной биопсии (FNB)

104 = Шприц для толстоигольной биопсии, предпочтительно для тонкоигольной биопсии

201 = Образец, полученный при тонкоигольной биопсии (FNA), загруженный на CytoMatrix™

300 = Материал на основе хитозана

301 = Биопсийный образец

302-1 = Базовая пластина, содержащая магнитные элементы 304 с противоположными полярностями

302-2 = Поддерживающая пластина, содержащая магнитные элементы 303

303 = Магнитные элементы

304 = Магнитные элементы с противоположными полярностями

305 = Секция захвата или ручки

400 = Материал на основе хитозана

401 = Биопсийный образец

402-1 = Базовая пластина

402-2 = Поддерживающая пластина

403 = Магнитные элементы

404 = Магнитные элементы с противоположными полярностями

405 = Секция захвата или ручки

406 = Разделитель

407 = Объектив микроскопа

408 = Держатель образца на столике микроскопа

500 = Пористый материал на основе хитозана в форме плиты

501 = Решетчатый ящик

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ подготовки образца для микроскопического исследования, включающий следующие стадии:

стадия (i): использование твердого или пластичного пористого материала на основе хитозана, имеющего взаимосвязанные поры размером от 5 мкм до 700 мкм и общую пористость (объемную долю) от 40% до 90%;

стадия (ii): добавление по меньшей мере одного биопсийного образца, содержащего ткань и/или эукариотические, и/или прокариотические клетки, и/или эукариотические клетки, содержащие вирусные частицы, к пористому материалу на основе хитозана; и

стадия (iii): добавление (C₁-C₆)-алкилового спирта или его смесей.

2. Способ по п. 1, в котором пористый материал на основе хитозана получают путем обеспечения раствора хитозана и/или лактозилированного хитозана или раствора винилового производного хитозана, при этом указанное виниловое производное используют отдельно или в смеси с сульфгидрильным производным хитозана, при этом все соединения имеют молекулярную массу от 50 кДа до 200 кДа и растворяются в кислотном растворе полярной неорганической или органической кислоты, с последующей гелификацией указанного раствора с получением гидрогеля и лиофилизацией полученного гидрогеля с получением пористого материала.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором (C₁-C₆)-алкиловый спирт или его смесь, используемые на стадии (iii), содержат по меньшей мере 5% воды или водного буфера.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий стадию (iv), а именно окрашивание биопсийного образца путем добавления по меньшей мере одного флуоресцентного красителя.

5. Способ по п. 4 с использованием красителей типа 2,3-бензохинолина, акридинового оранжевого, акрифлавина, профлавина и акридинового желтого, красителей типа тиазина, толуидинового синего и метиленового синего, цветов трихромных красителей Массона, метилового синего, анилинового синего, быстрого зеленого FCF, водного синего, гематоксилина, эозина, бромистого этидия, родамина 123, Syber Green, Acid Fusion, сириуса красного, Col-F, нильского синего, нильского красного, масляного красного O, аурамина O, нейтрального красного, патентованного синего, флуоресцеина, индоцианина зеленого (ICG), метилового зеленого, пиронина Y и их комбинаций, причем красители могут связываться напрямую или через линкеры, такие как антитела или лектины.

6. Способ по любому из пунктов 1-5, в котором пористый материал на основе

хитозана используют в форме плиты или блока, где по меньшей мере одна поверхность плиты или блока способна принимать биопсийный образец целиком, собранный посредством инцизионной биопсии, стереотактической биопсии, стеральной биопсии, биопсии ворсин хориона, конусной биопсии, эндоскопической биопсии, игольной биопсии (чрескожной биопсии), тонкоигольной аспирационной биопсии (FNA), тонкоигольной биопсии (FNB), биопсии хирургической маленькой иглой, микроигольной биопсии, толстоигольной биопсии или биопсии клеточной суспензии.

7. Способ по пункту 6, в котором длина и/или ширина или диаметр по меньшей мере одной поверхности, которая способна принять биопсийный образец, составляет 1,5 см или меньше.

8. Способ по п. 6 или п.7, дополнительно включающий стадию (v), а именно монтирование образца на держателе образца для использования в микроскопии.

9. Способ по п. 8, в котором образец зажат между первой пластиной 302-1, содержащей окно, через которое проходит оптический луч, и второй пластиной 302-2.

10. Способ по п. 9, в котором первая пластина 302-1 и вторая пластина 302-2 содержат магнитные элементы 303 и 304, так что образец надежно фиксирован между пластинами и без повреждения биопсийного образца.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, использующий для гистопатологического исследования свежие биопсийные образцы на стадии (ii).

12. Способ по п. 11, в котором образцы для гистопатологического исследования собирают с использованием по меньшей мере одного из следующих методов биопсии: инцизионная биопсия, бритвенная биопсия, щеточная биопсия, биопсия путем взятия мазка, стереотактическая биопсия, стеральная биопсия, биопсия ворсин хориона, коническая биопсия, эндоскопическая биопсия, биопсия с использованием адгезивного пластыря, игольная биопсия (чрескожная биопсия), тонкоигольная аспирационная биопсия (FNA), тонкоигольная биопсия (FNB), биопсия хирургической маленькой иглой, микроигольная биопсия и толстоигольная биопсия.

13. Образец, подготовленный в соответствии со способами, описанными в любом из предшествующих пунктов.

14. Применение образца, подготовленного с помощью способов в соответствии с любым из предшествующих пунктов 1-12, для мгновенного исследования с использованием изображений оптических срезов биопсийных образцов после сбора.

15. Применение образца, подготовленного с помощью способа по любому из пп. 1-12, для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, многофотонной флуоресцентной микроскопии, двухфотонной флуоресценции, трехфотонной

флуоресценции, оптической когерентной томографии и оптической когерентной томографии полного поля, микроскопии с УФ-поверхностным возбуждением, подповерхностной визуализации высокого и сверхвысокого разрешения, вынужденного рамановского рассеяния, вынужденной рамановской гистологии, микроскопии с генерацией множественных гармоник, генерации второй гармоники (SHG) или генерации третьей гармоники (THG).

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ. 34 РСТ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Способ подготовки образца для микроскопического исследования, включающий следующие стадии:

стадия (i): использование твердого или пластичного пористого материала на основе хитозана, имеющего взаимосвязанные поры размером от 5 мкм до 700 мкм и общую пористость (объемную долю) от 40% до 90%;

стадия (ii): добавление по меньшей мере одного биопсийного образца, содержащего ткань и/или эукариотические, и/или прокариотические клетки, и/или эукариотические клетки, содержащие вирусные частицы, к пористому материалу на основе хитозана; и

стадия (iii): добавление этанола при концентрации от 65% об./об. до 75% об./об. в воде или водном буфере.

2. Способ по п. 1, в котором пористый материал на основе хитозана получают путем обеспечения раствора хитозана и/или лактозилированного хитозана или раствора винилового производного хитозана, при этом указанное виниловое производное используют отдельно или в смеси с сульфгидрильным производным хитозана, при этом все соединения имеют молекулярную массу от 50 кДа до 200 кДа и растворяются в кислотном растворе полярной неорганической или органической кислоты, с последующей гелификацией указанного раствора с получением гидрогеля и лиофилизацией полученного гидрогеля с получением пористого материала.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором этанол используют при концентрации 70% об./об. в воде или водном буфере.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий стадию (iv), а именно окрашивание биопсийного образца путем добавления по меньшей мере одного флуоресцентного красителя.

5. Способ по п. 4 с использованием красителей типа 2,3-бензохинолина, акридинового оранжевого, акрифлавина, профлавина и акридинового желтого, красителей типа тиазина, толуидинового синего и метиленового синего, цветов трихромных красителей Массона, метилового синего, анилинового синего, быстрого зеленого FCF, водного синего, гематоксилина, эозина, бромистого этидия, родамина 123, Syber Green, Acid Fusion, сириуса красного, Col-F, нильского синего, нильского красного, масляного красного O, аурамина O, нейтрального красного, патентованного синего, флуоресцеина, индоцианина зеленого (ICG), метилового зеленого, пиронина Y и их комбинаций, причем красители могут связываться напрямую или через линкеры, такие как антитела или

лектины.

6. Способ по любому из пунктов 1-5, в котором пористый материал на основе хитозана используют в форме плиты или блока, где по меньшей мере одна поверхность плиты или блока способна принимать биопсийный образец целиком, собранный посредством инцизионной биопсии, стереотактической биопсии, стеральной биопсии, биопсии ворсин хориона, конусной биопсии, эндоскопической биопсии, игольной биопсии (чрескожной биопсии), тонкоигольной аспирационной биопсии (FNA), тонкоигольной биопсии (FNB), биопсии хирургической маленькой иглой, микроигольной биопсии, толстоигольной биопсии или биопсии клеточной суспензии.

7. Способ по пункту 6, в котором длина и/или ширина или диаметр по меньшей мере одной поверхности, которая способна принять биопсийный образец, составляет 1,5 см или меньше.

8. Способ по п. 6 или п.7, дополнительно включающий стадию (v), а именно монтирование образца на держателе препарата для использования в микроскопии.

9. Способ по п. 8, в котором образец зажат между первой пластиной 302-1, 402-1, содержащей окно, через которое проходит оптический луч, и второй пластиной 302-2, 402-2.

10. Способ по п. 9, в котором первая пластина 402-1 и вторая пластина 402-2 содержат магнитные элементы 403 и 404, и разделители 406, монтированные между магнитными затворами верхней и нижней пластины держателя препарата, так что образец надежно фиксирован между пластинами и без повреждения биопсийного образца.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, использующий для гистопатологического исследования свежие биопсийные образцы на стадии (ii).

12. Способ по п. 11, в котором образцы для гистопатологического исследования собирают с использованием по меньшей мере одного из следующих методов биопсии: инцизионная биопсия, бритвенная биопсия, щеточная биопсия, биопсия путем взятия мазка, стереотактическая биопсия, стеральная биопсия, биопсия ворсин хориона, коническая биопсия, эндоскопическая биопсия, биопсия с использованием адгезивного пластыря, игольная биопсия (чрескожная биопсия), тонкоигольная аспирационная биопсия (FNA), тонкоигольная биопсия (FNB), биопсия хирургической маленькой иглой, микроигольная биопсия и толстоигольная биопсия.

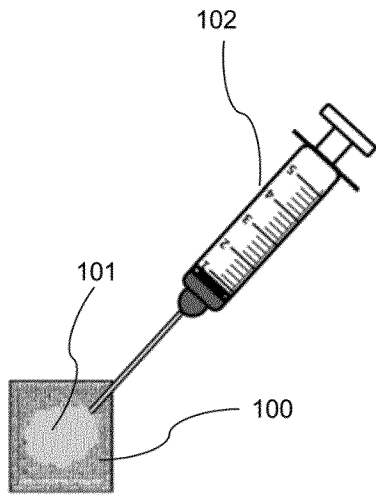
13. Образец, подготовленный в соответствии со способами, описанными в любом из предшествующих пунктов.

14. Применение образца, подготовленного с помощью способов в соответствии с любым из предшествующих пунктов 1 - 12, для мгновенного исследования с

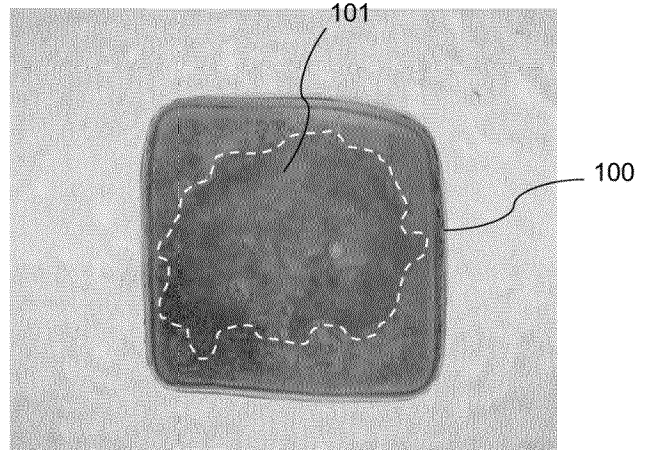
использованием изображений оптических срезов биопсийных образцов после сбора.

15. Применение образца, подготовленного с помощью способа по любому из пп. 1-12, для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, многофотонной флуоресцентной микроскопии, двухфотонной флуоресценции, трехфотонной флуоресценции, оптической когерентной томографии и оптической когерентной томографии полного поля, микроскопии с УФ-поверхностным возбуждением, подповерхностной визуализации высокого и сверхвысокого разрешения, вынужденного рамановского рассеяния, вынужденной рамановской гистологии, микроскопии с генерацией множественных гармоник, генерации второй гармоники (SHG) или генерации третьей гармоники (THG).

ФИГ. 1a

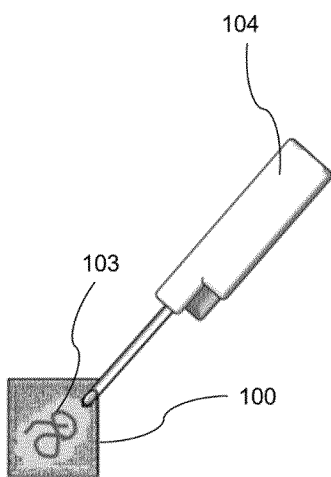


ФИГ. 1b

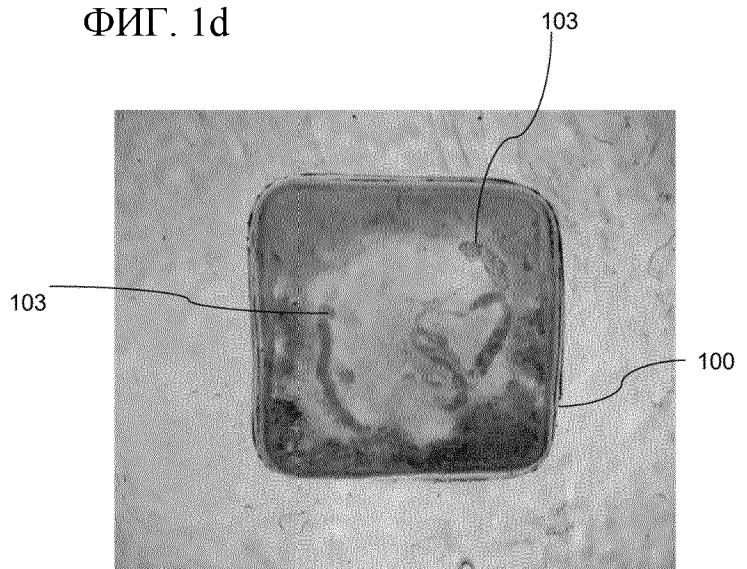


5

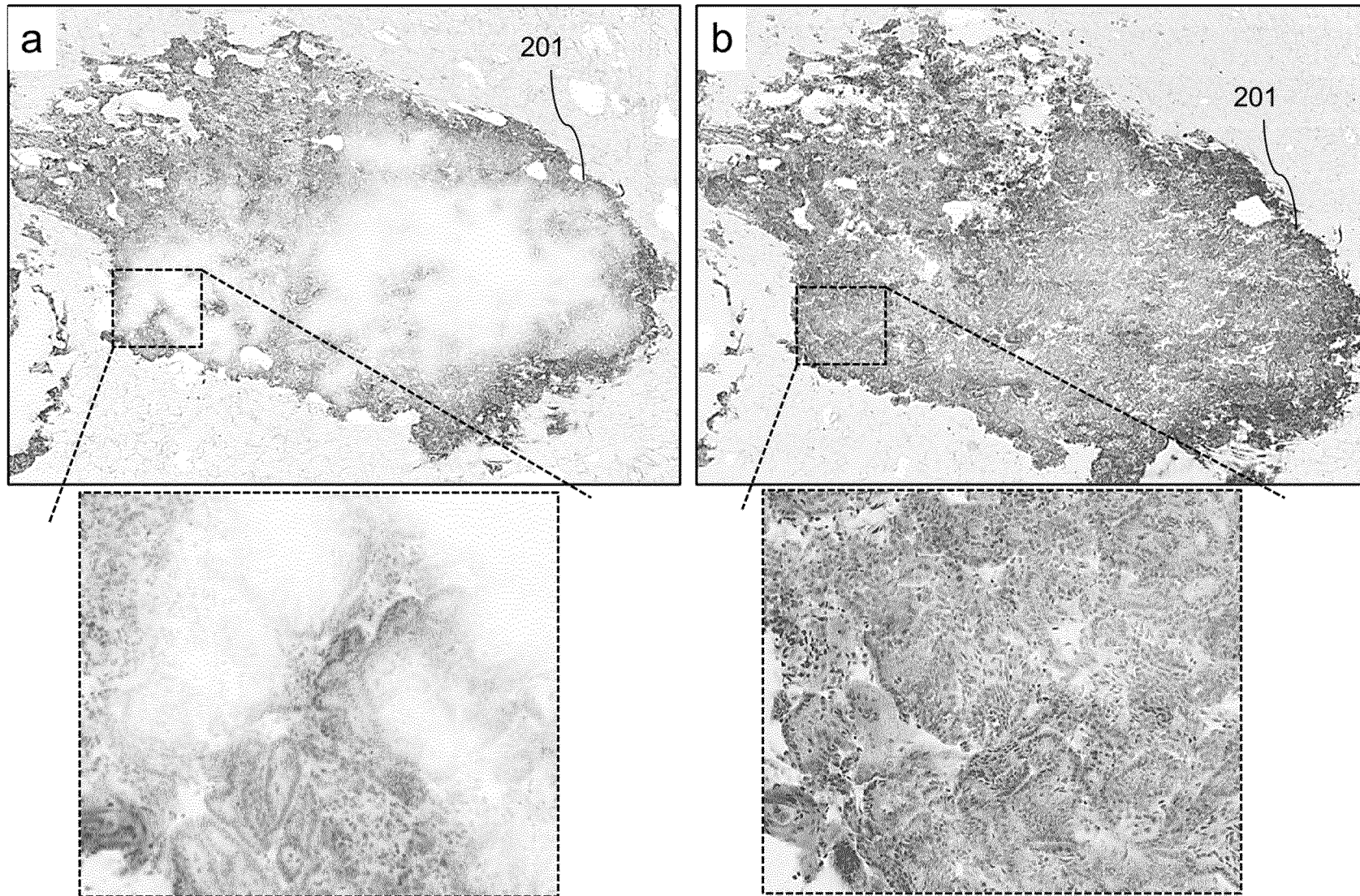
ФИГ. 1c



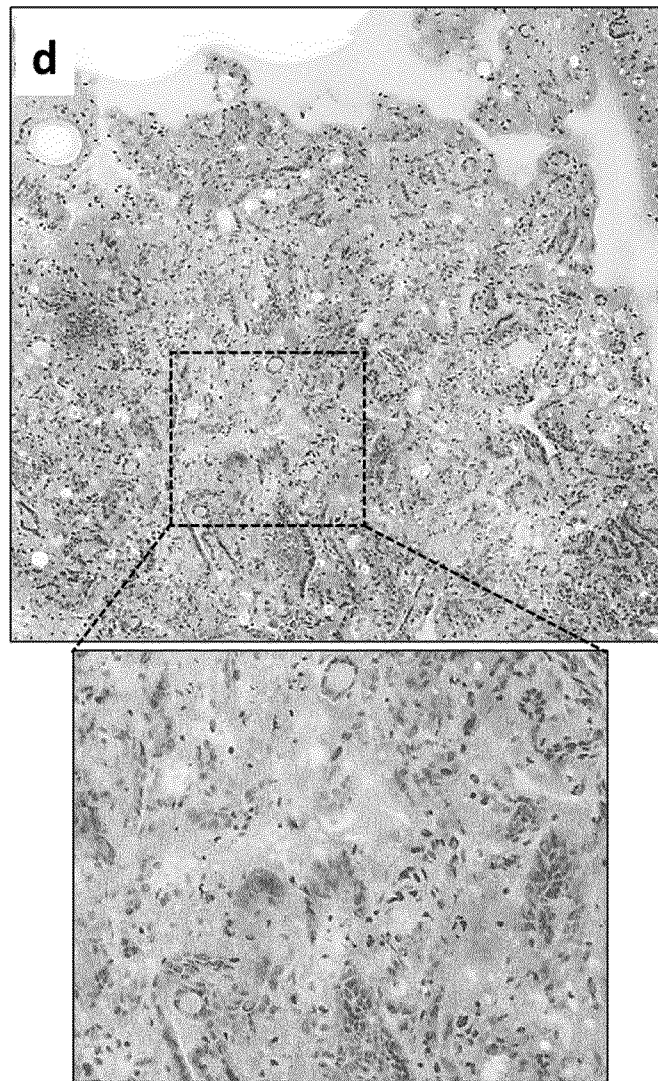
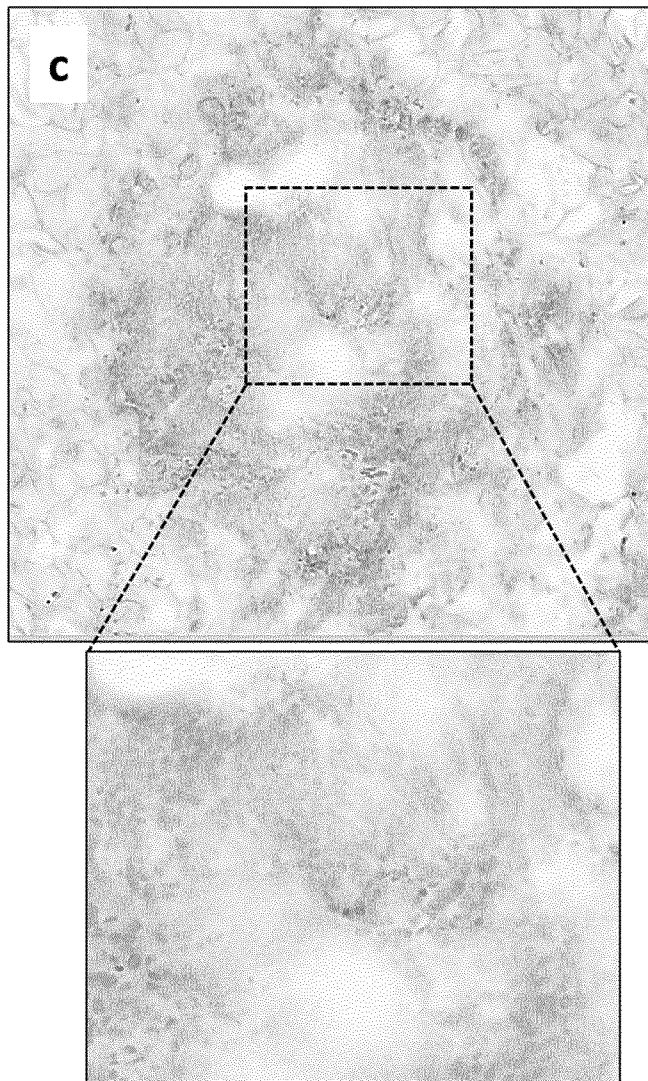
ФИГ. 1d



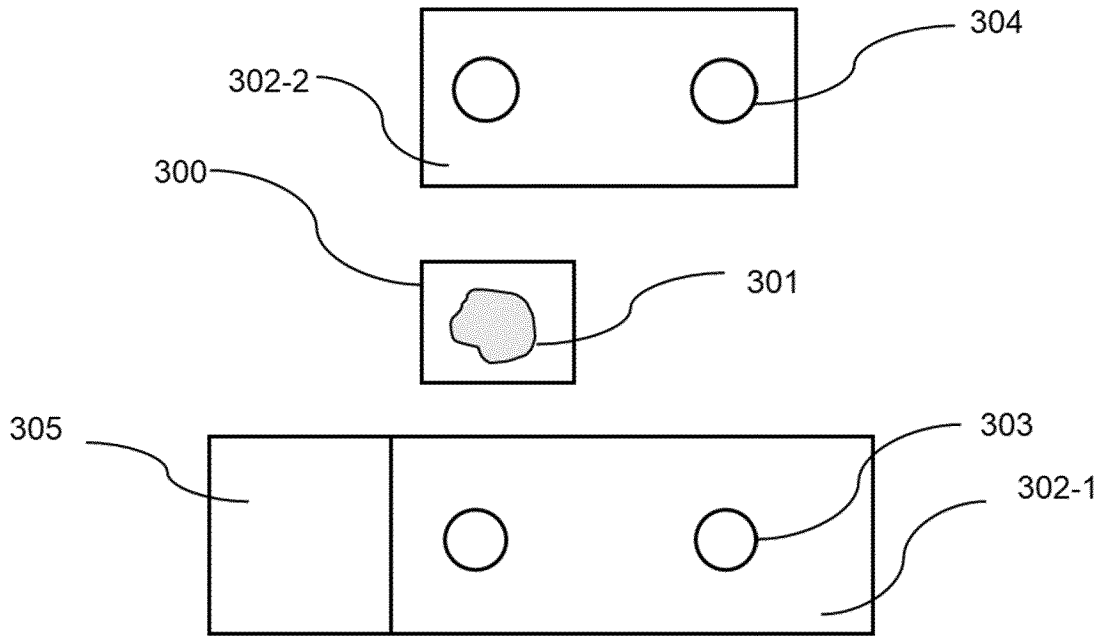
ФИГ. 2



ФИГ. 2



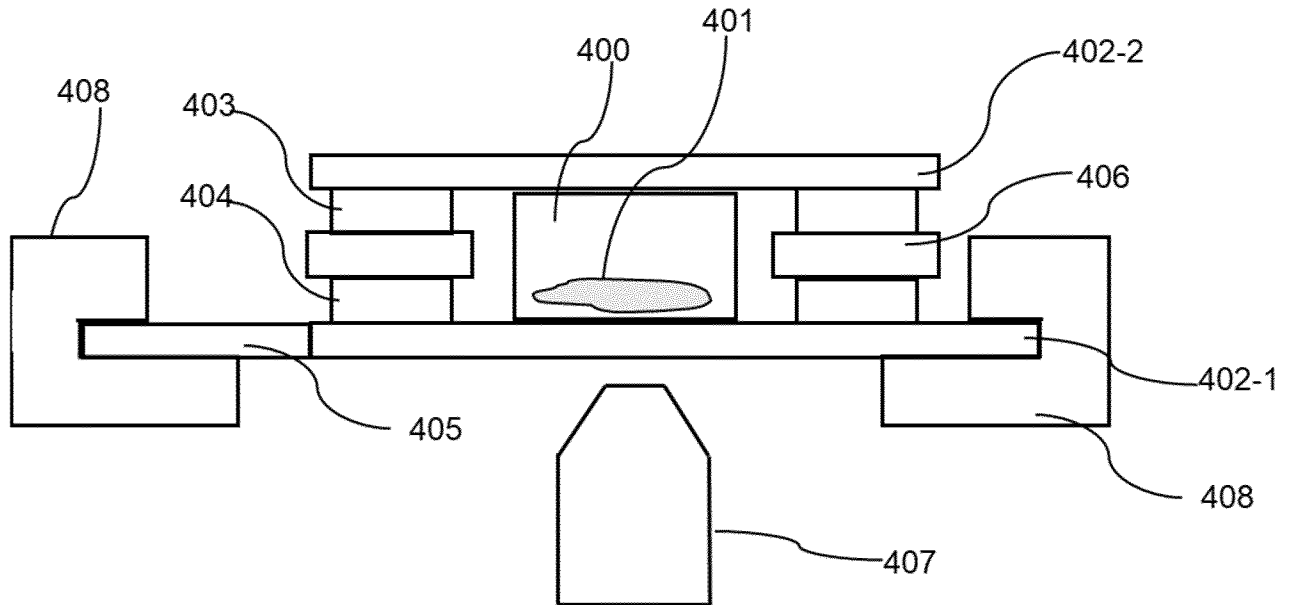
ФИГ. 3



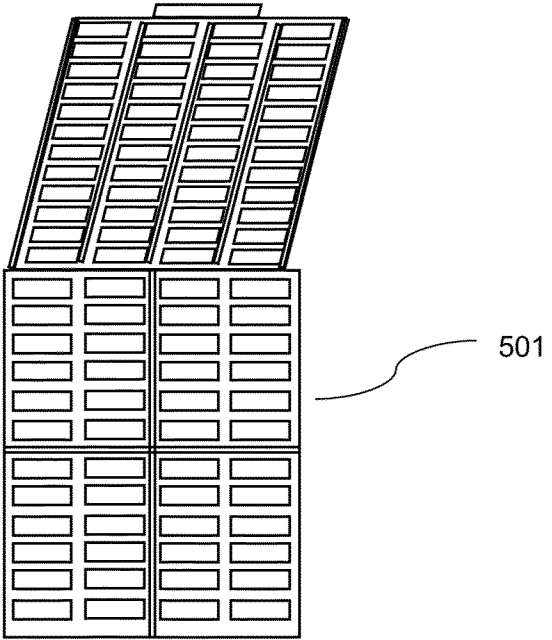
5

ФИГ. 4

10



ФИГ. 5a



ФИГ. 5b

