



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0139605  
(43) 공개일자 2016년12월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12M 1/34 (2006.01) C12N 5/078 (2010.01)  
G01N 33/487 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12M 1/3492 (2013.01)  
B01L 3/5027 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0074789  
(22) 출원일자 2015년05월28일  
심사청구일자 2015년05월28일

- (71) 출원인  
조선대학교산학협력단  
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)  
포항공과대학교 산학협력단  
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
- (72) 발명자  
강양준  
광주광역시 서구 풍암순환로 70 현대아파트, 104  
동 701호 (풍암동, 현대아파트)
- 이상준  
경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 9-1303 (지곡  
동, 교수아파트)
- 하영란  
경상북도 포항시 남구 청암로 77 포항공과대학교  
기계실협동 107호 (지곡동)
- (74) 대리인  
특허법인충정

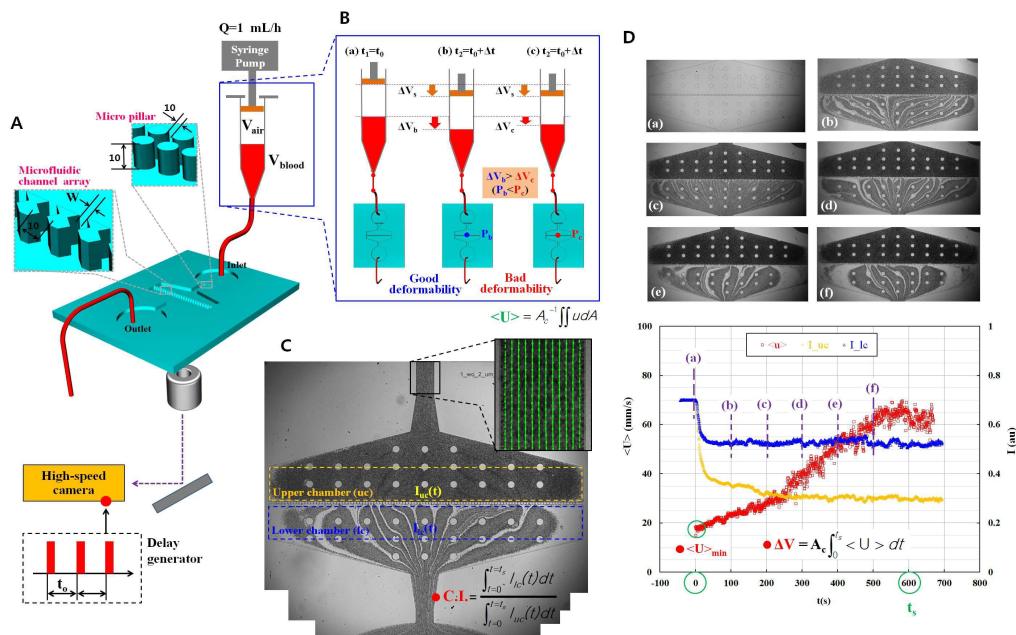
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법

### (57) 요약

본 발명은 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법에 관한 것으로서, 공기와 혈액 샘플이 채워진 시린지; 상기 시린지에 의해 혈액 샘플이 일정하게 주입되는 미세유체 소자 및 주입되는 혈액 샘플을 확대하고 촬영하는 이미지 획득설비를 포함하여, 상기 혈액 샘플을 확대하여 촬영한 이미지를 통해 혈액 샘플 내의 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



적혈구 변형성에 따른 미세유체 소자 내의 압력상승으로 인한 혈류속의 변화와, 상기 미세유체 소자 전후의 달라지는 적혈구 분포에 따른 이미지 강도의 변화를 측정하여 상기 적혈구의 변형성을 정량적으로 평가하여 측정하여, 높은 처리량을 제공하고, 충분한 민감도로 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)에서 보다 작은 차이점을 탐지할 수 있으며, 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로깅(clogging) 때문에, 혈류속 필드와 이미지 강도를 포함하는 혈류역학적인 성질의 시간에 따른 변화에 대한 정량적인 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 높은 적혈구 용적률(hematocrit) 수준(~50%)으로 혈액 샘플(~0.3 mL)의 변형성 시험은 짧은 시간(~10 분) 내에 완성될 수 있다.

(52) CPC특허분류

**C12N 5/0641** (2013.01)

**G01N 33/487** (2013.01)

**G02B 21/36** (2013.01)

**G06T 7/0012** (2013.01)

**G06T 2207/30072** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015002198

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리더연구지원사업(창의연구)

연구과제명 생체유동현상 규명 및 생체모방 연구

기 여 율 1/1

주관기관 포항공과대학교 산학협력단

연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.29

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

공기와 혈액 샘플이 채워진 시린지;

상기 시린지에 의해 혈액 샘플이 일정하게 주입되는 미세유체 소자 및

주입되는 혈액 샘플을 확대하고 촬영하는 이미지 획득설비를 포함하여,

상기 혈액 샘플을 확대하여 촬영한 이미지를 통해 혈액 샘플 내의 적혈구 변형성에 따른 미세유체 소자 내의 압력상승으로 인한 혈류속의 변화와, 상기 미세유체 소자 전후의 달라지는 적혈구 분포에 따른 이미지 강도의 변화를 측정하여 상기 적혈구의 변형성을 정량적으로 평가하여 측정하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시린지를 장착한 시린지 펌프에 의해 혈액 샘플이 주입되는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미세유체 소자는 전후로 혈액 샘플이 통과하는 입구부와 출구부가 연결된 복수 개의 미세유체 채널 배열을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 미세유체 소자는 입구부와 출구부 및 미세유체 채널 배열이 형성된 다양한 폴리머 중의 하나와 슬라이드 유리를 결합하여 구성한 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 5

제3항에 있어서,

상기 미세유체 채널 배열은 대칭의 지그재그 형상으로 된 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 미세유체 채널 사이의 최대 폭과 깊이는 10 $\mu$ m인 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 7

제3항에 있어서,

상기 입구부와 미세유체 채널 배열 사이의 연결 도상에 설치한 미세 지주(micro pillar)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 미세 지주 사이의 간격 및 깊이는  $10\mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정 기구.

#### 청구항 9

제3항에 있어서,

상기 시린지와 미세유체 소자의 입구부, 출구부 사이를 연결한 폴리에틸렌 튜브를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 이미지 획득설비는 현미경과 고속 카메라를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 혈액 샘플은 적혈구 용적률을 40% 혹은 50%로 고정하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 적혈구의 불균일한 분포를 정량화하기 위해 미세유체 소자의 주변에 같은 창 크기로 배치된 상부 챔버(uc) 및 하부 챔버(lc)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항의 측정기구를 이용하여 적혈구의 변형성을 측정하는 측정방법에 있어서,

공기가 채워진 시린지의 혈액 샘플을 일정유량으로 미세유체 소자에 10분 동안 주입하는 단계;

상기 미세유체 소자에 혈액 샘플이 주입되는 동안 현미경으로 확대된 혈액 샘플을 고속 카메라로 촬영하는 단계;

상기 고속 카메라로 촬영된 혈액 샘플의 이미지를 통해 적혈구의 변형성에 따라 클로깅(clogging)에 의해 상기 미세유체 소자 내의 압력이 상승하고, 이 압력상승으로 인한 혈류속(U)의 변화와 상기 미세유체 소자 전후의 혈액 적혈구 분포 차이에 의한 이미지 강도(I)의 변화를 이용하여, 상기 적혈구의 변형성을 측정하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 적혈구의 변형성은 상기 혈류속(U) 및 이미지 강도(I)를 이용한 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ ), 미세유체소자에 주입된 혈액부피( $\Delta V$ ) 및 클로깅 지표(C.I.)를 매개변수로 하여 정량적으로 평가되고 측정되는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법.

#### 청구항 15

제13항에 있어서,

상기 시린지는 시린지 펌프에 장착되어 혈액 샘플이 주입되며, 주입 전에 상기 시린지를 수직으로 세워 밀도 차이에 의해 혈액 샘플과 공기를 시린지 내에서 하부와 상부 층으로 분리되도록 하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법.

## 청구항 16

제13항에 있어서,

상기 혈액 샘플은 시린지 펌프를 이용하여 일정유량(Q)으로 주입하는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법.

## 청구항 17

제13항에 있어서,

상기 혈유속 필드는 고속 카메라에 의해 캡처된 2개의 연속적인 이미지를 이용하는 전도 시간-분해 미세 PIV 기술(conducting time-resolved micro-PIV technique)에 의해 얻어지도록 한 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법.

## 청구항 18

제13항에 있어서,

연속적인 현미경 이미지는 일정시간의 간격으로 디지털 지연-펄스 발생기(digital delay-pulse generator)에 의해 주기적으로 작동되는 고속 카메라를 이용하여 캡처되는 것을 특징으로 하는 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법에 관한 것으로서, 상세히는 공기와 혈액 샘플이 채워진 시린지의 상기 혈액 샘플을 미세유체 소자에 주입하여, 상기 혈액 샘플의 적혈구 변형성에 따른 상기 시린지 내의 공기 공동과 미세유체 소자 내의 압력 차이로 인해 혈유속이 변화하고, 이를 통해 적혈구의 변형성을 정량적으로 평가하여 측정하도록 한 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 체순환(體循環)에서 전체 압력 강하의 약 80%는 세동맥 및 모세관 네트워크를 포함하는 미세순환 내에서 일어나는데, 이곳은 산소, 영양분 및 노폐물이 교환되는 곳이다. 미세순환에서 혈류는 혈관의 기하학적인 형상과 점성, 점성탄력성, 적혈구 용적률, 변형성, 응집성을 포함하는 생체물리화학적 성질 및 적혈구 침강속도(ESR)에 강하게 의존한다. 혈액의 유동학 및 유변학적 특성치는 고혈압, 겸상 적혈구성 빈혈, 당뇨병을 포함하는 혈액 질환 및 장애와 관련이 있다. 혈액 성분 중 적혈구(RBC)는 낮은 세포질의 점성, 높은 표면적과 부피 비율 및 충분히 유연한 막을 포함하는 몇 가지 요소에 의해 크게 변형될 수 있다. 높은 변형성 때문에, RBC는 크기가 RBC의 직경보다 더 작은 모세관 네트워크를 통해 통과하는 능력을 갖는다. 그러나, 혈액 질환은 RBC 변형성을 현저하게 감소시키는 원인이 된다. 낮은 변형성은 모세 혈관에서 혈류를 방해하거나 막게 되는데, 이는 최후에 장기 기능 저하를 이끈다. 한편으로, 말라리아 기생충은 숙주 RBC에서 구조와 역학적인 수정의 원인이 된다. 이들 변화는 낮은 변형성을 이끌고 내피 세포에 밀착하는 것을 증가시키는데, 이는 생명유지에 절대 필요한 기관의 모세관 막힘에 기여한다. 혈액의 생체물리화학적 성질들 사이에서, RBC 변형성은 병리학상의 조건에서 변형을 모니터링하기 위한 유망한 바이오마커로서 고려된다. 여기서, 효율적인 변형성 측정을 위해 제기된 주요한 이슈는 RBCs의 특정 생물형군(subpopulation)이 병리학적인 증상에 충분히 기여할 것이라는 데에 있다. 그러므로, 특정 생물형군(subpopulation)의 높은 처리량과 정량적인 일치성은 RBCs를 포함하는 혈액 샘플의 변형성의 효율적인 탐지를 위해 요구된다.

[0003] 이들 요구를 충족시키기 위해, 몇 가지 실험적인 기술이 RBCs의 변형성을 측정하기 위해 추진되고 있다. 편의상, 존재하는 기술은 두 가지 범주로 나눌 수 있다: 대량-세포 접근 및 단일-세포 접근. 전형적인 막 여과를 포함하는 대량-세포 접근과 slit-flow ektacytometry는 높은 처리량과 함께 RBCs의 변형성을 탐지할 수 있다. 그러나, RBCs의 특정 생물형군(subpopulation)에서 차이를 분류하는 것에 제한이 있다. 따라서, 미세유체 기반 여과는 미세유체 여과 채널에 가두어진 클로깅(clogging)의 채널 수를 세거나 RBCs의 부피를 계산하는 것 중의 하나에 의해 더 작은 특정 생물형군(subpopulation)을 분류하는 것이 제안되고 있다. 반면에, 단일의 RBC

의 변형성을 측정하는 단일-세포 접근은 세포 장애물, 막 불안정, 세포 스트레칭, 전기 임피던스, 전기 변형, 단일 세포 속도, 천이 시간, 이동속도, 막 장력 및 측면 이동을 모니터링 하는 것에 의해 제안된다. 이 단일-세포 접근은 개별적인 RBC의 변형성에 차이를 모니터링 하기 위한 효율적인 도구로 충분히 고려될 것이다. 그러나, 낮은 측정 처리량과 정밀한 작동 프로토콜 때문에, 이 접근은 여전히 임상 치료의 적용에 제한을 갖는다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 특2003-0032809호  
(특허문헌 0002) 한국 등록특허공보 제10-0676694호  
(특허문헌 0003) 미국 등록특허공보 08,100,672

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 상기한 바와 같은 제반 문제점을 개선하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명에서, 효율적인 변형성 측정은 나란한 미세유체 채널 배열에 흐르고 있는 RBCs의 혈류 역학의 변화를 평가하는 것에 의해 변형성을 정량화하는 것으로 제안된다. 1회용 시린지를 포함하는 독특한 유체 플랫폼은 공기와 혈액이 동등하게 채워졌고 미세유체 채널 배열과 함께 미세유체 소자는 RBCs의 높은 처리량과 특정 생물형군(subpopulation) 탐지를 제공하는 것으로 제안된다. 시린지 펌프를 이용하여 혈류량(Flow rate)을 일정한 값으로 놓을 때, 혈류 속도는 시린지에서의 공기 압력과 미세유체 소자에서의 혈압 사이에 압력 차이에 의존하여 변화된다. 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 클로깅(clogging)이 점점 증가할 때, RBCs의 개체군은 미세유체 채널 배열의 전면에 밀집하여 분포된다. 그러나, RBCs의 개체군은 미세유체 채널 후면에 드물게 분포된다. 미세유체 채널에서 RBCs의 클로깅(clogging)은 혈류역학적인 저항을 증가하는 것을 야기한다. 시린지 내에 공기의 컴플라이언스 효과는 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로깅(clogging)에 의해 변화된 혈류역학적인 저항에 의존하는 혈류의 속도를 제어할 수 있다. RBCs의 변형성은 시간과 관련된 특정 관심 영역(ROI) 내에 혈류속 필드와 미세유체 채널 배열 전면 및 후면의 이미지 강도를 모니터링 하는 것에 의해 평가된다. RBCs의 변형성은 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ ), 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ ) 및 클로깅(clogging) 지표(C.I.)를 포함하는 3개의 대표적인 매개변수를 이용하여 정량적으로 평가된다.

### 과제의 해결 수단

- [0006] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명의 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구는, 공기와 혈액 샘플이 채워진 시린지; 상기 시린지에 의해 혈액 샘플이 일정하게 주입되는 미세유체 소자 및 주입되는 혈액 샘플을 확대하고 촬영하는 이미지 획득설비를 포함하여, 상기 혈액 샘플을 확대하여 촬영한 이미지를 통해 혈액 샘플 내의 적혈구 변형성에 따른 미세유체 소자 내의 압력상승으로 인한 혈류속의 변화와, 상기 미세유체 소자 전후의 달라지는 적혈구 분포에 따른 이미지 강도의 변화를 측정하여 상기 적혈구의 변형성을 정량적으로 평가하여 측정하는 것을 특징으로 하고 있다.
- [0007] 또 상기 시린지를 장착한 시린지 펌프에 의해 혈액 샘플이 주입되는 것이 바람직하다.
- [0008] 또 상기 미세유체 소자는 전후로 혈액 샘플이 통과하는 입구부와 출구부가 연결된 복수 개의 미세유체 채널 배열을 포함하며, 입구부와 출구부 및 미세유체 채널 배열이 형성된 다양한 폴리머 중 하나와 슬라이드 유리를 결합하여 구성하는 것이 바람직하다.
- [0009] 또 상기 미세유체 채널 배열은 대칭의 지그재그 형상으로 되는 것이 바람직하다.
- [0010] 또 상기 미세유체 채널 사이의 최대 폭과 깊이는  $10\mu\text{m}$ 인 것이 바람직하다.
- [0011] 또 상기 입구부와 미세유체 채널 배열 사이의 연결 도상에 설치한 미세 지주(micro pillar)를 더 포함하며, 상

기 미세 지주 사이의 간격 및 깊이는  $10\mu\text{m}$ 인 것이 바람직하다.

- [0012] 또 상기 시린지와 미세유체 소자의 입구부, 출구부 사이를 연결한 폴리에틸렌 튜브를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0013] 상기 이미지 획득설비는 현미경과 고속 카메라를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0014] 또 상기 적혈구 용적률(hematocrit)은 40% 혹은 50%로 고정하는 것이 바람직하다.
- [0015] 또 상기 적혈구의 불균일한 분포를 정량화하기 위해 미세유체 소자의 주변에 같은 창 크기로 배치된 상부 챔버(uc) 및 하부 챔버(lc)를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0016] 또 본 발명의 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정방법은, 상기한 측정기구를 이용하여 적혈구의 변형성을 측정하는 측정방법에 있어서, 공기가 채워진 시린지의 혈액 샘플을 미세유체 소자에 10분 동안 주입하는 단계; 상기 미세유체 소자에 혈액 샘플이 주입되는 동안 현미경으로 확대된 혈액 샘플을 고속 카메라로 촬영하는 단계; 상기 고속 카메라로 촬영된 혈액 샘플의 이미지를 통해 적혈구의 변형성에 따라 클로깅(clogging)에 의해 상기 미세유체 소자 내의 압력이 상승하고, 이 압력상승으로 인한 혈류속(U)의 변화와 상기 미세유체 소자 전후의 적혈구 분포 차이에 의한 이미지 강도(I)의 변화를 이용하여, 상기 적혈구의 변형성을 측정하는 것을 특징으로 하고 있다.
- [0017] 또 상기 적혈구의 변형성은 상기 혈류속(U) 및 이미지 강도(I)를 이용한 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ ), 미세유체소자에 주입된 혈액부피( $\Delta V$ ) 및 클로깅 지표(C.I.)를 매개변수로 하여 정량적으로 평가되고 측정되는 것이 바람직하다.
- [0018] 또 상기 시린지는 시린지 펌프에 장착되어 혈액 샘플이 주입되며, 주입 전에 상기 시린지를 수직으로 세워 밀도 차이에 의해 혈액 샘플과 공기를 시린지 내에서 하부와 상부 층으로 분리되도록 하는 것이 바람직하다.
- [0019] 또 상기 혈액 샘플은 시린지 펌프를 이용하여 일정유량(Q)으로 주입하는 것이 바람직하다.
- [0020] 또 상기 혈류속 필드는 고속 카메라에 의해 캡처된 2개의 연속적인 이미지를 이용하는 전도 시간-분해 미세 PIV 기술(conducting time-resolved micro-PIV technique)에 의해 얻어지도록 하는 것이 바람직하다.
- [0021] 또 연속적인 현미경 이미지는 일정시간의 간격으로 디지털 지연-펄스 발생기(digital delay-pulse generator)에 의해 주기적으로 작동되는 고속 카메라를 이용하여 캡처되는 것이 바람직하다.

### 발명의 효과

- [0022] 본 발명의 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법에 의하면, 종래 변형성 측정방법과 비교하여, 본 발명의 방법은 뚜렷한 이점을 갖는다. 첫 번째, 본 발명의 방법은 대량-세포 접근과 함께 혈액 세포의 변형성을 평가할 수 있는데, 이는 높은 처리량을 제공하는 능력을 갖는다.
- [0023] 두 번째, 본 발명의 방법은 충분한 민감도로 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)에서 보다 작은 차이점을 탐지할 수 있다.
- [0024] 세 번째, 본 발명의 방법은 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로깅(clogging) 때문에, 혈류속 필드와 이미지 강도를 포함하는 혈류역학적인 성질의 시간에 따른 변화에 대한 정량적인 정보를 제공할 수 있다.
- [0025] 따라서, 높은 적혈구 용적률(hematocrit) 수준( $\sim 50\%$ )으로 혈액 샘플( $\sim 0.3\text{ mL}$ )의 변형성 시험은 짧은 시간( $\sim 10\text{ 분}$ ) 내에 완성될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1의 (A), (B), (C)는 미세유체 소자에서 평균 혈류속의 시간에 따른 변화와 이미지 강도를 이용하여 RBCs의 변형성을 측정하기 위한 본 발명의 측정기구 및 측정방법을 보여주는 개략도
- 도 2의 (D)는 본 발명의 측정방법에 따라 서로 다른 시간에서 고속 카메라에 의해 캡처된 혈액 샘플의 다양한 이미지를 보여주는 개략도
- 도 3은 본 발명의 측정방법에서 1회용 시린지에서의 공기 공동( $V_{\text{air}}$ )과 미세채널 배열의 최소 갭(W)을 포함하는 매개변수의 실험적인 평가로써, (A)는 평균 혈류속( $\langle U \rangle$ )과 상부 챔버 및 하부 챔버에 대한 이미지 강도( $I_{\text{uc}}$ ,

$I_{1c}$ )로 시린지에서 공기 공동의 효과를 보여주는 그래프

도 4는 본 발명의 측정방법에서 1회용 시린지에서의 공기 공동( $V_{air}$ )과 미세채널 배열의 최소 갭( $W$ )을 포함하는 매개변수의 실험적인 평가로써, (B)는 시린지에서 공기 공동(空洞)( $V_{air}=0.3\text{ml}$ ) 하에, 본 발명의 방법의 수행으로 미세채널 배열( $W=2, 4\mu\text{m}$ )의 최소 갭의 효과를 보여주는 그래프

도 5는 균일한 혈액 세포와 불균일한 혈액 세포를 이용한 본 발명의 방법의 정략적인 수행 평가로서, (A)는 본 발명의 방법의 수행에서 적혈구 용적률의 효과를 보여주는 그래프

도 6은 균일한 혈액 세포와 불균일한 혈액 세포를 이용한 본 발명의 방법의 정략적인 수행 평가로서, (B)는 서로 다른 GA 용액을 첨가하여 서로 다른 변형성으로 균일한 혈액 샘플에 대한 변형성의 정략적인 평가를 보여주는 그래프

도 7은 균일한 혈액 세포와 불균일한 혈액 세포를 이용한 본 발명의 방법의 정략적인 수행 평가로서, (C)는 0.15% GA 용액에 의해 고정된 정상 RBCs와 강화된 RBCs의 서로 다른 혼합 비율( $\psi$ )로 불균일한 혈액 샘플에 대한 변형성의 정략적인 평가를 보여주는 그래프

도 8은 말라리아-감염 혈액 샘플을 탐지하기 위한 본 발명의 방법의 임상적인 입증으로서, (A)는 *P. berghei*에 의해 감염된 쥐 혈액 샘플의 탐지를 보여주는 그래프

도 9는 말라리아-감염 혈액 샘플을 탐지하기 위한 본 발명의 방법의 임상적인 입증으로서, (B)는 *P. falciparum*에 의해 감염된 인간 혈액 샘플의 탐지를 보여주는 그래프

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명에 따른 본 발명의 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법의 바람직한 실시예를 첨부한 도면을 참조로 하여 상세히 설명한다. 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위하여 제공되는 것이다.

[0028] 본 발명의 방법의 수행은 1회용 시린지의 공기 공동(空洞) 및 미세유체 채널 배열의 최소 채널 갭을 포함하는 몇 가지 매개변수를 정량적으로 평가하는 것에 의해 최적화된다. 부가적으로, 40%에서 50%에 이르는 높은 적혈구 용적률 수준으로 혈액 샘플은 높은 적혈구 용적률 수준의 효과를 평가하는 것에 사용된다. 그 후, 화학용액에 의해 고정된 균일한 RBCs는 본 발명의 방법의 수행을 시험하는 것에 적용된다. 부가적으로, 정상 혈액 세포와 강화된 혈액 세포의 다양한 혼합 비율과 함께 혈액 샘플은 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)에서 변형성의 분류를 평가하는 것에 사용된다. 마지막으로, 임상적인 적용으로서 본 발명의 방법은 각각 *P. berghei*-감염 RBCs와 *P. falciparum*-감염 혈액의 변형성을 정량화하는 것에 성공적으로 사용된다.

[0029] 실험 부분

[0030] 혈류역학적인 변화를 이용한 RBCs의 변형성 측정

[0031] 간단하나 효율적인 변형성 측정방법은 미세유체 채널에서 RBCs의 연속적인 클로깅(clogging) 때문에, 평균 혈류속의 시간에 따른 변화와 특정한 시간에 대한 통합된 이미지 강도를 모니터링 하는 것을 통하여 혈액 세포의 변형성을 정량화하는 것으로 제안된다. 미세유체 채널 배열 및 혈액과 공기가 동등하게 채워진 1회용 시린지를 포함하는 유체 플랫폼을 사용하여, 본 발명의 방법은 높은 처리량으로 혈액의 변형성을 측정할 수 있고, 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)에 차이에 대한 충분한 정보를 제공한다.

[0032] 본 발명의 방법의 실현 가능성과 유용성을 나타내기 위해, 실험적인 설정은 1회용 시린지를 작동하기 위한 시린지 펌프, 미세 지주와 미세유체 채널 배열을 포함하는 2개의 여과 채널로 된 1회용 미세유체 소자 및 현미경과 고속 카메라를 포함하는 이미지 획득설비로 구성된다. 도 1의 A에 도시한 바와 같이, 미세유체 소자는 하나의 입구, 부스러기 또는 큰 크기의 세포를 방지하기 위한 미세 지주(갭= $10\mu\text{m}$ , 깊이= $10\mu\text{m}$ ), 대칭의 지그재그 형상(최소 폭= $W$ , 최대 폭= $10\mu\text{m}$  및 깊이= $10\mu\text{m}$ )으로 된 미세유체 채널 배열( $N=105$ ) 및 하나의 출구를 갖는 것으로 설계된다. 1회용 시린지는 각각 혈액 샘플( $V_{blood}=0.3\text{ml}$ )과 공기( $V_{air}=0.3\text{ml}$ )가 동등하게 채워지게 된다. 시린지를 수직방향으로 세우면, 밀도 차이 때문에, 혈액 샘플과 공기는 하부와 상부 층으로 분리된다. 혈액 샘플의 혈류속도는 시린지 펌프(즉,  $Q=1\text{ml/h}$ )를 이용하여  $1\text{ml/h}$ 로 고정된다. 특정한 부피까지 공기가 충분히 압축된 후에, 혈액 샘플은 미세유체 소자로 주입된다. 여기서, 미세유체 소자에서 혈류량( $Q_d$ )은 시린지에서의 압력( $P_s$ )

과 미세유체 소자에서의 압력( $P_d$ ) 사이에 압력 차이(즉,  $Q_s \propto \Delta P = P_s - P_d$ )에 의존한다. 즉, 시린지 내에 공기의 컴플라이언스(Compliance)는 공기 압축에 의한 혈류량( $Q_d$ )을 수동적으로 제어할 수 있다.

[0033]

미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로깅(clogging)으로 초래되는 혈류역학적인 저항의 변화를 정량화하기 위해, 특정한 ROI에 대한 혈유속 필드와 이미지 강도가 사용되었다. 혈유속 필드는 5kHz의 높은 프레임 속도로 고속 카메라에 의해 캡처된 2개의 연속적인 이미지를 이용하는 전도 시간-분해 미세 PIV 기술(conducting time-resolved micro-PIV technique)에 의해 얻어지게 된다. 전도 시간-분해 미세 PIV 기술과 비교하여, 이미지 강도의 변화는 아주 긴 시간(~10분)으로 모니터 될 것이다. 따라서, 이 시간 분해 이슈를 만족하기 위해, 연속적인 현미경 이미지는 10분의 긴 시간 동안, 0.5초의 간격으로 디지털 지연-펄스 발생기(digital delay-pulse generator)(Model 555, BNC, USA)에 의해 주기적으로 작동되는 고속 카메라를 이용하여 캡처된다. 도 1의 B에 나타난 바와 같이, 미세유체 소자에서 시린지로부터 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )는 혈액 세포의 변형성에 의존한다. 주입된 혈액 부피는 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로깅에 의해 증가된 압력으로 측정된다. 도 1의 B-(a) 및 도 1의 B-(b)에서 보는 바와 같이, RBCs의 변형성이 충분하게 유연함을 갖는다면, RBCs의 대부분은 RBCs의 어떤 클로깅 없이 미세유체 채널 배열을 통하여 통과한다. 미세채널 배열에서 압력은 일정하게 남게 된다. 따라서, 플런저( $\Delta V_s$ )의 이송 부피는 일관된 혈류역학적인 조건 하에서 혈액의 주입된 부피( $\Delta V_b$ )와 대략 동등하다(즉,  $\Delta V_s \approx \Delta V_b$ ). 그러나, RBCs의 변형성이 더 낮은 유연함을 갖는다면, 미세유체 채널에서 연속적인 클로깅이 일어나는데, 이는 도 1의 B-(c)에서 보는 바와 같이 미세유체 채널 배열에서 압력이 증가한다. 시린지에서의 압력과 미세유체 채널에서의 압력 사이에 압력 차이가 감소하는 경향이 있기 때문에, 주입된 혈액 부피( $\Delta V_c$ )는 플런저의 이송 부피보다 더 작다(즉,  $\Delta V_s > \Delta V_b$ ). 따라서, 좋은 변형성으로 혈액 세포에 대한 미세유체 채널 배열에서 압력( $P_b$ )이 나쁜 변형성( $P_c$ )으로 혈액 세포에 대한 압력보다 더 낮기 때문에(즉,  $P_b < P_c$ ), 좋은 변형성으로 혈액 세포에 공급된 부피( $\Delta V_b$ )는 나쁜 변형성으로 혈액 세포에 대한 부피( $\Delta V_c$ )보다 더 크다(즉,  $\Delta V_b > \Delta V_c$ ). 미세유체 소자에서 혈류 속도의 시간에 따른 변화를 정량화하기 위해, 시간-분해 미세-PIV 기술이 정확한 혈유속 필드를 위해 적용된다. 도 2의 C에서 보는 바와 같이, 높은 가로세로 비율로 직사각의 미세유체 채널(폭=250 $\mu$ m, 깊이=10 $\mu$ m)에 대해서, 미세유체 채널 배열 위를 충분히 흐르고 있는 혈액 세포의 속도 필드는 채널 폭을 따라 일정하게 분배된다. 혈유속 필드를 이용하여, 평균 혈유속( $\langle U \rangle$ )은 다음의 수학식 1로 수학적으로 계산된다.

### 수학식 1

$$\langle U \rangle = \frac{1}{A_c} \int \int_A U dA$$

[0034]

[0035]

상기의 수학식 1에서, U와  $A_c$ 는 각각 혈유속 필드와 단면적을 나타낸다. 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로깅 때문에, RBCs의 개체군은 미세유체 채널 배열의 앞쪽에 밀집하여 분포된다. 그러나, RBCs의 개체군은 미세유체 채널 배열 뒤쪽에 드물게 분포된다. 미세유체 채널 주변에 같은 창 크기로 상부 챔버( $u_c$ )와 하부 챔버( $l_c$ )가 RBCs의 불균일한 분포를 정량화하기 위해 신중하게 선택된다. 10분 동안 고속 카메라에 의해 캡처된 순차적인 현미경 이미지를 위한 디지털 이미징 프로세싱을 이용하여, 상부 챔버에 대한 이미지 강도( $I_{uc}$ )와 하부 챔버에 대한 이미지 강도( $I_{lc}$ )는 0.5초의 간격으로 계산된다. 미세유체 채널 배열에서 클로깅은 변형성의 효율적인 매개변수로서 새롭게 제안된 혈액 세포, 클로깅 지표(C.I.)와 강하게 관련이 있는 것으로 추측된다. 하부 챔버의 이미지 강도가 상부 챔버의 이미지 강도보다 더 크다는 사실(즉,  $I_{lc} > I_{uc}$ )을 고려하여, 클로깅 지표(C.I.)가 적어도 1보다 더 크게 하기 위해서,  $I_{lc}/I_{uc}$ (즉,  $C.I. = F[I_{lc}/I_{uc}]$ )의 함수로서 클로깅 지표(C.I.)는 쉽게 추측된다. 부가적으로, 미세유체 채널 배열에서 클로깅이 특정한 시간 동안 연속적으로 일어나는 것을 고려하여, C.I.의 공식은 특정한 시간 동안 이미지 강도의 적분으로서 표현된다. 그러므로, 클로깅 지표(C.I.)의 공식은 다음의 수학식 2로 수학적으로 주어진다.

## 수학식 2

$$C.I. = \frac{\int_{t=0}^{t=t_s} I_{lc}(t) dt}{\int_{t=0}^{t=t_s} I_{uc}(t) dt}$$

[0036]

[0037]

상기의 수학식 2에서,  $t_s$ 는 특정 측정시간을 나타낸다. C.I.가 증가하는 경향에 있을 때, RBCs의 변형성은 유연함이 작아진다.

[0038]

정상 혈액 샘플( $H_{ct}=50\%$ )에 대한 이전의 연구에서, 2개의 연속적인 현미경 이미지는 700초의 특정한 시간 동안, 0.5초의 간격으로 고속 카메라에 의해 순차적으로 캡처된다. 도 2의 D에서 보는 바와 같이, 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로킹은 서로 다른 시간( $t$ )([a]  $t=0$ , [b]  $t=100s$ , [c]  $t=200s$ , [d]  $t=300s$ , [e]  $t=400s$  및 [f]  $t=500s$ )에서 순차적인 현미경 이미지로부터 모니터 된다. 미세유체 채널 배열에서 혈액 세포의 연속적인 클로킹 때문에, RBCs는 미세유체 채널 배열의 전면에서 더욱 많이 쌓이게 되는 경향이 있다. 이 실험적인 결과로부터, 혈액 세포의 클로킹은 증가하는 시간과 함께 증가하게 된다. 다른 말로, 미세유체 채널 배열의 전면에서 혈액 세포의 개체군은 미세유체 채널 배열 후면에 개체군보다 더 크다. 디지털 이미지 프로세싱과 시간-분해 미세-PIV 기술을 수행한 후에, 2개의 이미지 강도( $I_{uc}$ ,  $I_{lc}$ )와 평균 혈류속( $\langle U \rangle$ )은 시간과 관련하여 얻어지게 된다. 상부 챔버의 이미지 강도는 혈액 세포의 연속적인 클로킹 때문에 하부 챔버의 이미지 강도보다 더 작다. 시린지 펌프가  $1ml/h$ 의 일정한 유속으로 제어되지만, 평균 혈류속은 특히 1회용 시린지 내에 공기의 컴플라이언스(Compliance) 효과 때문에, 600초 동안 선형적으로 증가하는 경향이 있다. 이후에, 평균 혈류속은 일정하게 남게 된다. 따라서, 특정한 측정 시간은 600초( $t_s=600s$ )로 설정된다. 최소평균 혈류속  $\langle U \rangle_{min}$ , 주입된 혈액의 부피( $\Delta V_{delivered}$ ) 및 클로킹 지표(C.I.)와 같은 3개의 매개변수는 혈액 세포의 변형성을 평가하기 위하여 제안된다. 혈액의 주입된 부피는 평균 혈류속( $\langle U \rangle$ )의 시간에 대한 변화를 이용하여 추론하고, 다음과 같은 수학식 3으로 주어진다.

## 수학식 3

$$\Delta V = A_c \int_{t=0}^{t=t_s} \langle U \rangle dt$$

[0039]

[0040]

**미세유체 소자의 제조와 그것의 실험적인 절차**

[0041]

미세유체 소자는 하나의 입력부, 미세 지주, 대칭의 지그재그 형상으로 미세유체 채널 배열, 하나의 출력부를 갖는 것으로 설계되었다. 미세유체 채널의 깊이는  $10\mu m$ 로 고정되었다. 무엇보다 먼저, 실리콘 성형기가 미세-전자-기계-시스템(MEMS) 기술을 이용하여 준비되었다. 이후에, 다양한 폴리머 중의 하나, 예컨대 폴리디메틸실록산(PDMS)(Sylgard 184, Dow Corning, USA)이 페트리 접시 내에 위치한 실리콘 성형기 내에 부어졌다. PDMS에 용해된 공기 방울은 진공 펌프를 이용하여 완벽하게 제거되었다.  $80^\circ C$ 의 온도로 1시간 동안 대류식 오븐에서 PDMS를 경화시킨 후, PDMS 블록이 실리콘 성형기에서 분리되었다. PDMS 블록의 입력부와 출력부는 생체검사 펀치(O.D.= $0.75mm$ )를 이용하여 천공하였다. PDMS 블록과 슬라이드 유리에 대한 산소 플라즈마를 테스트한 후에, 미세유체 소자는 PDMS 블록과 슬라이드 유리를 결합하는 것에 의해 준비되었다. 미세유체 소자는 4배 대물렌즈( $NA=0.1$ )로 광학 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)에 설치되었다. 미세유체 소자에 존재하는 공기 방울을 제거하기 위해, 1회용 시린지( $1mL$ , BD Science, Singapore)는 1배의 PBS 용액으로 희석된 1% 소혈청 알부민(BSA) 용액으로 채워졌다. 1회용 시린지는 폴리에틸렌 튜브(I.D.= $250\mu m$ , 길이= $300mm$ )를 이용하여 입구부에 연결되었다. 부가적으로, 출구부로부터 혈액을 제거하기 위해, 폴리에틸렌 튜브(I.D.= $250\mu m$ , 길이= $300mm$ )가 출구부에

연결되었다. 시린지 펌프(neMESYS, centoni GmbH, Germany)에 1회용 시린지를 설치한 후에, 1% BSA 용액은 5분 동안 미세유체 소자에 전달되었다. 이때, 미세유체 소자에 존재하는 공기 방울은 완벽하게 제거되었다. 테스트 혈액(0.3mL)과 공기(0.3mL)를 1회용 시린지에 채운 후에, BSA 용액으로 채워진 1회용 시린지는 혈액과 공기가 채워진 시린지로 대체되었다. 시린지 펌프에 1회용 시린지를 설치한 후에, 시린지 펌프의 유속은 1mL/h로 제어되었다. 5kHz의 높은 프레임 속도로 2개의 연속적인 현미경 이미지를 캡처하는 능력을 갖는 고속 카메라(FASTCAM SA 1.1, Photron, USA)가 미세유체 채널에서 혈류속 필드의 시간에 따른 변화를 효율적으로 모니터링하기 위해 사용되었다. 부가적으로, 10분의 특정한 긴 시간 측정을 위해, 고속 카메라는 0.5초의 간격으로 디지털 지연-펄스 발생기(digital delay-pulse generator)에 의해 주기적으로 작동되었다. 모든 실험은 25℃의 일정한 실온에서 실행되었다.

[0042] **시간-분해 미세-PIV와 이미지 강도 측정**

[0043] 미세유체 채널 배열보다 충분히 떨어진 직선부의 미세채널의 특정한 ROI(50×60픽셀)에서, 혈류의 속도 필드는 시간-분해 미세-PIV 기술을 실행하는 것에 의해 얻어졌다. 의문 창 크기는 8×8픽셀이었고, 창 겹침은 50%이었다. 혈류의 얻어진 속도 벡터는 중간값 필터를 이용하여 보증하였다. 혈류의 속도 필드와 상기의 수학적 1을 이용하여, ROI에 대한 평균 혈류속(<U>)는 시간과 관련하여 수학적으로 평가되었다.

[0044] 미세유체 채널 배열에서 연속적인 클로킹 때문에 이미지 강도의 시간에 따른 변화를 평가하기 위해, 각 현미경 이미지에 대한 2개의 특정한 ROI(890×30픽셀)는 미세유체 채널 배열을 기준으로 주의깊게 선택되었다. 각 ROI에 대한 평균 픽셀 값은 상업적인 소프트웨어(Matlab, Mathworks, USA)를 이용하여 평가되었다. 이후, 평균 픽셀 값의 시간에 따른 변화는 상부와 하부 챔버에서 정량적으로 평가되었다.

[0045] **인간 혈액 샘플 준비**

[0046] 본 발명에서 테스트 된 인간 혈액 샘플은 혈액 은행(Daegu-Kyeongbuk Blood Bank, South Korea)에서 제공되었다. 혈액의 적혈구 용적률은 RBCs 또는 1×PBS (pH=7.4, Bio Solution, South Korea) 용액을 신중히 조정하는 것에 의해 40% 또는 50%로 조정되었다. 혈액 세포의 변형성의 변화를 유도하기 위해, RBCs의 막은 10분 동안 0.08%에서 0.23%에 이르는 글루타르알데히드(glutaraldehyde)(Junsei Chemical Co., JAPAN)의 농도를 포함하는 1×PBS 용액에 RBCs를 유지하는 것에 의해 화학적으로 고정된다. 10분 후, 강화된 혈액의 적혈구 용적률은 40% 또는 50%로 설정되었다.

[0047] *P. falciparum*(isolate 3D7)은 RBCs(혈액형 O+), RPMI 1640(25mM HEPES와 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 370 μM hypoxanthine), 10μg/mL 겐타마이신(gentamycin) 및 37℃로 유지되는 인큐베이터 내부에서 가스 혼합(5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub>) 하에 370 μM 하이포크산틴(hypoxanthine)에 유지되었다. 5% 적혈구 용적률과 기생충혈증 수준(0.8%~1.2%)을 설정하기 위해, 기생충 *P. falciparum*은 정상 RBCs를 포함하는 배양기를 이용하여 희석되었다. *P. falciparum* 감염 혈액 세포의 적혈구 용적률은 1×PBS 용액을 이용하여 40%로 설정되었다.

[0048] 얇은 혈액 도말 표본은 5분 동안 99% 메탄올로 고정되었다. 슬라이드를 고정한 후에, 1분에서 2분 동안 건조하게 되었다. 희석된 김자(Giemsa) 용액(Merck, Darmstadt, Germany)은 염색 전에 준비되었다. 수돗물로 세척된 슬라이드는 새롭게 준비된 김자(Giemsa) 염료 용액에 25분 동안 담갔고, 건조되었다. 착색된 말라리아 기생충은 100×유침 대물렌즈로 현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 검사되었다.

[0049] **생체 내 쥐 혈액 샘플 준비**

[0050] 생후 6~8주(Koatech, Pyeongtaek, Gyeonggi-do, Korea) 된 수컷 ICR 쥐들(Hsd:ICR[CD-1])을 1주일 동안 실험실 조건에 순응시켰다. 이 쥐들은 빛, 온도 및 습도의 표준 조건 하에서 살게 되었다. 쥐의 말라리아 기생충, *P. berghei* ANKA 변종은 정상 쥐들(그룹당 5마리에서 6마리의 쥐들)을 감염시키는 것에 사용되었고, 경북국립대학교(Dr. Yeongchul Hong, Department of Parasitology, School of Medicine, Daegu, 700.422, South Korea)에 의해 제공되었다. 쥐 혈액은 분석을 위해 꼬리 정맥으로부터 모았다. 쥐 혈액의 적혈구 용적률은 1×PBS 용액을 이용하여 40%로 설정되었다.

[0051] 기생충혈증 수준을 모니터링하기 위해, 혈액의 방울이 꼬리 정맥으로부터 모아졌다. 슬라이드에 5분 동안 99% 메탄올로 고정된 얇은 혈액 도말 표본을 고정한 후에, 1~2분 동안 건조되었다. 희석된 4% 김자(Giemsa) 용액은 착색 전에 준비되었다. 수돗물로 세척된 슬라이드는 준비된 김자 염료 용액에 25분 동안 담그고 나서, 건조되었다. 착색된 샘플은 100×유침 대물렌즈로 현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 검사되었다.

[0052]

[0053] **결과 및 토의**

[0054] **최적의 성과에 대한 매개변수의 실험적인 평가**

[0055] 본 발명의 방법의 성과에 대해 1회용 시린지( $V_{air}$ )에서 공기 공동(空洞)과 미세유체 채널 배열의 최소 갭( $W$ )과 같은 2개의 매개변수의 효과는 정량적으로 평가되었다.

[0056] 첫 번째, RBCs의 효율적인 변형성 측정에 대한 공기 컴플라이언스의 효과를 평가하기 위해, 특별한 것은 없고 공기 공동( $V_{air}=0\sim0.3\text{ml}$ )과 함께 정상 혈액 샘플( $H_{ct}=50\%$ )은  $1\text{ml/h}$ 의 일정한 유속으로 시린지 펌프를 이용하여 미세유체 소자에 전달되었다. 고속 카메라와 현미경을 포함하는 이미지 획득설비를 이용하여, 현미경 이미지는 상부 및 하부 챔버에 대해 평균 혈유속( $\langle U \rangle$ )과 이미지 강도의 시간에 따른 변화를 얻기 위해 기록되었다. 도 3의 A-(a)에서 보는 바와 같이, 평균 혈유속의 시간에 따른 변화는 시간-분해 미세-PIV 기술을 실행하는 것에 의해 얻어졌다. 1회용 시린지가 정상 혈액 샘플( $V_{blood}=0.3\text{ml}$ )만으로 채워질 때, 평균 혈유속은 700초 동안 계속 남아 있게 된다. 그러나, 1회용 시린지가 정상 혈액 샘플( $V_{blood}=0.3\text{ml}$ )과 공기( $V_{air}=0.3\text{ml}$ )로 채워졌을 때, 평균 혈유속은 공기의 컴플라이언스의 효과 때문에 400초 동안 과도응답 거동을 보여준다. 이후에, 평균 혈유속은 일정하게 유지된다. 이 실험의 결과는 평균 혈유속이 공기의 컴플라이언스에 강하게 의존하는 것을 나타낸다. 따라서, 평균 혈유속의 변화는 특히  $0.3\text{ml}$ 의 공기 공동(空洞) 하에, 미세유체 채널에서 압력의 변화를 효율적으로 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 반면에, 상부 챔버( $I_{uc}$ )와 하부 챔버( $I_{lc}$ )에 대한 이미지 강도의 시간에 따른 변화는 도 3의 A-(b)에 나타난 것처럼 디지털 이미지 프로세싱을 실행하는 것에 의해 정량적으로 얻어지게 되었다. 혈액 샘플이 공기 컴플라이언스의 효과 하에 전달되었을 때, 각 챔버에 대한 이미지 강도는 비교적 증가하게 된다. 다른 말로, 공기 컴플라이언스는 각 챔버 내에 채워진 혈액 부피에 영향을 주는데, 이는 이미지 강도의 변화를 이끈다. 따라서, 공기 컴플라이언스의 효과는 최소평균 혈유속( $\langle U \rangle_{min}$ )과 클로깅 지표(C.I.)와 같은 2개의 매개변수를 이용하여 정량적으로 비교된다. 도 3의 A-(c)에서 보는 바와 같이, 공기 컴플라이언스는 최소평균 혈유속을 감소하는 것을 야기한다. 그러나, 공기 컴플라이언스는 클로깅 지표(C.I.)에 대해 무시할 만한 효과를 갖는다. 본 발명에서, 모든 실험은 1회용 시린지가 혈액 샘플( $V_{blood}=0.3\text{ml}$ )과 공기( $V_{air}=0.3\text{ml}$ )로 동등하게 채워진 후에 실행되었다.

[0057] 두 번째, 미세유체 채널 배열의 최소 갭( $W$ )에 대한 효과는  $1\text{ml/h}$ 의 일정한 혈유속, 혈액 부피( $V_{blood}=0.3\text{ml}$ ) 및 공기 공동( $V_{air}=0.3\text{ml}$ )과 같은 일치된 혈액 전달 조건 하에서, 정상 혈액 샘플과 강화된 혈액 샘플을 이용하여 테스트되었다. 여기서, 50% 적혈구 용적률로 된 정상 혈액 샘플과 50% 적혈구 용적률로 된 강화된 혈액 샘플은 0.15% 글루타르알데히드(GA) 용액으로 각각 고정된 정상 적혈구 및 강화된 적혈구에  $1\times\text{PBS}$  용액을 첨가하는 것에 의해 준비되었다. 2에서  $4\mu\text{m}$ 에 이르는 최소 갭과 관련한 정상 혈액 샘플에 대해, 평균 혈유속의 시간에 따른 변화와 상부 챔버와 하부 챔버의 이미지 강도는 시간-분해 미세-PIV와 디지털 이미지 프로세싱을 실행하는 것에 의해 얻어졌다. 도 4의 B-(a) 및 도 4의 B-(b)에서 보는 바와 같이, 최소 갭( $W$ )은 평균 혈유속과 이미지 강도에 주요한 영향을 미친다. 다른 말로, 평균 혈유속은  $2\mu\text{m}$  최소 갭에서 크게 감소되는 경향이 있는데, 이는 특정한 시간 동안( $t_s=600\text{s}$ ), 미세유체 소자에 주입된 최소평균 혈유속과 혈액 부피를 감소하는 것으로 이끈다. 반면에, 2에서  $4\mu\text{m}$ 에 이르는 최소 갭과 관련한 화학적으로 고정된 혈액 샘플에 대해, 상부 챔버 및 하부 챔버에 대해 평균 속도와 이미지 강도의 시간에 따른 변화는 도 4의 B-(c) 및 도 4의 B-(d)에서 보는 바와 같이 얻어졌다. 정상 혈액 샘플을 이용하여 실행된 실험적인 결과와 유사하게, 평균 혈유속은  $2\mu\text{m}$  최소 갭에서 상당히 감소된다. 혈류 속도가 시린지 펌프를 이용하여  $1\text{ml/h}$ 로 설정되어도, 일정한 시간( $\sim 100\text{s}$ ) 동안  $2\mu\text{m}$  최소 갭에서 혈류는 정지한다. 이후에, 평균 혈유속은 점차 감소하는 경향이 있다. 부가적으로, 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 계속적인 클로깅 때문에,  $2\mu\text{m}$  최소 갭은 하부 챔버에 대해 이미지 강도를 증가하는 것으로 이끈다. 최소 채널 갭과 관련하여 2개의 챔버에 대한 평균 혈유속과 이미지 강도의 시간에 따른 변화를 이용하여, 최소평균 혈유속( $\langle U \rangle_{min}$ ), 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{Delivered}$ ) 및 클로깅 지표(C.I.)를 포함하는 3개의 매개변수는 정상 혈액 샘플과 강화된 혈액 샘플을 위해 평가되었다. 도 4의 B-(e)-(f)-(g)에서 보는 바와 같이, 강화된 혈액 샘플은 정상 혈액 샘플과 비교하여, 최소평균 혈유속, 주입된 혈액 부피의 더 낮은 값과, 클로깅 지표의 더 높은 값을 갖는다. 이 사실은  $2\mu\text{m}$  최소 갭이 3개의 매개변수에서 뚜렷이 구별이 되는 차이를 유도한다는 것을 설명하고 있어, 미세유체 채널 배열의 최소 갭은 혈액 샘플의 효율적인 변형성 측정을 위해  $2\mu\text{m}$ 로 선택되었다.

[0058] 서로 다른 변형성으로 인간 혈액을 이용한 수행 평가

[0059] 1회용 시린지 내에서 0.3ml 공기 공동 및 미세유체 채널 배열의 2mm 최소 갭과 같은 우선 조건 하에서, 본 발명 방법의 수행은 서로 다른 변형성으로 인간 혈액 샘플을 이용하여 평가되었다.

[0060] 첫 번째로, 혈액 세포의 변형성에 대한 적혈구 용적률 수준의 효과를 평가하기 위해, 40%에서 50%에 이르는 적혈구 용적률 수준으로 2개의 혈액 샘플이 1×PBS 용액으로 정상 적혈구를 첨가하는 것에 의해 준비되었다. 도 5의 A-(a)에서 보는 바와 같이, 평균 혈류속의 시간에 따른 변화는 시간-분해 미세-PIV 기술을 실행하는 것에 의해 얻어졌다. 50% 적혈구 용적률로 된 혈액 샘플은 40% 적혈구 용적률로 된 혈액 샘플보다 더 낮은 값의 평균 속도를 갖는다. 적혈구 용적률은 혈액 점탄성을 증가시키는 경향이 있는데, 이는 혈류역학적인 저항을 증가시키는 것에 기여한다. 따라서, 평균 혈류속은 적혈구 용적률이 낮을수록 뚜렷하게 증가시킨다. 상부 챔버와 하부 챔버에 대한 평균 혈류속과 이미지 강도의 시간에 따른 변화를 이용하여, 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ ), 클로깅 지표(C.I.) 및 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )를 포함하는 3개의 매개변수는 40%에서 50%에 이르는 적혈구 용적률과 관련하여 정량적으로 평가되었다. 도 5의 A-(b) 및 도 5의 A-(c)에서 보는 바와 같이, 클로깅 지표(C.I.)는 더 높은 적혈구 용적률의 값으로 약간 증가되었다. 그러나, 적혈구 용적률(즉,  $P > 0.05$ )에 의존하는 통계상의 차이는 없다. 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ )과 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )는 더 높은 적혈구 용적률의 값으로 상당히 증가되었다. 혈액 세포의 변형성이 적혈구 용적률과 관련하여 증가된다는 이전의 결과를 고려하여, 적혈구 용적률에 의해 영향을 받는 3개의 매개변수는 혈액 샘플의 변형성에서 변화를 모니터링하기 위해 효율적으로 사용될 수 있다. 게다가, 혈액 세포의 변형성을 측정하였을 때, 혈액 적혈구 용적률은 계속 유지될 것이다.

[0061] 두 번째, 서로 다른 변형성으로 인간 혈액 샘플의 변형성을 평가하기 위해, 정상 적혈구의 막은 글루타르알데히드(GA) 용액에 정상 적혈구를 노출하는 것에 의해 화학적으로 고정되었다. 혈액 샘플의 서로 다른 변형성 수준을 유도하기 위해, 글루타르알데히드(GA) 용액의 4개의 서로 다른 농도(C) [(a) C=0, (b) C=0.08%, (c) C=0.15%, and (d) C=0.23%]가 준비되었다. GA 용액의 서로 다른 농도를 첨가하는 것에 의해 정상 적혈구를 강화한 후에, 각 혈액 샘플의 적혈구 용적률은 1×PBS 용액에 강화된 RBCs 첨가하는 것에 의해 50%로 조정되었다. 여기서, GA 용액의 같은 농도를 이용하여 강화된 RBCs는 각 혈액 샘플의 균질성을 보장하기 위해 사용되었다. 도 6의 B-(a)에서 보는 바와 같이, GA의 농도와 관련하여 평균 혈류속의 시간에 따른 변화는 시간-분해 미세-PIV 기술을 이용하여 얻어졌다. GA 용액의 낮은 농도(0~0.08%)로 고정된 RBCs와 함께하는 혈액 샘플은 GA 용액의 높은 농도(0.15%~0.23%)로 고정된 RBCs와 함께하는 혈액 샘플과 비교하여, 상대적으로 더 높은 값의 평균 혈류속을 갖는다. 다른 말로, 높은 농도의 GA로 고정된 RBCs와 함께하는 혈액 샘플은 낮은 변형성을 갖는데, 이는 미세유체 채널 배열을 통하여 어렵게 통과하는 것을 유도하고 미세유체 소자에서 압력을 증가시킨다. 따라서, 미세유체 채널에서 전가된 높은 압력 때문에, 혈액 샘플의 평균 속도는 일정 시간 량(~300s) 동안 거의 0이다. 그러나, 시린지 펌프의 양의 변위 때문에, 공기 공동은 계속해서 감소되었다. 1회용 시린지에서 압력이 미세유체 채널 배열의 압력보다 더 클 때, 혈액 샘플의 평균 속도는 점차 증가하는 경향이 있다. 도 6의 B-(b)에서 묘사되는 바와 같이, 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ )과 클로깅 지표(C.I.)의 변화는 GA 용액의 농도와 관련하여 얻어졌다. 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\min}$ )은 GA 용액의 농도에 의존하여 감소하는 경향이 있다. 부가적으로, 0.15% 이상 GA 용액을 이용하여 고정된 RBCs가 있는 혈액 샘플은  $\langle U \rangle_{\min}$ 과 클로깅 지표의 일정한 값을 갖는데, 이는 본 발명의 방법이 0.15%와 0.23% GA 용액을 이용하여 고정된 2개의 혈액 샘플을 분류하는 것을 어렵게 한다는 것을 나타낸다. 혈액 세포의 변형성이 더 높은 GA 용액의 농도에서 감소된다는 것을 설명하고 있어,  $\langle U \rangle_{\min}$ 의 낮은 값은 낮은 변형성과 함께하는 혈액 샘플을 나타낸다. 부가적으로, 클로깅 지표의 높은 값은 낮은 변형성과 함께하는 혈액 샘플을 나타낸다. 평균 혈류속의 시간에 따른 변화를 이용하여, 미세유체 소자에서 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )는 GA 용액의 농도와 관련하여 얻어졌다. 도 6의 B-(c)에서 보는 바와 같이, 특정한 시간 동안 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피는 GA 용액의 높은 농도가 혈액 세포의 변형성을 감소시키는 것을 야기하기 때문에 더 높은 GA 용액의 농도에서 감소되었다. 낮은 변형성과 함께하는 혈액 샘플은 적혈구 용적률 저항을 증가시키는데, 이는 최소평균 혈류속과 주입된 혈액 부피를 감소시키는 원인이 된다. 따라서, 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피는 혈액 세포의 변형성의 변화를 분류하는 것에 이용될 수 있다.

[0062] 마지막으로, 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)의 양적인 동질성을 평가하기 위해, 정상 RBCs와 강화된 RBCs가 부분적으로 혼합되었던 본 발명의 방법은 혈액 샘플의 변형성을 측정하는 것에 적용되었다. 정상 RBCs는 0.15% GA 용액을 이용하여 고정되었다. 강화된 혈액 샘플의 적혈구 용적률은 1×PBS 용액에 강화된 RBCs를 첨가하는 것에 의해 조정되었다. 부가적으로, 정상 혈액의 적혈구 용적률은 1×PBS 용액에 정상 RBCs를 삽입하는 것

에 의해 조정되었다. 그 후, 서로 다른 혼합비( $\psi$ )[(a)  $\psi=0$ , (b)  $\psi=5\%$ , (c)  $\psi=10\%$ , (d)  $\psi=50\%$  및 (e)  $\psi=100\%$ ]와 함께 하는 5개의 혈액 샘플은 정상 혈액 샘플과 강화된 혈액 샘플을 혼합하는 것에 의해 준비되었다. 혼합비( $\psi$ )는 정상 혈액 부피( $V_{\text{norm}}$ )와 강화된 혈액 부피의 합계 대 강화된 혈액 부피( $V_{\text{hard}}$ )의 비율로서 정의된다 [즉,  $\psi = V_{\text{hard}} / (V_{\text{norm}} + V_{\text{hard}})$ ]. 여기서,  $\psi=0$ 는 혈액 샘플이 정상 RBCs만으로 구성되었다는 것을 의미한다. 부가적으로,  $\psi=100\%$ 는 혈액 샘플이 0.15% GA 용액을 이용하여 고정된 RBCs로 순수하게 구성되었다는 것을 나타낸다. 도 7의 C-(a)는 혼합비( $\psi$ )와 관련하여 평균 혈류속의 시간에 따른 변화를 보여준다. 정상 혈액( $\psi=0$ )을 제외하고, 서로 다른 혼합비와 함께 하는 4개의 혈액 샘플은 일정한 시간의 양 동안 거의 0이다. 그 후, 평균 혈류속은 점차 증가하는 경향이 있다. 5% 혼합비( $\psi=5\%$ )와 함께 하는 혈액 샘플은 강화된 RBCs( $\psi=100\%$ )로 순수하게 구성된 혈액 샘플과 유사한 거동을 보인다. 혈액 샘플의 변형성을 정량적으로 평가하기 위해, 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\text{min}}$ )과 클로깅 지표(C.I.)는 혼합비와 관련하여 얻어졌다. 도 7의 C-(b)에서 보는 바와 같이, 정상 혈액 샘플은  $\langle U \rangle_{\text{min}}$ 의 약 20mm/s를 갖는다. 그러나, 부분적으로 강화된 RBCs로 구성된 혈액 샘플은 약 2mm/s 내에서 상당히 감소된다. 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\text{min}}$ )은 5%에서 100%에 이르는 혼합비를 통하여 일정하게 유지된다. 부가적으로, 강화된 RBCs와 함께 하는 혈액 샘플의 클로깅 지표는 정상 혈액( $\psi=0$ )과 비교하여 상당히 감소된다. 클로깅 지표는  $\psi=5\%$ 에서  $\psi=100\%$ 까지 일정하게 남게 된다. 게다가, 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피는 혼합비와 관련하여 평가되었다. 도 7의 C-(c)에서 보는 바와 같이, 강화된 RBCs를 포함하는 혈액 샘플의 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )는 정상 혈액과 비교하여 뚜렷하게 감소된다. 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )의 변화는 혼합비와 관련하여  $\langle U \rangle_{\text{min}}$ 의 변화와 유사하다. 이 실험결과는 본 발명의 방법이 혈액 샘플의 특정 생물형군(subpopulation)에 의해 유도된 변형성에서 차이점을 분류할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0063] 말라리아가 감염된 혈액을 탐지하기 위한 본 발명의 방법의 임상학적 입증

[0064] 말라리아 기생충은 RBC의 변형성을 감소시킨다, 이는 RBC를 구조적으로 변화시키고, RBCs의 감소된 변형성은 미세순환에서 혈류를 방해하는 것에 기여한다. 이전에, 본 발명자들은 적혈구 침강속도(ESR)와 점탄성이 기생충혈증 수준과 상당히 관련이 있다는 것을 입증하였다. 그러나, 이전의 방법은 ESR을 이용하여, 특히 10%보다 더 낮은 기생충혈증에서 말라리아-감염 혈액을 분류하는 것에 어려움이 있다. ESR 대신에, 본 발명의 방법은 기생충혈증의 탐지수준을 평가하는 것을 제안하게 되었다.

[0065] 본 발명의 방법의 임상학적인 입증에 위해, 말라리아-감염 혈액 샘플은 2개의 쥐 말라리아(*P. berghei*)와 인간 말라리아(*P. falciparum*)를 포함하는 서로 다른 2개의 말라리아를 이용하여 준비되었다. 각 혈액 샘플의 적혈구 용적률은  $1 \times \text{PBS}$  용액으로 말라리아-감염 RBCs를 첨가하여 40%로 조정되었다.

[0066] 첫 번째, 0에서 24%에 이르는 서로 다른 기생충혈증 수준과 함께 *P. berghei*-감염 혈액 샘플은 본 발명의 방법을 이용하여 혈액 샘플의 변형성을 측정하는 것으로 준비되었다. 도 8의 A-(a)는 정상 혈액 샘플과 *P. berghei*-감염 혈액 샘플을 포함하는 2개의 혈액 샘플의 평균 혈류속의 시간에 따른 변화를 보여준다. 삽입 그림은 10% 기생충혈증으로 혈액 샘플의 현미경 이미지를 묘사한 것이다. 말라리아-감염 혈액 샘플은 정상 혈액보다 더 낮은 평균 혈류속을 갖는다. 양쪽의 혈액 샘플이 동일한 기본 용액(즉,  $1 \times \text{PBS}$ ) 및 동일한 적혈구 용적률(즉,  $H_{\text{ct}}=40\%$ ) 하에 준비된다는 사실을 고려하여, 평균 혈류속의 차이는 RBCs에 의해서만 기여된다. 따라서, 이 결과는 말라리아-감염 RBCs의 낮은 변형성이 혈류역학의 저항을 증가시키는 것에 기여한다는 것을 나타낸다. 도 8의 A-(b)에서 보는 바와 같이, 최소평균 혈류속( $\langle U \rangle_{\text{min}}$ )과 클로깅 지표(C.I.)는 기생충혈증과 관련하여 평가된다.  $\langle U \rangle_{\text{min}}$ 은 증가하는 기생충혈증과 함께 상당히 감소된다. 그러나, 클로깅 지표(C.I.)는 증가하는 기생충혈증과 함께 약간 증가된다. 부가적으로, 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피는 도 8의 A-(c)에서 보는 바와 같이, 기생충혈증과 관련하여 평가된다. 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{\text{Delivered}}$ )는 증가하는 기생충혈증과 함께 약간 감소된다. 기생충혈증 10%로 말라리아-감염 혈액 샘플은 정상 혈액 샘플과 비교하여 주입된 혈액 부피에서 뚜렷한 차이를 보여준다. 10% 이상 기생충혈증에서, 주입된 혈액 부피는 계속 남아있게 된다. 선형 회귀 분석(linear regression analysis)을 실행하는 것에 의해,  $\langle U \rangle_{\text{min}}$ 에 대해서  $R^2=0.86$ , 클로깅 지표에 대해서  $R^2=0.40$  및  $\Delta V_{\text{Delivered}}$ 에 대해서  $R^2=0.46$ 이 얻게 된다. 3개의 매개변수 사이에서,  $\langle U \rangle_{\text{min}}$ 은 기생충혈증과 관련하여 충분히 높은  $R^2$ 의 값을 준다. 이 결과는  $\langle U \rangle_{\text{min}}$ 이 *P. berghei*-감염 혈액 샘플의 기생충혈증을 탐지하기 위한 효율적인 매개변수로 고려될 수 있다는 것을 나타낸다. 부가적으로, 주입된 혈액 부피는 10% 이상 기생충혈증으로 *P. berghei*-감염 혈액 샘플을

탐지하기 위한 유망한 매개변수로 고려될 수 있다.

[0067]

두 번째, 0.8%에서 1.2%에 이르는 서로 다른 기생충혈증과 함께 *P. falciparum*-감염 혈액 샘플은 본 발명의 방법의 수행을 입증하기 위해 준비되었다. 도 9의 (B)-(a)는 *P. falciparum*-감염 혈액 샘플에 대해 4개의 서로 다른 시간( $t$ )[(a)  $t=40s$ , (b)  $t=200s$ , (c)  $t=400s$ , and (d)  $t=600s$ ]에서 고속 카메라에 의해 캡처된 연속적인 현미경 이미지를 보여준다. 증가하는 시간에 따라, 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 클로킹은 연속적으로 일어나게 되는데, 이는 상부 챔버에서 RBCs의 개체군을 증가시키는 원인이 되고, 하부 챔버에서 RBCs의 개체군을 감소시킨다. 이 말라리아-감염 혈액 샘플의 역할 거동을 정량화하기 위해, 평균 혈유속( $\langle U \rangle$ )과 이미지 강도( $I_{uc}$ ,  $I_{lc}$ )는 도 9의 B-(b)에서 보는 바와 같이, 시간과 관련하여 얻게 된다. 미세채널 배열에서 연속적인 클로킹 때문에, 상부 채널( $I_{uc}$ )의 이미지 강도는 약 0.2로 감소된다. 하부 챔버( $I_{lc}$ )의 이미지 강도는 약 0.45로 약간 감소된다. 부가적으로, *P. falciparum*-감염 혈액 샘플의 평균 속도는 상당히 감소되고, 2mm/s 이하로 남게 된다. 실험 후에, 현미경 이미지는 CCD 카메라를 이용하여 캡처되었다. 도 9의 B-(c)에서 보는 바와 같이, RBCs는 미세유체 채널의 각 채널이 막혔기 때문에 미세유체 채널 배열의 전면에 쌓이게 되었다. 미세유체 채널 후면에 RBCs는 드물게 분포된다. 각 챔버에서 평균 혈유속( $U$ )과 이미지 강도( $I_{uc}$ ,  $I_{lc}$ )의 시간에 따른 변화를 이용하여, 최소평균 혈유속( $\langle U \rangle_{min}$ )과 클로킹 지표(C.I.)는 정상 혈액 샘플과 *P. falciparum*-감염 혈액 샘플에 대해서 얻게 된다. 도 9의 B-(d)에서 보는 바와 같이, 말라리아-감염 혈액 샘플은 정상 혈액 샘플과 비교하여, 더 낮은  $\langle U \rangle_{min}$ 의 값과, 더 높은 클로킹 지표의 값을 갖는다. 수학적 3을 이용하여, 도 9의 B-(e)에서 보는 바와 같이, 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피는 2개의 혈액 샘플에서 평가되었다. 말라리아-감염 혈액 샘플의 주입된 혈액 부피는 정상 혈액 샘플의 혈액 부피보다 많이 적다. 24% 기생충혈증으로 *P. berghei*-감염 혈액 샘플과 비교하였을 때, 1% 기생충혈증으로 *P. falciparum*-감염 혈액 샘플은 혈액 세포의 낮은 변형성에 의해 증가되는 혈류역학 저항 때문에 더 낮은  $\langle U \rangle_{min}$ 과  $\Delta V_{Delivered}$ 의 값을 갖는다. 이전의 연구에 따르면, 말라리아-감염 RBCs의 낮은 변형성은 RBC에서 형태학적인 변화에 의해 영향을 받는다.

[0068]

이 실험들로부터, 인간 말라리아 기생충(*P. falciparum*)은 변형성을 심하게 감소시키는 경향이 있는데, 이는 위 말라리아 감염(*P. berghei*)과 비교하여, 생체 조직의 미세순환에서 혈류를 방해하는 원인이 된다. 게다가, 본 발명자들은 본 발명의 방법이 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)에서 높은 처리량과 정량적인 일치성과 함께, 최소평균 혈유속( $\langle U \rangle_{min}$ ), 클로킹 지표(C.I.) 및 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피( $\Delta V_{Delivered}$ )를 포함하는 3개의 매개변수를 이용하는 혈액 샘플의 변형성을 측정할 수 있다는 결론으로 이끌었다.

[0069]

## 결론

[0070]

본 발명에서, 발명자들은 미세유체 채널 배열에서 RBCs의 연속적인 클로킹(clogging) 때문에, 특정한 ROI에 대한 혈유속 필드와 이미지 강도의 시간에 따른 변화를 평가하는 것에 의해 RBCs의 효율적인 변형성 측정방법을 제안하였다. 이 목표를 달성하기 위해, 미세유체 플랫폼은 1회용 시린지 내에 미세유체 채널 배열 및 공기 챔퍼가 있는 미세유체 소자로 구성되었다. RBCs의 변형성은 최소평균 혈유속, 주입된 혈액 부피 및 클로킹 지표를 포함하는 3개의 매개변수를 이용하여 정량적으로 평가되었다. 첫 번째, 1회용 시린지에 공기 공동(空洞), 미세유체 채널 배열의 최소의 갭 및 혈액 적혈구 용적률(hematocrit)을 포함하는 3개의 생체 인자는 정량적으로 평가되었다. RBCs의 변형성은 0.3mL의 공기 공동과 2 $\mu$ m의 최소 갭 하에 효율적으로 측정될 수 있다. RBCs의 변형성은 또한 혈액 적혈구 용적률에 영향을 주게 되었다. 두 번째, 본 발명의 방법의 수행은 균일한 강화된 RBCs가 있는 인간 혈액 샘플을 이용하여 평가되었다. 서로 다른 변형성과 함께 혈액 샘플을 준비하기 위해, 정상 RBCs는 GA 용액(0~0.23%)의 4개의 서로 다른 농도를 이용하여 화학적으로 고정되었다. 정상 혈액 샘플과 비교하여, GA 용액의 더 높은 농도에 의해 고정된 RBCs가 있는 혈액 샘플은 평균 혈유속과 주입된 혈액 부피의 더 낮은 값을 가졌으나, 클로킹 지표의 값은 더 높다. 다른 말로, 낮은 변형성과 함께 혈액 샘플은 최소평균 혈유속과 주입된 혈액 부피를 감소시키는 경향이 있으나, 클로킹 지표를 증가시킨다. 세 번째, 혈액 세포의 특정 생물형군(subpopulation)에서 정량적인 일치성을 평가하기 위해, 본 발명의 방법은 정상 RBCs와 강화된 RBCs에 의해 나란히 혼합되는 혈액 샘플의 변형성을 측정하는 것에 적용된다. 정상 혈액과 비교하여, 3개의 매개변수는 더 높은 값으로 유지되었는데, 이는 5%에서 100%까지 혼합 비율을 증가시키고 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 혈액 샘플의 특정 생물형군(subpopulation)에서 변형성 차이를 분류할 수 있다. 마지막으로, 임상학적인 입증으로써, *P. berghei*와 *P. falciparum*를 포함하는 2개의 서로 다른 말라리아에 의해 감염된 RBCs의 변형성이 측정되었다. 정상 RBCs와 비교하여, 10% 이상 기생충혈증으로 *P. berghei*-감염 혈액 샘플은 각각 최소평균 혈유속과 주입된 혈액 부피에서 뚜렷한 차이를 보여준다. 그러나 균등한 1% 기생충혈증으로 *P. falciparum*-감염 혈액 샘플은 3개

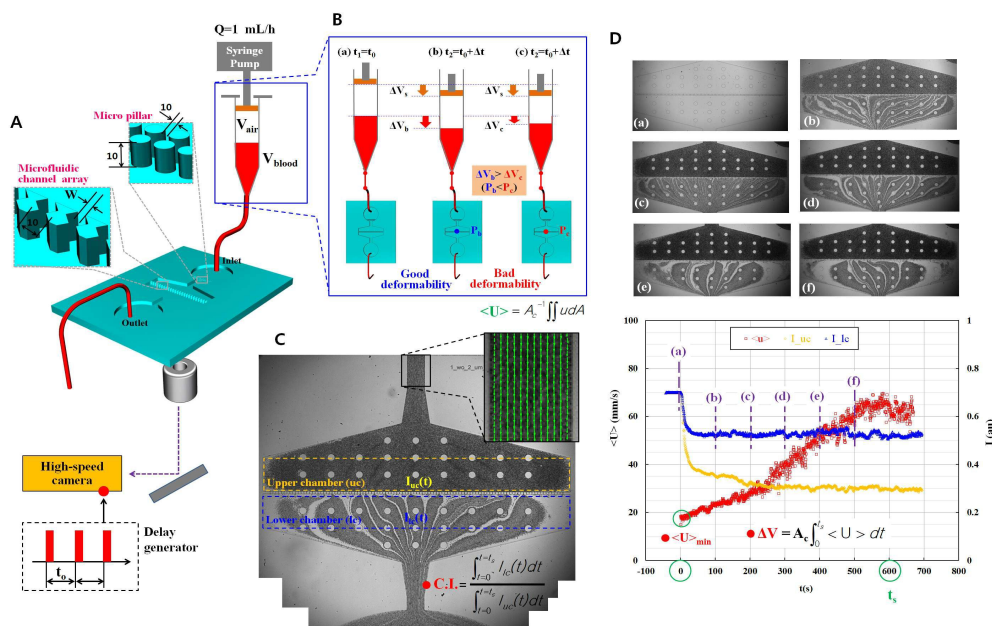
의 대표적인 매개변수에서 상당한 차이를 보여준다. 다른 말로, 인간 말라리아 기생충(*P. falciparum*)은 쥐 말라리아 기생충(*P. berghei*)과 비교하여, 변형성을 심하게 감소시키는 경향이 있다. 이들 실험들은 본 발명의 방법이 최소평균 혈류속, 클로깅 지표 및 미세유체 소자에 주입된 혈액 부피를 포함하는 3개의 매개변수를 이용한 혈액 세포의 변형성을 높은 처리량과 특정 생물형균에서 일치성을 측정할 수 있다는 것을 나타낸다. 게다가, 높은 적혈구 용적률 수준(~50%)과 함께 혈액 샘플(~0.3mL)의 변형성 테스트는 짧은 시간(~10분) 내에 완성될 수 있다. 가까운 미래에, 본 발명의 방법은 혈액 분야의 질병으로 환자로부터 선택된 혈액 샘플의 변형성을 평가하는 데에 이용될 것이다.

[0071]

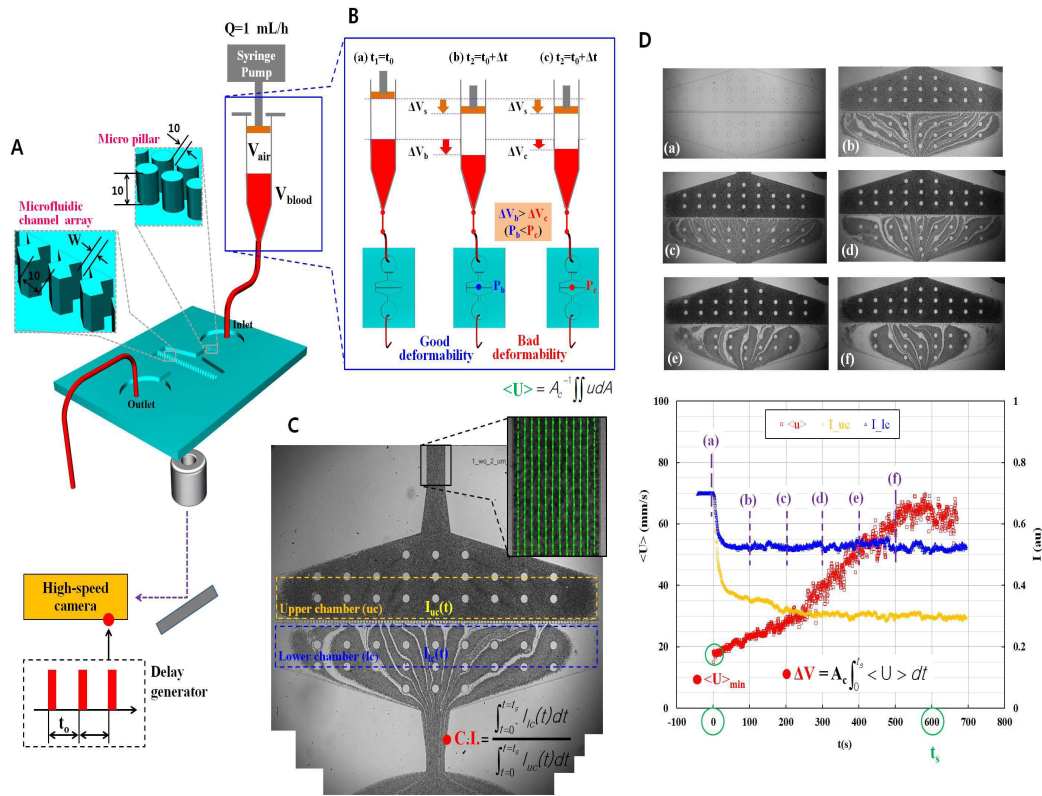
이상과 같이 본 발명에 따른 미세유체 소자를 이용한 적혈구 변형성 측정기구 및 측정방법에 대해서 예시한 도면을 참조로 하여 설명하였으나, 본 명세서에 개시된 실시예와 도면에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 기술사상의 범위 내에서 당업자에 의해 다양한 변형이 이루어질 수 있음은 물론이다.

## 도면

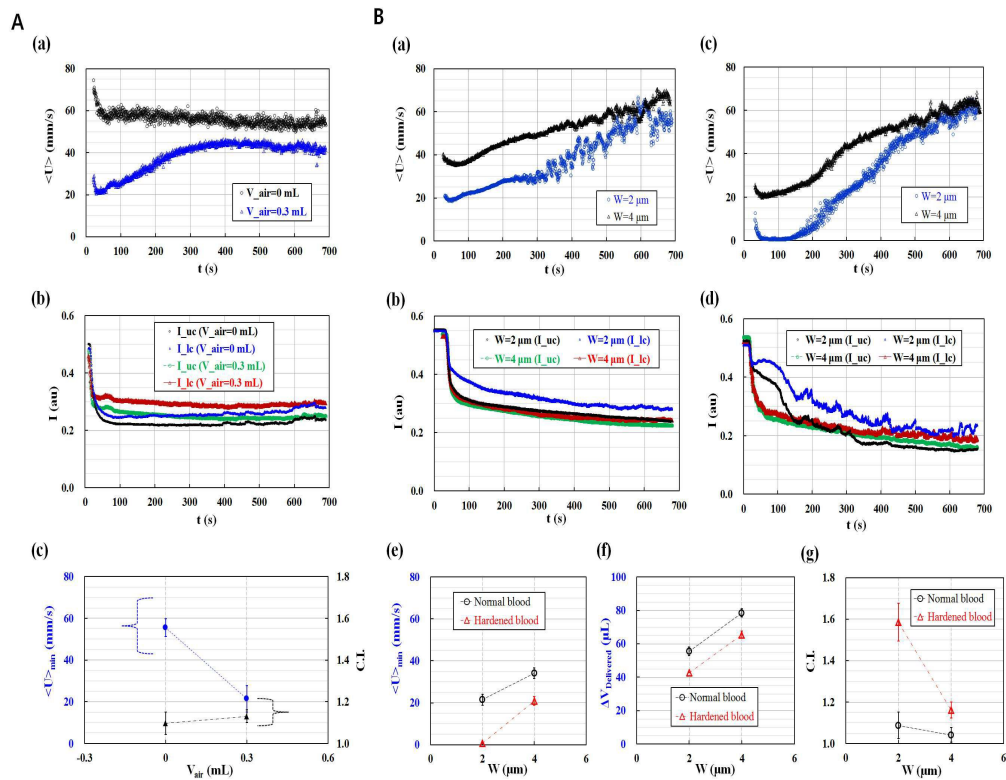
### 도면1



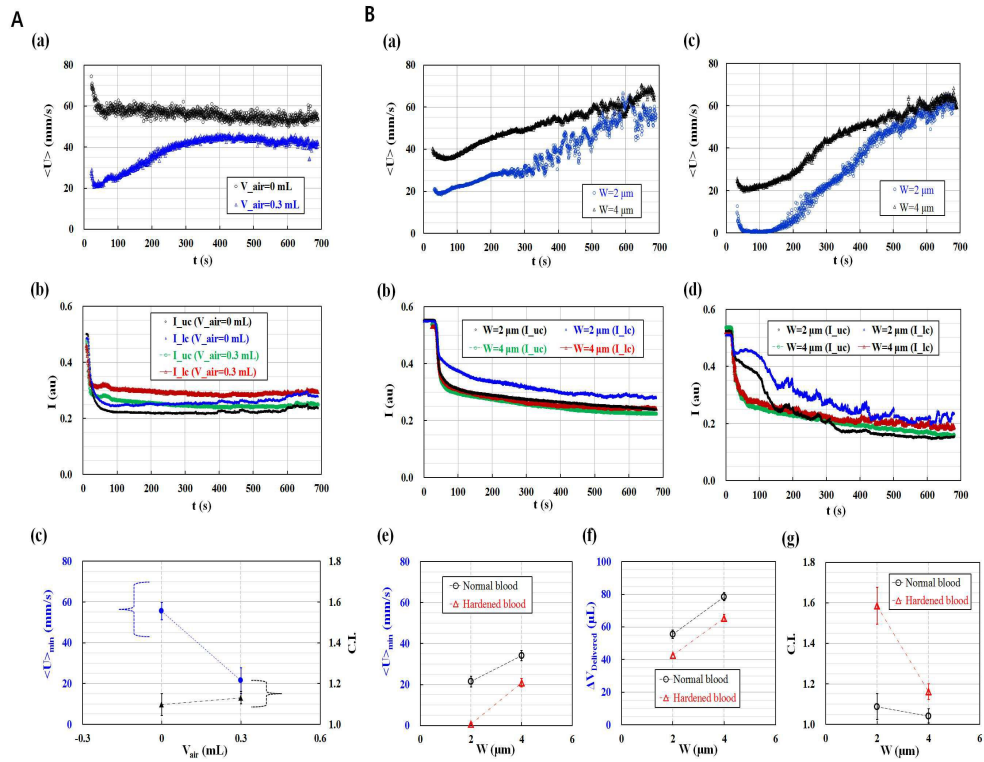
도면2



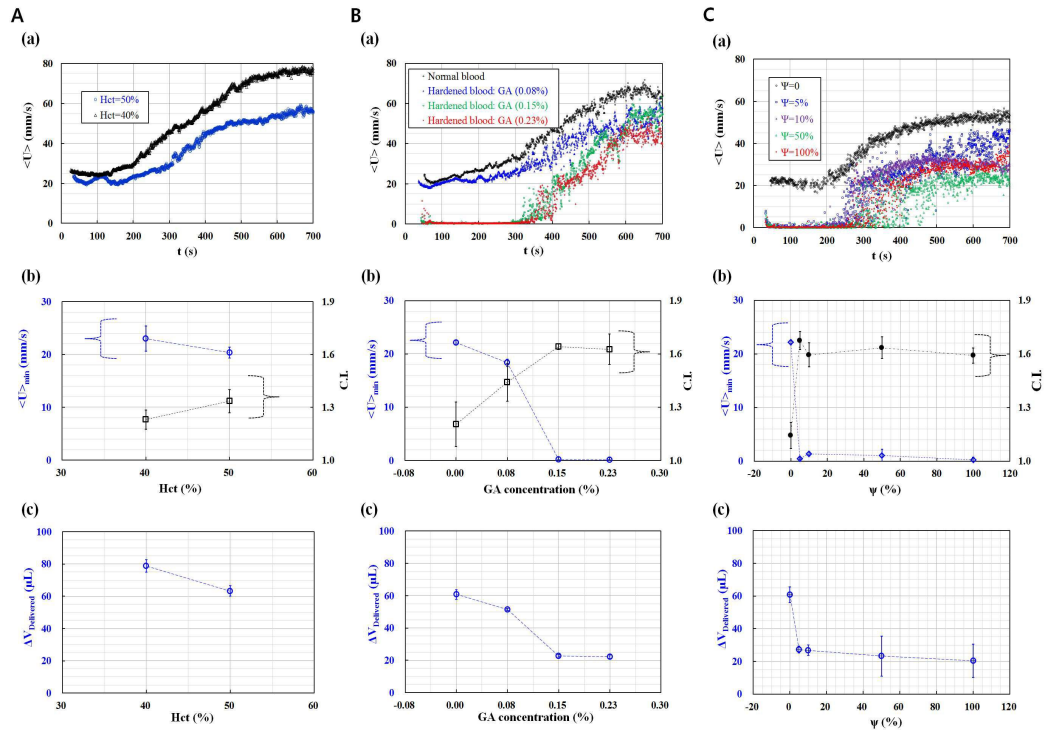
도면3



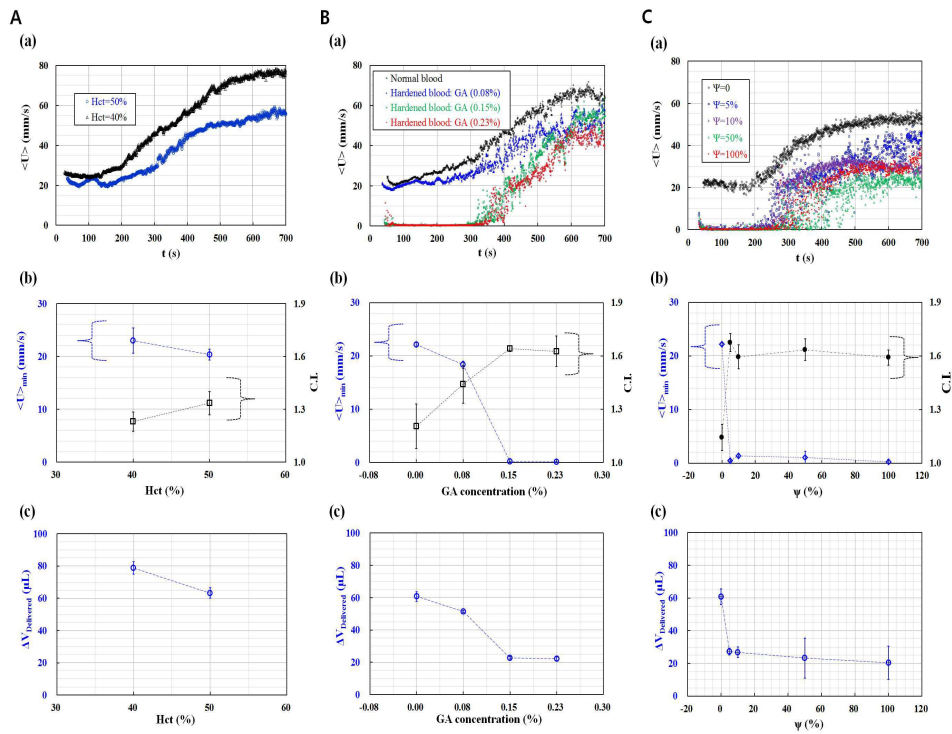
도면4



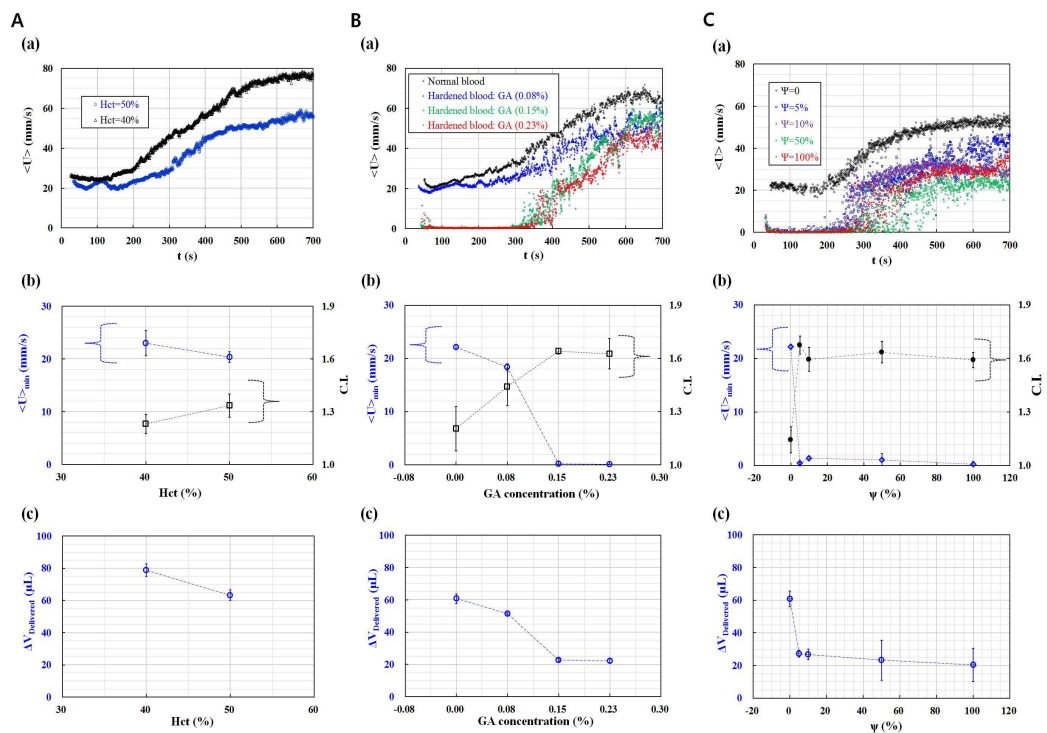
도면5



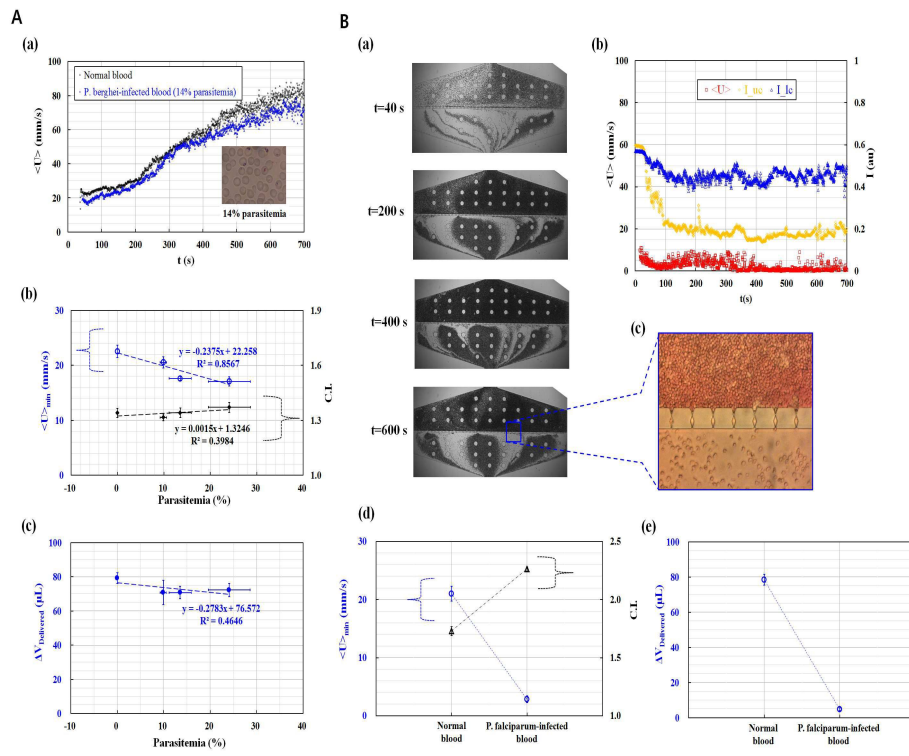
도면6



도면7



도면8



도면9

