

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035272**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.22

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)

(21) Номер заявки
201691698

(22) Дата подачи заявки
2015.02.26

(54) СИСТЕМА И СПОСОБ ЛЕВИТАЦИИ И МОНИТОРИНГА КЛЕТОК

(31) **61/944,707; 62/072,040**

(56) US-B1-6858439
US-A1-20110261446
US-A1-20130314080
US-B1-6677752
US-B1-6878542
US-A1-20060247862
US-A1-20120040846
WO-A2-2012142179
US-A-4226534
US-A-5852298

(32) **2014.02.26; 2014.10.29**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/US2015/017705**

(87) **WO 2015/130913 2015.09.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРАЙГХЭМ ЭНД ВИМЕН'С
ХОСПИТАЛ, ИНК.; БОАРД ОФ
ТРАСТИС ОФ ДЗЕ ЛИЛЭНД
СТЭНФОРД ДЖУНИОР
ЮНИВЕРСИТИ; БЕТ ИСРАЕЛ
ДЕАКОНЕСС МЕДИКАЛ СЭНТЭР
(US)**

(72) Изобретатель:
**Демирси Уткан, Гиран Ионита,
Тасоглу Савас, Дэвис Рональд В.,
Штайнметц Ларс, Дурмус Насид
Гозде, Текин Хусейн Кумхур (US)**

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(57) Раскрыты системы и способы магнитной левитации клеток и мониторинга клеток. Способ разделения гетерогенной популяции клеток проводят путем помещения микрокапиллярного канала, содержащего гетерогенную популяцию клеток в магниточувствительной среде, в раскрытую систему левитации и разделения клеток за счет уравнивания сил действия магнитного поля и скорректированных сил тяжести на отдельных клетках. Также раскрыта система левитации, содержащая микроскоп, на который помещают микрокапиллярный канал, и набор из двух магнитов, между которыми помещают микрокапиллярный канал. Кроме того, раскрыт способ мониторинга клеточных процессов в режиме реального времени с использованием системы левитации.

B1**035272****035272****B1**

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 61/944707 с названием "Система и способ мониторинга и/или разделения клеток" ("System and Method of Cell Monitoring and/or Separation"), поданной 26 февраля 2014 г., и дополнительно испрашивается преимущество согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 62/072040 с названием "Система и способ левитации и мониторинга клеток" ("System and Method for Cell Levitation and Monitoring"), поданной 29 октября 2014 г. Содержание указанных заявок полностью включено в настоящий документ посредством отсылки для всех целей.

Заявление о финансируемом из федерального бюджета исследовании или разработке

Настоящее изобретение было осуществлено при государственной поддержке согласно контракту СВЕТ 1150733, выданному Национальному научному фонду, и контрактам R01 AI093282, R15 HL115556, R01 EB015776-01A1, R21 HL112114, R01 HL096795 и P01 HG000205, выданным Национальным институтам здравоохранения. Государство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Предпосылки создания изобретения

Настоящее раскрытие относится к левитации гетерогенной популяции клеток и более конкретно к разделению клеток на основании различий в магнитных восприимчивостях между клетками и сусpendingующей средой и равновесием между силами действия магнитного поля и скорректированными силами тяжести.

Магнитную левитацию традиционно использовали для анализов плотностей и магнитных восприимчивостей индивидуальных, макроскопических объектов и в качестве средства, эффективного в разделении пищевых продуктов, определении содержания жира в молоке, сыре и арахисовом масле, сравнении разнообразных зерен на основании их собственных плотностей, регулировании самоорганизации объектов и определении характеристик результатов криминалистической экспертизы. Указанные более ранние эксперименты на основе магнитной левитации проводили с использованием крупногабаритных устройств, которые не были совместимы с устройствами для микроскопических исследований или не адаптированы для микроскопии.

Широкое разнообразие клеточных процессов, как физиологических, так и патологических, сопровождаются временными или постоянными изменениями в объемной массовой плотности или характеристике магнитного поля клетки вследствие образования или гашения внутриклеточных парамагнитных реакционноспособных частиц, например реакционноспособных форм кислорода (ROS) или реакционноспособных форм азота (RNS). Указанные события включают в себя стадию клеточного цикла, дифференцировку, клеточную смерть (апоптоз/некроз), злокачественность, стадию заболевания, активацию, фагоцитоз, *in vivo* и *ex vivo* старение клеток, вирусную инфекцию и специфические, а также неспецифические ответы на лекарственные средства.

Сущность изобретения

Было предпринято несколько попыток измерить с высокой точностью плотность отдельных живых клеток. Одна из таких технологий предусматривает изготовленные нанотехнологическими способами, суспендированные микроканальные резонаторы, которые обеспечивают низкую пропускную способность и необходимость использовать механизм насоса высокой сложности для переноса клеток между жидкостями с различными плотностями. В связи с этим надежные инструменты, разработанные для мониторинга с высоким разрешением в режиме реального времени и количественной оценки характеристик магнитного поля и объемных массовых плотностей клеток, помогут выявить сложные клеточные механизмы.

Настоящее изобретение преодолевает вышеупомянутые недостатки путем обеспечения системы левитации для клеток, которая является совместимой с устройствами для микроскопического исследования и разделяет клетки на основании равновесия между скорректированными силами тяжести на клетке и силами действия магнитного поля, индуцированными магнитами. Скорректированная сила тяжести представляет собой силу тяжести, приложенную к клетке, учитывающую сравнительные плотности конкретной клетки в конкретной среде (а именно, плавучесть клетки), как изложено более подробно в разделе подробного раскрытия ниже

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ разделения гетерогенной популяции клеток. Способ предусматривает стадии загрузки образца гетерогенной популяции клеток в микрокапиллярный канал, содержащий магнитночувствительную среду (например, парамагнитную среду, диамагнитную среду или раствор, содержащий радикалы, способные производить достаточную разницу окружающей среды для разделения), помещение микрокапиллярного канала, содержащего образец клеток и магнитночувствительную среду, в систему левитации и обеспечение левитации гетерогенной популяции клеток в магнитночувствительной среде. Используемая система левитации образована из набора из двух магнитов, производящих магнитное поле, причем расстояние между двумя магнитами подбирают по размеру так, чтобы оно вмещало микрокапиллярный канал. Кроме того, система левитации включает в себя устройство для микроскопического исследования, которое содержит столик между набором из двух магнитов, на который помещают микрокапиллярный канал. Стадию левитации клеток осуществляют путем уравнивания силы действия магнитного поля, приложенной к каждой из клеток магнитным полем магнитов, скорректированной силой тяжести клеток в магнитночувствительной

среде, что, как следствие, разделяет гетерогенную популяцию клеток. Механизм противоположен тем, которые использовались на практике ранее, которые, как известно, уравнивали силу действия магнитного поля с инерционными силами и силами трения вместо уравнивания сил действия магнитного поля скорректированными силами тяжести.

Согласно некоторым конкретным формам гетерогенную популяцию клеток можно выбрать из популяции эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, фагоцитов, тромбоцитов, злокачественных клеток и подобного. Кроме того, возможно, чтобы магниточувствительная среда представляла собой парамагнитную среду и содержала гадолиний или являлась основанной на гадолинии, при этом среда может представлять собой чистый гадолиний или допускать дополнительные компоненты.

Согласно дополнительной возможности отдельные клетки в пределах гетерогенной популяции клеток можно отличить от других на основании по меньшей мере одной из их характеристик магнитной восприимчивости и клеточной плотности, созданной вариантом клетки. Вариант клетки может быть обусловлен многочисленными различиями между клетками, такими как тип клеток, стадия клеточного цикла, злокачественность, стадия заболевания, состояние активации, возраст клетки, состояние инфицирования, клеточная дифференцировка, апоптоз клетки и фагоцитоз клетки.

Согласно некоторым формам градиент магнитного поля можно создать с использованием электрических магнитов. Указанные электрические магниты могут создавать градиент с использованием переменных токов. Согласно некоторым формам набор из двух магнитов может представлять собой два постоянных магнита в конфигурации анти-Гельмгольца.

Согласно некоторым формам разделение отдельных клеток может происходить до равновесного состояния, проявляющего равновесие между силами тяжести и силами действия магнитного поля на отдельных клетках.

Более того, возможно провести разделение популяции клеток на месте оказания медицинской помощи, поскольку используемая система левитации не создает помехи для мобильных устройств, которые можно использовать для дистанционной диагностики.

Согласно некоторым формам способ может дополнительно предусматривать стадию наблюдения за гетерогенной популяцией клеток в режиме реального времени с использованием устройства для микроскопического исследования, и устройство для микроскопического исследования может обеспечивать различные изображения гетерогенной популяции клеток в течение периода времени.

В течение указанного периода времени можно провести дополнительные стадии. Например, физическое окружение гетерогенной популяции клеток можно изменить и можно наблюдать ответ гетерогенной популяции клеток как результат физического окружения. В качестве другого примера лечебное средство (такое как, например, лекарственное средство или антибиотик) можно ввести в гетерогенную популяцию клеток и можно наблюдать ответ гетерогенной популяции клеток как результат введения лечебного средства. Если вводят лечебное средство, способ может дополнительно предусматривать мониторинг непрерывного ответа гетерогенной популяции клеток для установления развития устойчивости гетерогенной популяции клеток к лечебному средству.

Согласно некоторым формам отдельные клетки в гетерогенной популяции клеток можно подвергнуть индивидуальному мониторингу и индивидуально отслеживать в течение стадии наблюдения.

Согласно некоторым формам способа стадия наблюдения может предусматривать мониторинг гетерогенной популяции клеток в течение различных фаз клеточного жизненного цикла.

Согласно некоторым формам способа гетерогенную популяцию клеток можно подвергнуть левитации в образце пациента, и дополнительно предусмотрено, что образец пациента может представлять собой кровь. Разумеется, кровь представляет собой только один пример, и не предусмотрено, что образцы пациента ограничены только кровью.

Согласно некоторым формам способа здоровые клетки можно отделить от нездоровых клеток. Например, злокачественные клетки можно отделить от здоровых клеток. В качестве другого примера эритроциты можно подвергнуть левитации для обнаружения присутствия сахарного диабета I типа.

Согласно некоторым формам способа в течение стадии левитации живые клетки в гетерогенной популяции клеток можно отделить от мертвых клеток. Указанное разделение живых клеток и мертвых клеток в гетерогенной популяции клеток можно использовать, например, для определения эффективности лечебного средства или для определения эффекта изменения в физическом окружении на клетки.

Согласно другим формам способа в течение стадии разделения различные микроорганизмы можно отделить друг от друга.

Согласно некоторым формам способа характеристику, по меньшей мере, некоторых клеток из гетерогенной популяции клеток можно определить по измеренной высоте клеток в микрокапиллярном канале. Таким образом, нездоровые клетки можно обнаружить без сравнения с референсными здоровыми клетками.

Согласно дополнительному аспекту способа система левитации может включать в себя первое зеркало на первой открытой стороне микрокапиллярного канала и второе зеркало на второй открытой стороне микрокапиллярного канала, в которой зеркала расположены под прямыми углами относительно расстояния между зеркалами. Наряду с обеспечением левитации клеток способ может дополнительно

предусматривать стадию отражения света от источника света в микроскопе с помощью первого зеркала через образец клеток и по направлению ко второму зеркалу для обеспечения анализа популяции клеток в режиме реального времени. Также возможно, чтобы устройство для микроскопического исследования представляло собой вертикальный флуоресцентный микроскоп, выровненный горизонтально по своей стороне, для обеспечения получения изображений популяции клеток, которое не требует отражения света с использованием зеркал. Кроме того, устройство для микроскопического исследования может представлять собой микроскоп бокового обзора, фотоаппарат мобильного телефона, безлинзовый прибор с зарядовой связью (CCD), или систему комплементарных металлоксидных полупроводников (КМОП), или инвертированный микроскоп.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрен способ осуществления запроса в отношении клеток в режиме реального времени. Способ предусматривает загрузку образца гетерогенной популяции клеток в микрокапиллярный канал, содержащий магнитночувствительную среду, помещение микрокапиллярного канала, содержащего образец клеток и магнитночувствительную среду, в систему левитации, обеспечение левитации гетерогенной популяции клеток в магнитночувствительной среде и изменение магнитных свойств магнитночувствительной среды. Как и в предыдущем случае, используемая система левитации состоит из набора из двух магнитов, производящих магнитное поле, причем расстояние между двумя магнитами подбирают по размеру так, чтобы оно вмещало микрокапиллярный канал. Кроме того, система включает в себя устройство для микроскопического исследования, которое содержит столик между набором из двух магнитов, на который помещают микрокапиллярный канал. Левитация клеток происходит путем уравнивания силы действия магнитного поля, приложенной к каждой из клеток магнитным полем магнитов, скорректированной силой тяжести клеток в магнитночувствительной среде, что, как следствие, разделяет гетерогенную популяцию клеток.

Как описано ранее, возможно, что гетерогенную популяцию клеток можно выбрать из популяции эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, фагоцитов, тромбоцитов, злокачественных клеток и подобного. Кроме того, возможно, что магнитночувствительная среда представляет собой парамагнитную среду и содержит гадолиний или основана на гадолинии, при этом среда может представлять собой чистый гадолиний или допускать дополнительные компоненты. Согласно дополнительной возможности локальное изменение магнитных свойств магнитночувствительной среды можно осуществить, подвергая магнитночувствительную среду воздействию низкоинтенсивного лазерного луча.

Согласно некоторым формам отдельные клетки в пределах гетерогенной популяции клеток можно отличить от других на основании по меньшей мере одной из их характеристик магнитной восприимчивости и клеточной плотности, созданной вариантом клетки. Вариант может быть обусловлен многочисленными различиями между клетками, такими как тип клеток, стадия клеточного цикла, злокачественность, стадия заболевания, состояние активации, возраст клетки, состояние инфицирования, клеточная дифференцировка, апоптоз клетки и фагоцитоз клетки.

Более того, возможно, что разделение отдельных клеток может происходить до равновесного состояния, проявляющего равновесие между силами тяжести и силами действия магнитного поля на отдельных клетках.

Более того, разделение популяции клеток можно провести на месте оказания медицинской помощи, поскольку используемая система левитации не создает помехи для мобильных устройств, которые можно использовать для дистанционной диагностики.

Согласно некоторым формам система левитации может дополнительно включать в себя первое зеркало на первой открытой стороне микрокапиллярного канала и второе зеркало на второй открытой стороне микрокапиллярного канала, в которой зеркала расположены под непрямыми углами относительно пути между зеркалами. Наряду с обеспечением левитации клеток способ может дополнительно предусматривать стадию отражения света от источника света в микроскопе с помощью первого зеркала через образец клеток и по направлению ко второму зеркалу для обеспечения анализа популяции клеток в режиме реального времени. Согласно некоторым формам устройство для микроскопического исследования может представлять собой вертикальный флуоресцентный микроскоп, выровненный горизонтально по своей стороне, для обеспечения получения изображений популяции клеток, которое не требует отражения света с использованием зеркал. Согласно другим формам устройство для микроскопического исследования может представлять собой микроскоп бокового обзора, фотоаппарат мобильного телефона, безлинзовый прибор с зарядовой связью (CCD), или систему комплементарных металлоксидных полупроводников (КМОП), или инвертированный микроскоп.

Как и в предыдущем случае, магниты могут принимать ряд различных форм. Например, магниты могут представлять собой пару постоянных магнитов в конфигурации анти-Гельмгольца. В качестве другого примера магниты могут представлять собой электрические магниты. Путем приложения переменного тока к электрическим магнитам можно создать градиент магнитного поля.

Согласно некоторым формам способа способ может дополнительно предусматривать стадию наблюдения за гетерогенной популяцией клеток в режиме реального времени с использованием устройства для микроскопического исследования и устройство для микроскопического исследования может обеспечивать различные изображения гетерогенной популяции клеток в течение периода времени.

В течение указанного периода времени можно провести дополнительные стадии. Например, физическое окружение гетерогенной популяции клеток можно изменить и можно наблюдать ответ гетерогенной популяции клеток как результат физического окружения. В качестве другого примера лечебное средство (такое как, например, лекарственное средство или антибиотик) можно ввести в гетерогенную популяцию клеток и можно наблюдать ответ гетерогенной популяции клеток как результат введения лечебного средства. Если вводят лечебное средство, способ может дополнительно предусматривать мониторинг непрерывного ответа гетерогенной популяции клеток для установления развития устойчивости гетерогенной популяции клеток к лечебному средству.

Согласно некоторым формам отдельные клетки в гетерогенной популяции клеток можно подвергнуть индивидуальному мониторингу и индивидуально отследить в течение стадии наблюдения.

Согласно некоторым формам способа стадия наблюдения может предусматривать мониторинг гетерогенной популяции клеток в течение различных фаз клеточного жизненного цикла.

Согласно некоторым формам способа гетерогенную популяцию клеток можно подвергнуть левитации в образце пациента, и дополнительно предусмотрено, что образец пациента может представлять собой кровь. Разумеется, кровь представляет собой только один пример, и не предусмотрено, что образцы пациента ограничены только кровью.

Согласно некоторым формам способа здоровые клетки можно отделить от нездоровых клеток. Например, злокачественные клетки можно отделить от здоровых клеток. В качестве другого примера эритроциты можно подвергнуть левитации для обнаружения присутствия сахарного диабета I типа.

Согласно некоторым формам способа в течение стадии левитации живые клетки в гетерогенной популяции клеток можно отделить от мертвых клеток. Указанное разделение живых клеток и мертвых клеток в гетерогенной популяции клеток можно использовать, например, для определения эффективности лечебного средства или для определения эффекта изменения в физическом окружении на клетки.

Согласно другим формам способа в течение стадии разделения различные микроорганизмы можно отделить друг от друга.

Согласно некоторым формам способа характеристику, по меньшей мере, некоторых из гетерогенной популяции клеток можно определить по измеренной высоте клеток в микрокапиллярном канале. Таким образом, нездоровые клетки можно обнаружить без сравнения с референсными здоровыми клетками.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предусмотрена система левитации для разделения гетерогенной популяции клеток. Система включает в себя набор из двух магнитов, производящих магнитное поле, причем расстояние между двумя магнитами подбирают по размеру так, чтобы оно вмещало микрокапиллярный канал, адаптированный, чтобы вмещать гетерогенную популяцию клеток, и устройство для микроскопического исследования содержит столик между набором из двух магнитов, на который помещают микрокапиллярный канал.

Более того, система может включать в себя первое зеркало на первой открытой стороне микрокапиллярного канала и второе зеркало на второй открытой стороне микрокапиллярного канала, в которой зеркала расположены под непрямыми углами относительно пути между зеркалами. Предусмотрено, что согласно некоторым формам устройство для микроскопического исследования может представлять собой вертикальный флуоресцентный микроскоп, выровненный горизонтально по своей стороне. Согласно другим формам устройство для микроскопического исследования может представлять собой, например, микроскоп бокового обзора, фотоаппарат мобильного телефона, безлинзовый прибор с зарядовой связью (CCD), или систему комплементарных металлоксидных полупроводников (КМОП,) или инвертированный микроскоп и тому подобное.

Как и в предыдущем случае, магниты в системе могут принимать ряд различных форм или конфигураций. Например, магниты могут являться парой постоянных магнитов в конфигурации анти-Гельмгольца. В качестве другого примера магниты могут представлять собой электрические магниты. Путем приложения переменного тока к электрическим магнитам можно создать градиент магнитного поля.

Указанные и другие преимущества настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания и графических материалов. То, что следует далее, является исключительно описанием предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения. Для оценки полного объема настоящего изобретения следует рассмотреть формулу изобретения, поскольку не предусмотрено, что предпочтительный вариант осуществления является единственным вариантом осуществления в пределах объема формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 подробно представлен опосредованный магнитной левитацией скрининг и модуляция клеток. На фиг. 1a представлена схема магнитной клеточной левитации и манипуляции в магнитном поле. На фиг. 1b представлена схема сил на клетке вследствие различий в магнитной восприимчивости клетки и среды. На фиг. 1c представлено множество видов системы магнитной левитации. На фиг. 1d представлено фронтальное и боковое контурное изображение градиента магнитного поля, индуцированного магнитами в конфигурации анти-Гельмгольца. На фиг. 1e представлено изображение клеточной культуры эритроцитов (RBCS) в 40 мМ растворе Gd^{+} .

На фиг. 2 подробно представлено определение характеристик разделения клеток с использованием магнитной левитации. На фиг. 2а представлена гистограмма плотностей моноцитов, лимфоцитов, базофилов, полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ, или PMN), эозинофилов и эритроцитов. На фиг. 2b представлено изображение клеточной культуры флуоресцентно меченных эритроцитов, полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов, которые подвергли магнитному разделению на основании плотностей в 30 mM Gd^{+} . На фиг. 2c представлено изображение клеточной культуры эритроцитов, подвергнутых левитации в 20, 35, 50 и 100 mM Gd^{+} . На фиг. 2d представлен полученный цейтраферной съемкой набор изображений клеточной культуры при разделении старых и молодых эритроцитов. На фиг. 2e представлено изображение флуоресцентно меченной клеточной культуры старых и молодых эритроцитов на их равновесной высоте левитации. На фиг. 2f показано графическое представление аналитического времени установления равновесия как функции равновесной высоты старых и молодых эритроцитов. На фиг. 2g показан полученный цейтраферной съемкой набор изображений клеточной культуры левитации осажденных эритроцитов в устройстве для магнитной левитации. На фиг. 2h показано графическое представление зависимость от времени расположения левитации эритроцитов от нижней поверхности микрокапилляра до их равновесной точки.

На фиг. 3 подробно представлена статическая левитация функционально измененных клеток крови. На фиг. 3а представлено изображение флуоресцентно меченной клеточной культуры, подробно показывающее изменения в плотности ПМЛ, связанные с активацией РМА. На фиг. 3b показано изображение при малом увеличении левитации активированных и покоящихся ПМЛ, при этом на вкладке показаны различия в форме и оптической плотности. На фиг. 3c показано графическое представление различий округлости между покоящимися и активированными ПМЛ. На фиг. 3d показаны результаты посева флуоресцентно активированных клеток для покоящихся и активированных ПМЛ. На фиг. 3e показано изображение клеточной культуры, подробно представляющее различия в высоте удержания между покоящимися, активированными и обработанными GSH ПМЛ. На фиг. 3f показано изображение клеточной культуры ускоренного в магнитном поле разделения по плотности клеток крови. На левой панели показаны ПМЛ, лимфоциты и тромбоциты. На правой панели показаны покоящиеся ПМЛ, активированные ПМЛ (стрелка) и два эозинофила (наконечники стрелок). На фиг. 3g показано изображение клеточной культуры через 2 ч после левитации, на котором подробно показана гомотипическая агрегация ПМЛ. На фиг. 3h показано изображение клеточной культуры, на котором подробно показан фагоцитоз сальмонеллы с помощью ПМЛ человека.

На фиг. 4 подробно показан функциональный запрос в отношении подвергнутых магнитной левитации клеток крови. На фиг. 4а показана манипуляция с клеткой или дискретной группой клеток с помощью локализованного лазерного облучения. На фиг. 4b показан набор изображений клеточной культуры, на которых представлено увеличение высоты удержания с помощью стимуляции УФ, и опосредованная парамагнитно кластеризация клеток (заштрихованный кружок.) На фиг. 4c показан набор изображений клеточной культуры, на которых показаны изменения магнитных свойств эритроцитов за счет увеличения содержания внутриклеточного АТФ, вызывающего кластеризацию клеток и сниженную левитацию.

На фиг. 5 подробно показана многофункциональность магнитной левитации для клинической диагностики на месте оказания медицинской помощи. На фиг. 5а показано светловольное изображение левитации клеток злокачественной опухоли молочной железы (ТС), ПМЛ и лимфоцитов из разведенной крови с добавлением известного количества ТС. На фиг. 5b показано флуоресцентное изображение подвергнутых левитации клеток, при этом ТС представляли собой большие по размеру клетки в верхнем ряду. На фиг. 5c показано объединение фиг. 5а и 5b. На фиг. 5d показано изображение левитации клеточной культуры здоровых эритроцитов в присутствии 10 mM метабисульфата Na. На фиг. 5e показано изображение левитации клеточной культуры серповидных эритроцитов в присутствии 10 mM метабисульфата Na.

На фиг. 6 показана схема одного варианта осуществления системы левитации. На фиг. 6а показан дешифрованный фотоснимок системы левитации. На фиг. 6b проиллюстрированы размеры некоторых из опорных элементов.

На фиг. 7 показано графическое представление равновесной высоты как функции различий плотностей между суспендирующей клеточной и парамагнитной средой.

На фиг. 8 показана микрофотография клеток крови с добавлением известного количества клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) (HCC-827) и соответствующий наблюдаемый профиль распределения клеток. Для указанного эксперимента эритроциты предварительно лизировали и клетки хранили с использованием 30 mM раствора Гадовист (Gd^{+}).

На фиг. 9 показана микрофотография клетки немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), обнаруженной в образце крови пациента.

На фиг. 10 проиллюстрирована эффективность разделения клеток злокачественной опухоли молочной железы. На фиг. 10а показана микрофотография флуоресцентно меченных клеток злокачественной опухоли молочной железы (MDA), добавленных в кровь. На фиг. 10b показана эффективность разделения клеток злокачественной опухоли молочной железы, добавленных в образец крови с различными концентрациями, при этом точки на графике представляют среднее от трех параллелей с $\pm$ планками по-

грешностей, показывающих стандартное отклонение.

На фиг. 11 проиллюстрирован наблюдаемый профиль мононуклеаров периферической крови (РВМС) здоровых и страдающих лейкозом пациентов.

На фиг. 12 проиллюстрированы изменения плотности в режиме реального времени отдельных клеток после нанесения на соляную кислоту (HCl). На фиг. 12a показаны микрофотографии контрольных (необработанных) и обработанных HCl MDA клеток злокачественной опухоли молочной железы, при этом контрольные клетки сохраняют свою высоту левитации (т.е. плотность), но нанесенные на HCl клетки опускаются на дно канала (т.е. $z = -500$ мкм). На фиг. 12b подробно показано наблюдение в режиме реального времени нанесенной на HCl отдельной клетки, при котором также проводили анализ жизнеспособности с использованием кальцеина (зеленого флуоресцентного красителя) в отношении живой клетки и пропидий йодида (красного флуоресцентного красителя) в отношении мертвой клетки. Флуоресцентные изображения и светопольные изображения накладывали друг на друга для составления микрофотографий в различные моменты времени. Наряду с тем, что клетка опускается на дно канала и наращивает плотность, флуоресцентный профиль на клетке изменяется от зеленого до красного, указывая на умирание клетки. На фиг. 12c показано измерение плотности в режиме реального времени обработанных кислотой отдельных клеток, при этом проиллюстрировано, что, даже если кислоту на клетки наносили в одно и то же время, каждая из клеток вела себя по-разному вследствие клеточной гетерогенности.

На фиг. 13 проиллюстрированы сравнительные профили распределения по высоте, полученные с использованием опосредованной магнитной левитацией платформы необработанных и обработанных ампициллином клеток бактерий (т.е. *E. coli*) в значениях высоты магнитной левитации. Живые и мертвые бактериальные клетки характеризуются отличающимися магнитными профилями, что можно быстро обнаружить в режиме реального времени.

На фиг. 14 проиллюстрирована магнитная левитация и характеристики дрожжевых клеток. На фиг. 14a показаны графики жизнеспособности дрожжевых клеток после обработки различными лекарственными средствами в течение 24 ч. На фиг. 14b проиллюстрировано, как высоты левитации, магнитные свойства и собственные характеристики магнитного поля дрожжевых клеток изменяются после обработки лекарственными средствами с помощью 100 мкМ кантаридина и 100 мкМ флуконазола.

На фиг. 15 представлены данные, относящиеся к наблюдаемым ответам на лекарственное средство и наблюдаемым изменениям в магнитном профиле клеток. На фиг. 15a показаны профили оптической плотности (OD), на фиг. 15b показано распределение внутри канала, на фиг. 15c показаны расчетные плотности отдельных клеток и на фиг. 15d показаны различные микрофотографии клеток, обработанных с помощью различной концентрации лекарственного средства (флуконазола), причем концентрация обработки представлена над каждой микрофотографией. Обнаружили, что клеточные магнитные профили и плотности изменяются после обработки с помощью различных концентраций лекарственного средства, и указанные изменения можно подвергнуть мониторингу с помощью системы магнитной левитации на уровне отдельной клетки.

На фиг. 16 проиллюстрировано, что почкующиеся дрожжевые клетки характеризуются различными плотностями в течение различных фаз клеточного цикла и характеризуются отличающимися профилями магнитного поля. Масса, плотность и объем клеток (т.е. *Saccharomyces cerevisiae*) в течение всего клеточного цикла можно измерить с помощью мониторинга их показателей высоты левитации.

На фиг. 17 представлены собранные профили магнитного поля, иллюстрирующие клеточное созревание и старение. Более молодые дрожжевые клетки выделяют с помощью центрифугирования при 1400 об/мин, тогда как более старые клетки выделяют путем центрифугирования при 900 и 1400 об/мин соответственно. Как только их выделили при соответствующих скоростях центрифугирования, раскрытое устройство клеточной левитации показало, что молодые и старые клеточные популяции характеризуются различными клеточными профилями магнитного поля и левитируют на различные высоты.

На фиг. 18 подробно показано, как устройство клеточной левитации можно использовать для идентификации микроорганизмов. Дрожжевые и бактериальные клетки, как показано на фиг. 18, обладают различной характеристикой профилей магнитного поля; соответственно индивидуальные микроорганизмы можно идентифицировать и отделить от смешанной культуры при низких концентрациях в соответствии с их плотностями с использованием платформы на основе магнитной левитации.

На фиг. 19 представлены микрофотографии и соответствующие профили магнитного поля здоровых и инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) гепатоцитов. Инфицированные клетки отчетливо отличаются от здоровых клеток по плотности и профилям магнитного поля.

На фиг. 20 представлены профили магнитного поля эритроцитов не страдающих сахарным диабетом и страдающих сахарным диабетом мышей (сахарным диабетом I типа).

На фиг. 21 проиллюстрированы изменения профилей магнитной левитации в течение обработки антибиотиком. Клетки *E. coli* обрабатывали два часа с помощью различных классов антибиотиков: 1 мг/мл ампициллина (бета-лактамы антибиотик), как на фиг. 21a, ципрофлоксацина (фторхинолоновый антибиотик), как на фиг. 21b, и гентамицина (аминогликозидный антибиотик), как на фиг. 21c.

На фиг. 22 проиллюстрированы изменения профилей магнитной левитации бактерий с множественной лекарственной устойчивостью в течение обработки антибиотиками. Эффекты различных анти-

биотиков, включая в себя ампициллин, цiproфлоксацин и гентамицин, как на фиг. 22a, 22b и 22c соответственно, на *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью исследовали с использованием системы магнитной левитации.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему раскрытию предусмотрена техника для осуществления запроса и мониторинга биологических функций суспендированных в магнитной среде клеток в режиме реального времени. Для достижения этого гетерогенные популяции клеток подвергают левитации и заключают в микрокапиллярный канал, например пробирку, помещенную между двумя магнитами, например парой постоянных магнитов в конфигурации анти-Гельмгольца. Это обеспечивает возможность уравнивания клеток на различных высотах на основании равновесия между силами действия магнитного поля и скорректированными силами тяжести, действующими на клетки.

Постоянные магниты в установке могут сделать эту систему более простой для воспроизведения и использования биомедицинскими лабораториями, которые заинтересованы в ее широких применениях. С использованием системы постоянных магнитов создаются линии постоянного магнитного поля и, таким образом, место минимальной напряженности магнитного поля, которая является пространственно постоянной и обуславливает высоты левитации клеток. С использованием переменного тока магнитное поле можно изменить в отношении его направления и интенсивности, а также локализации минимальной напряженности поля. Переменное магнитное поле в принципе может добавить новые характеристики, такие как изменение высоты левитации клеток с течением времени.

С использованием указанного подхода разделяют эритроциты, лейкоциты, тромбоциты и циркулирующие клетки метастазирующей злокачественной опухоли молочной железы, а также эритроциты различных возрастов. Кроме того, такие клеточные процессы как активация нейтрофилов, фагоцитоз и ответы здоровых и серповидных эритроцитов на дегидратацию, подвергают мониторингу в режиме реального времени. Указанная техника обеспечивает широко применимый инструмент для исследования клеточной биологии высокого разрешения в режиме реального времени, а также скрининга и диагностики заболеваний для установок оказания медицинской помощи на месте.

Основной принцип настоящего способа на основе магнитной левитации опирается на уравнивание двух противодействующих сил: скорректированной силы тяжести и силы действия магнитного поля. Предусмотрена эффективная микроструйная платформа на основе магнитной левитации, которая обеспечивает мониторинг клеточных популяций высокого разрешения в режиме реального времени без использования меток, и она является полностью совместимой с вертикальными или инвертированными микроскопами. Указанная технология обеспечивает быстрое разделение различных клеточных популяций на основании их характеристик магнитного поля и плотностей без применения меченных антителами магнитных бусин, центрифугирования или применения специализированных сред с непрерывным или прерывистым градиентом плотности. Платформа для левитации обеспечивает уникальный мониторинг функциональных ответов отдельных клеток на разнообразные стимулы, с течением времени и на уровне отдельной клетки. Указанный подход обеспечивает исследователям возможность *ex vivo* исследования биологических ответов после специфических, клетка-клеточных и клетка-молекулярных взаимодействий в квазифизиологических, сходных с кровотоком условиях.

Лежащие в основе левитации клеток в микрокапилляре механизмы можно понять следующим образом. При приложении магнитного поля, B , созданного двумя магнитами, размещенными в конфигурации анти-Гельмгольца (одинаковые полюса расположены лицом друг к другу), силу действия магнитного поля, F_m , приложенную к клетке, получают с помощью уравнения 1. Скорректированную силу тяжести, F_g , действующая на клетку, получают с помощью уравнения 2

$$F_m = \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0} \right) V (B \cdot \nabla) B \quad (1)$$

$$F_g = (\rho_{\text{клетки}} - \rho_m) V g \quad (2)$$

Здесь $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ (N} \cdot \text{A}^{-2})$ представляет собой магнитную проницаемость свободного пространства, $\rho_m \text{ (кг} \cdot \text{м}^{-3})$ представляет собой плотность парамагнитной среды, χ_m представляет собой безразмерную магнитную восприимчивость парамагнитной среды, $\rho_{\text{клетки}} \text{ (кг} \cdot \text{м}^{-3})$ представляет собой плотность клетки, $\chi_{\text{клетки}}$ представляет собой безразмерную магнитную восприимчивость суспендированной клетки, $V \text{ (м}^3)$ представляет собой объем клетки и g представляет собой вектор силы тяжести. Предполагают, что клетка характеризуется гомогенным распределением плотности и магнитной восприимчивости по всему своему объему.

Сила действия магнитного поля, F_m , зависит от положения клетки (поскольку магнитное поле пространственно изменяется в пределах микрокапилляра) и направлена на минимальное значение магнитного поля. Скорректированная сила тяжести F_g , не зависит от расположения клетки внутри микрокапилляра. Силу трения Стокса F_d получают с помощью уравнения 5 для сферической частицы радиуса R и объема, $V = 4\pi R^3/3$.

В переходном случае, например до того, как клетка достигла равновесной точки, где сила действия магнитного поля уравновешена скорректированной силой тяжести, инерционные силы, например выра-

жение слева в уравнении 3, и сила трения, F_d , которая зависит от скорости миграции клетки, уравнение 5, будут активными, как описано в уравнении 3. В равновесном состоянии силы трения и инерционные силы сводятся к нулю и силы магнитного поля и силы тяжести, действующие на клетку, будут уравновешивать друг друга, как показано в уравнении 4.

$$m\mathbf{a} = \mathbf{F}_m + \mathbf{F}_g + \mathbf{F}_d \quad (3)$$

$$\mathbf{F}_g + \mathbf{F}_m = (\rho_{\text{клетки}} - \rho_m)V\mathbf{g} + \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0}\right)V(\mathbf{B} \cdot \nabla)\mathbf{B} = 0 \quad (4)$$

$$\mathbf{F}_d = 6\pi\eta R\mathbf{v} \quad (5)$$

$$\mathbf{F}_g = (\rho_{\text{клетки}} - \rho_m)V\mathbf{g} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ -(\rho_{\text{клетки}} - \rho_m)Vg \end{pmatrix} \quad (6)$$

$$\mathbf{F}_m = \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0}\right)V(\mathbf{B} \cdot \nabla)\mathbf{B} = \begin{pmatrix} \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0}\right)V\left(B_x \frac{\partial B_x}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_x}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_x}{\partial z}\right) \\ \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0}\right)V\left(B_x \frac{\partial B_y}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_y}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_y}{\partial z}\right) \\ \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0}\right)V\left(B_x \frac{\partial B_z}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_z}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_z}{\partial z}\right) \end{pmatrix} \quad (7)$$

Здесь v представляет собой скорость частицы (м/с) и η представляет собой коэффициент динамической вязкости суспендирующей среды (кг/мс). По оси z , по которой направлена скорректированная сила тяжести, равновесие сил можно записать как

$$(\rho_{\text{клетки}} - \rho_m)Vg + \left(\frac{\chi_{\text{клетки}} - \chi_m}{\mu_0}\right)V\left(B_x \frac{\partial B_z}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_z}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_z}{\partial z}\right) = 0 \quad (8)$$

Здесь принято считать, что абсолютное значение третьего выражения $(B_z \frac{\partial B_z}{\partial z})$ в уравнении 8 больше, чем абсолютное значение суммы первого и второго выражений $(B_x \frac{\partial B_z}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_z}{\partial y})$, и линейное изменение B_z по отношению к оси z , следовательно

$$B_z \frac{\partial B_z}{\partial z} \gg \left(B_x \frac{\partial B_z}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_z}{\partial y}\right) \quad (9)$$

$$\mathbf{B} \equiv \begin{pmatrix} B_x \\ B_y \\ B_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ -\frac{2B_0}{d}z + B_0 \end{pmatrix} \quad (10)$$

Уравнение 8 можно решить после подстановки $\mathbf{B}$, полученного с помощью уравнения 10, в уравнение 8 для нахождения равновесной высоты, h , как видно в уравнении 11. Равновесная высота, h , представляет собой расстояние по вертикали, где сила действия магнитного поля и скорректированная сила тяжести взаимно уничтожаются. Из уравнения 11, кроме того, можно извлечь $\rho_{\text{клетки}}$ и записать как функцию h , уравнение 12а, с коэффициентами α и β , уравнение 12б и с.

$$h = \frac{(\rho_{\text{клетки}} - \rho_m)g\mu_0 d^2}{(\chi_{\text{клетки}} - \chi_m)4B_0^2} + \frac{d}{2} \quad (11)$$

$$\rho_{\text{клетки}} = \alpha h + \beta \quad (12a)$$

$$\alpha = \frac{4(\chi_{\text{клетки}} - \chi_m)B_0^2}{g\mu_0 d^2} \quad (12b)$$

$$\beta = \rho_m - \frac{2(\chi_{\text{клетки}} - \chi_m)B_0^2}{g\mu_0 d} \quad (12c)$$

Равновесная высота как функция разницы в плотности между клеткой и суспендирующей жидкостью показана на графике на фиг. 7.

Также можно рассчитать время установления равновесия. Здесь, установлено, что время установления равновесия, t_0 , представляет собой время, которое проходит, пока клетка движется от своего исходного положения, z_i (например, дна микрокапилляра), к другому положению, z_f (например, высоте левитации), в микрокапилляре. Чтобы найти t_0 , здесь можно в уравнении 3 принять, что клетка характеризуется нулевым ускорением ($\alpha=0$) и движется со своей конечной скоростью, как описано уравнением 13.

$$0 = \mathbf{F}_m + \mathbf{F}_g + \mathbf{F}_d \quad (13)$$

Компонент z уравнения 13 находили путем подстановки уравнений 5, 8 и 10 в уравнение 13, подстановки, показанной как уравнение 14а. После интегрирования уравнения 14а время, которое проходит, пока клетка достигает равновесного состояния, находили, как описано уравнением 15. В то время как клетка приближается к равновесной точке, движущая сила действия магнитного поля становится меньше

и, следовательно, скорость клетки уменьшается, что, в свою очередь, уменьшает силу трения. В математической модели клетка никогда не достигает равновесного состояния, следовательно $t_0 = \infty$, если уравнение 15 решается для $z_f = h$.

$$\frac{dz}{dt} = \xi z + \zeta \quad (14a)$$

$$\xi = \frac{8 R_{eq}^2 B_0^2}{9 \mu_0 d^2 \eta} (\chi_{\text{клетки}} - \chi_m) \quad (14b)$$

$$\zeta = -\frac{2 R_{eq}^2}{9 \eta} \left((\rho_{\text{клетки}} - \rho_m) g + \frac{2 B_0^2}{\mu_0 d} (\chi_{\text{клетки}} - \chi_m) \right) \quad (14c)$$

$$t_0 = \frac{1}{\xi} \ln \left(\frac{\xi z_f + \zeta}{\xi z_i + \zeta} \right) \quad (15)$$

Значения времени установления равновесия для новых и зрелых эритроцитов наносят на график как функцию равновесной высоты на фиг. 2h. В некоторых экспериментах магнитную восприимчивость клетки или окружающей парамагнитной жидкости изменяют, подвергая ее воздействию УФ и вызывая образование реакционноспособных форм кислорода (ROS).

Примеры

Ниже представлены примеры конкретных вариантов осуществления для проведения настоящего изобретения. Примеры представлены только для иллюстративных целей, и не предусмотрено, что они ограничивают объем настоящего изобретения каким бы то ни было образом.

Были предприняты попытки обеспечения точности в отношении используемых числовых значений (например, количества, температуры и т.д.), но, разумеется, следует допустить некоторую экспериментальную погрешность и отклонение.

Пример 1. Основанный на магнитной левитации подход и лежащие в его основе механизмы.

Отрицательные значения разницы между магнитными восприимчивостями подвергаемых суспендированию объектов χ_0 (например, гетерогенной группы клеток) и суспендирующей среды ($\chi_{\text{среды}}$) создают магнитное поле, которое вызывает удержание объектов на различных высотах в зависимости от равновесия между скорректированными силами тяжести и силами действия магнитного поля, как показано на фиг. 1a. Отрицательная разница между магнитными восприимчивостями объекта (χ_0) и суспендирующей среды ($\chi_{\text{среды}}$) вызывает движение объекта от места большей силы действия магнитного поля к меньшей силе действия магнитного поля. Пока объект, например эритроцит (RBC), суспендированный в парамагнитной среде, достигает равновесной высоты, набор сил, таких как силы гидравлического трения, инерционные, гравитационные силы и силы действия магнитного поля, непрерывно действуют на объект. По мере достижения объектом равновесного состояния его скорость и, следовательно, силы трения и инерционные силы становятся все меньше и меньше, как можно увидеть на фиг. 1b.

В указанной установке и с дополнительной прямой ссылкой на устройство, проиллюстрированное на фиг. 6a и b, микрокапилляр, который составляет 50 мм в длину с 1 мм×1 мм квадратным поперечным сечением, помещают между двумя постоянными неодимовыми магнитами квалификации N52 (NdFeB, 50 мм в длину, 2 мм в ширину и 5 мм в высоту) в конфигурации анти-Гельмгольца (одинаковые полюса обращены лицом друг к другу). Указанные части собирали вместе с использованием деталей из полиметилметакрилата (PMMA) толщиной 1,5 мм, которые отрезали с помощью лазерной системы (VLS 2.30 Versa Laser). Перед каждым отдельным измерением микрокапиллярный канал обрабатывали плазмой в течение 2 мин при 100 Вт, 0,5 торр (IoN 3 Tepla) и затем помещали между магнитами. Два зеркала помещали под углом 45° (или другими непрямыми углами) для получения изображения высот левитации с использованием инвертированного микроскопа (Zeiss Axio Observer Z1) с использованием 5× объектива или 20× объектива для создания устройства, совместимого с общепринятыми системами для микроскопических исследований для пространственно-временного мониторинга с высоким разрешением клеток в течение левитации, как подробно представлено на фиг. 1c. Благодаря конкретному размещению двух магнитов с симметричным распределением силы магнитного поля относительно каждой оси (фиг. 1d), суспендированные клетки левитируют в положение, которое зависит как от расположения места минимальной силы поля, так и от соотношений магнитной восприимчивости и клеточной плотности.

Для исследования указанной установки эритроциты, которые выделили из организма здорового донора, суспендировали в 40 мМ парамагнитной среде на основе гадолиния (Gd³⁺). Парамагнитный раствор, используемый для всех экспериментов, представленных в настоящем документе, в настоящее время используют для МРТ-исследований людей, он является нетоксичным и совместимым с клетками крови человека. По прошествии 10 мин удержания в магнитном поле эритроциты стабильно левитировали на высоту, составляющую приблизительно 300 мкм от расположенного внизу магнита, образуя небольшое, не характеризующееся наличием стенок, подобное кровотоку образование, как показано на фиг. 1e.

Для получения светлопольного и флуоресцентного изображения с более высоким разрешением (20х, 40х и 60х) использовали не содержащую зеркал установку, объединенную с флуоресцентным вер-

тикальным микроскопом, выровненным по своей стороне.

Пример 2. Разделение клеток с помощью магнитной левитации

Распределение массовой плотности клеток крови человека варьирует от 1,055 до 1,11 г/мл, как проиллюстрировано на фиг. 2а. Объемная массовая плотность, определяемая как масса на единицу объема, представляет собой один из наиболее фундаментальных физических параметров, которые характеризуют клетку. Некоторые клеточные события, такие как дифференцировка, клеточная смерть (апоптоз/некроз), злокачественность, фагоцитоз и старение клеток, вызывают постоянные или временные изменения в объемной массовой плотности клетки.

Способность установки разделять клетки оценивали с помощью удержания в магнитном поле выделенных и флуоресцентно меченных эритроцитов, полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ) и лимфоцитов, как показано на фиг. 2b.

Для выделения ПМЛ 40 мл крови получали путем венепункции от здоровых взрослых волонтеров согласно руководствам Экспертного совета организации (IRB) Beth Israel Deaconess Medical Center и после получения информированного согласия согласно Хельсинкской декларации. Кровь наполняли в 60 мл шприц, содержащий 14 мл 6% декстрана T500 и 6 мл раствора цитрата. Через 1 ч, предоставленный для обеспечения возможности разделения, получали лейкоцитарную пленку и наносили ее слоем поверх 15 мл Ficoll (полученного от GE Healthcare) и центрифугировали при 350× g в течение 15 мин. Осадок, состоящий из ПМЛ, эозинофилов и представляющих собой примесь эритроцитов, ресуспендировали в 25 мл 0,2% NaCl в течение 45 с для лизиса эритроцитов с последующим добавлением равного объема 1,6% NaCl с непрерывным перемешиванием с переворачиванием для уравнивания солевого раствора. Суспензию центрифугировали при 350× g в течение 5 мин и осажденные ПМЛ отмывали и ресуспендировали в 1 мл HBSS⁺⁺.

Результаты показывают, что клетки, суспендированные в 30 мМ растворе Gd⁺, образуют отдельные специфические в отношении плотности и клеток полосы удержания, населенные эритроцитами, ПМЛ и лимфоцитами отдельно.

Эффект силы магнитного поля суспензионного раствора на фокусирование высоты эритроцитов затем исследовали путем поступательного увеличения молярности раствора Gd⁺, используемого для суспензии эритроцитов, как можно увидеть на фиг. 2с. Обнаружено, что увеличение молярности Gd⁺ и, следовательно, магнитной восприимчивости суспендирующей среды вызывает постепенное увеличение фокусирования высоты клеток.

Эритроциты образуются в костном мозге гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) и циркулируют в течение 100-120 дней перед тем, как их утилизируют тканевые макрофаги. Циркулирующие эритроциты непрерывно высвобождают микрочастицы, которые поступательно снижают свое отношение поверхности к объему и увеличивают свою плотность.

Для исследования того, является ли разрешение чувствительности установки достаточно точным для отделения молодых (1,09 г/мл) от старых (1,11 г/мл) эритроцитов на основании их различных значений объемной массовой плотности, смесь флуоресцентно меченных молодых и старых эритроцитов, которые выделили с помощью градиента Percoll®, подвергли левитации в 30 мМ растворе Gd⁺.

Для обеспечения флуоресцентного мечения разделяли старые и молодые эритроциты. Эритроциты (10% гематокрит) собирали или путем венепункции, или путем взятия крови из пальца и отмывали 3 раза в HBSS⁺⁺. Эритроциты помещали слоем на 13 мл раствора, содержащего 77% Percoll, 10% 1,5 M NaCl и 13% ddH₂O, с последующим центрифугированием при 15000× g в течение 20 мин с выключенным тормозом. Новые эритроциты на самом верхнем слое собирали, отмывали для удаления раствора Percoll и ресуспендировали в 1 мл HBSS⁺⁺. Аналогично старые эритроциты, которые при разделении опускались на дно раствора, собирали, отмывали и ресуспендировали в 1 мл HBSS⁺⁺.

Эритроциты, которые исходно находились в случайном распределении в микрокапилляре, начинали фокусироваться на различных высотах левитации, будучи подвергнутыми действию магнитного поля (моментальные снимки, полученные с помощью цейтраферной съемки, представлены на фиг. 2d). Флуоресцентно меченные молодые и старые эритроциты на своих соответствующих равновесных высотах левитации показаны на фиг. 2e.

С использованием полученных цейтраферной съемкой снимков процесса левитации зависимость фокусирования высоты старых и молодых эритроцитов от конкретного времени установления равновесия оценивали аналитически, как показано на фиг. 2f. Кратко, значения равновесной высоты измеряли от нижнего магнита для молодых и старых эритроцитов и обнаружили, что они составляют 0,156 и 0,092 мм соответственно. Разницы в плотности между каждой клеткой и суспендирующей жидкостью рассчитывали с использованием фиг. 7, которую построили с использованием уравнения 11. Подставляя разницы в плотности в уравнения 14 и 15, значения времени установления равновесия наносили на график, который можно увидеть на фиг. 2f.

Кроме того, исследовали способность установки левитировать гравитационно осажденные клетки. Эритроциты загружали в стеклянный микрокапилляр и затем помещали на лабораторный стол в течение 15 мин, в течение которых все клетки пассивно (под действием силы тяжести) осаждались на дно микро-

капилляра. Микрокапилляр затем загружали в установку для магнитной левитации. Вследствие своих относительно диамагнитных свойств по сравнению с суспендирующей жидкостью клетки начинали двигаться от магнита и левитировать по направлению к своей зависимой от плотности равновесной точке, как показано на фиг. 2g. В итоге положение клеток во время магнитного фокусирования как функции времени с использованием микроскопии с цейтраферной съемкой количественно оценивали, как показано на фиг. 2h.

Пример 3. Статическая левитация функционально измененных клеток крови.

ПМЛ представляют собой фагоциты, клетки, способные воспринимать и реагировать на специфические для микроорганизма опасные сигналы с последующим специфическим связыванием и интернализацией чужеродных микроорганизмов или частиц. События фагоцитоза приводят к образованию реакционноспособных форм кислорода (ROS) и опосредованной ROS активации гидролитических ферментов. Образование ROS и реакционноспособных форм азота (RNS) будет вызывать изменения в характеристике магнитного поля фагоцитов, тогда как динамическое взаимодействие между эндоцитарными и экзоцитарными процессами во время фагоцитоза будет напрямую влиять на объемную массовую плотность активированных ПМЛ.

Свежевыделенные ПМЛ активировали путем инкубации их либо в буфере (покоящиеся ПМЛ) GSH-ME (обработанные GSH ПМЛ), либо 10 нМ PMA (активированные ПМЛ) в течение 5 мин, двукратной отмывки, перемешивания и ресуспендирования их в 35 мМ растворе Gd^{+} . Перед обработками клетки метили или с помощью Cell Tracker Green (активированные ПМЛ), или с помощью Cell Mask Deep Red (обработанные GSH ПМЛ).

Ответ ПМЛ человека в течение фазы активации фагоцитоза исследовали с помощью инкубации ПМЛ с форбол-12-миристин-13-ацетатом (PMA, 10 нМ) в течение 10 мин. В качестве контроля ПМЛ оставляли в буфере в течение 10 мин. Затем клетки отмывали, флуоресцентно метили, смешивали вместе и загружали в установку для магнитной левитации. Магнитная фокусировка выявила явные различия между контрольными и активированными ПМЛ, как в отношении размера, формы, оптической плотности, так и характеристик магнитного поля и массовой плотности, как показано на фиг. 3a.

Активированные ПМЛ образуют внутриклеточную парамагнитную форму ROS, которая активно уменьшает разницу между магнитными восприимчивостями клеток и суспендирующей среды. Вследствие этого активированные ПМЛ, как предполагают, будут "оседать на дно" по сравнению с ПМЛ, обработанными буфером. Тем не менее, результат показал, что снижение плотности, стимулированное клеточной активацией, является более выраженным, чем временное увеличение магнитных свойств, и, как результат, клетки левитировали выше, чем контроль.

Морфологические различия между активированными и нормальными ПМЛ оценивали путем измерения округлости клеток, определяемой как $\frac{\text{периметр}^2}{4\pi \cdot \text{площадь}}$. Расчетные значения округлости, показанные на фиг. 3c, указывают на существенное различие между активированными PMA и обработанными буфером ПМЛ. Те же образцы одновременно исследовали с помощью проточной цитометрии в отношении изменений в прямом и боковом светорассеянии ПМЛ, связанных с активацией с помощью PMA, показанных на фиг. 3d. По сравнению с проточной цитометрией магнитная левитация обеспечивает возможность прямой визуализации клеток, а также увеличенную чувствительность и разрешение определения формы и размера, при этом одновременно обеспечивая измерения плотности в режиме реального времени на уровне отдельной клетки.

Для дальнейшего понимания эффекта внутриклеточных форм ROS на конечное положение левитирующих клеток использовали проникающий в клетки глутатион (GSH), акцептор ROS. Результаты, представленные на фиг. 3e, показывают, что обработанные GSH ПМЛ уравнивались вблизи покоящихся ПМЛ, тогда как активированные, обладающие низкой плотностью ПМЛ фокусировались, как предполагали, выше указанных двух групп.

Для исследования разрешения установки в отношении плотности смесь ПМЛ, лимфоцитов и тромбоцитов подвергали левитации. Получение изображений покоящихся ПМЛ с большим увеличением выявило, что, наряду с тем, что большинство клеток являлись не активированными, несколько, показанных стрелкой на фиг. 3f, продемонстрировали ранние признаки активации, как в отношении изменений формы, так и положений по высоте, что является признаками пониженной клеточной плотности. Кроме того, представляющие собой примесь эозинофилы располагались на дне колонки ПМЛ, сообразно со своей плотностью, которая являлась равной или большей, чем плотность самых плотных ПМЛ, как показано на фиг. 2a. Через два часа после непрерывной левитации, как показано на фиг. 3g, ПМЛ подверглись самоактивации с последующей опосредованной интегринами гомотипической агрегацией.

Следует отметить, что некоторые из кластеров ПМЛ также проявили более низкое положение по сравнению с не активированными ПМЛ, что указывает на то, что внутриклеточные, парамагнитные формы ROS, образованные во время активации, также влияли на высоту удержания клеток. Далее изменения плотности во время фагоцитоза ПМЛ человека исследовали путем инкубации свежевыделенных ПМЛ с флуоресцентно мечеными бактериями *Salmonella Montevideo*. Для обеспечения возможности фагоцитоза ПМЛ, меченные Cell Tracker Green ПМЛ (5×10^5), добавляли к микроцентрифужным пробиркам, со-

держащим 600 мкл HBSS/0,1% BSA. Опсонизированные сывороткой меченные Alexa-594 S. Montevideo (1×10^6) добавляли к ПМЛ с отношением 10:1 и смесь инкубировали в течение 10 мин при 37°C с вращением с переворачиванием при 8 об/мин. ПМЛ отмывали, смешивали с мечеными Hoechst 33342 покоящимися ПМЛ и ресуспендировали в 35 мМ раствора Gd^{3+} . Используемые *Salmonella* Montevideo (Американская коллекция типовых культур) выращивали в течение ночи в питательном бульоне Bacto (Difco) и определяли количественно ($0,5 \text{ ОП}_{600} = 4,5 \times 10^8$ клеток/мл). Бактерии аккуратно осаждали, отмывали и ресуспендировали в HBSS.

Клеточную культуру указанного исследования можно увидеть на фиг. 3h. Результаты показали, что фагоцитирующие ПМЛ характеризовались существенно сниженной плотностью, хотя не наблюдали явной взаимосвязи между количеством поглощенных *Salmonella*, исходно показанных красным на фиг. 3h (хотя сейчас они не так хорошо видны вследствие преобразования изображения по шкале серых тонов), и высотой удержания ПМЛ.

Пример 4. Функциональный запрос в отношении подвергнутых магнитной левитации клеток крови.

Установка для магнитной левитации обеспечивает возможность получения изображений с высоким разрешением в различных точках времени с последующим исследованием уникальных ответов отдельных клеток в популяции. Она обеспечивает возможности широкомасштабного морфологического и функционального картирования с течением времени для каждой клетки в отдельности для данной популяции.

Предложенная платформа обеспечивает возможность проведения манипуляций с отдельной клеткой, подвергая конкретную область удерживаемых клеток воздействию низкоинтенсивного лазерного луча, что обеспечивает возможность широкомасштабного пространственно-временного регулирования высоты нацеленной клетки или группы клеток с помощью временного и локального изменения магнитных свойств раствора гадолиния, как показано на фиг. 4a.

Одну установку для левитации сконструировали с использованием деталей из полиметилметакрилата толщиной 1,5 мм (PMMA) (McMaster Carr). Компоненты установки отрезали до размеров, представленных на фиг. 6b (VersaLASER; Universal Laser Systems Inc.). В указанной экспериментальной установке микрокапилляр (VitroTubes™ Square Capillary Microcells, Borosilicate Glass 8100, Vitrocom, Mountain Glass, NJ) с 1 мм×1 мм (внешняя кромка, толщина стенки 0,2 мм) квадратным поперечным сечением помещают между двумя постоянными неодимовыми магнитами ($NdFeB$) в конфигурации анти-Гельмгольца (одинаковые полюса расположены лицом друг к другу). Два покрытых золотом зеркала помещают на каждой открытой стороне микрокапилляра под углом 45° для создания устройства, совместимого с общепринятыми системами микроскопического исследования для пространственно-временного мониторинга клеток в течение левитации с высоким разрешением. Разрабатывали и производили микро-струйные чипы с легкодоступными, недорогими компонентами и магнитами, обеспечивая широкое использование указанного способа другими исследователями во всем мире.

В одном эксперименте после удержания эритроцитов квадратную область площадью 20×20 мкм в середине стабильно левитирующих эритроцитов подвергли облучению 30 Вт, 488 нм лазерного пучка при 0,34% интенсивности непрерывно в течение 1 мин с использованием блока Vector Photomanipulation (3i). Нацеливание пучка удерживали на одной и той же клетке в течение всего эксперимента.

В другом эксперименте большую площадь (900×900 мкм) подвергнутых левитации эритроцитов, ПМЛ и лимфоцитов облучали УФ. В течение облучения клетки прогрессивно увеличивали свои значения высоты левитации вследствие увеличенных магнитных свойств суспендирующей среды. Сразу после отключения стимуляции УФ клетки начинали возвращаться в свои исходные положения, хотя эритроциты уравнились на более низкой высоте, чем исходные клетки, указывая на то, что внутриклеточные, индуцированные УФ формы ROS увеличивали парамагнитную характеристику эритроцитов. Клеточные культуры, исследованные, когда облучение УФ было включено и когда его выключили, показаны на фиг. 4b.

С соответствием с вероятностью того, что индуцированные УФ формы ROS увеличивали парамагнитную характеристику эритроцитов, в областях с увеличенной клеточной плотностью эритроциты формировали различные агрегаты, показанные красным кружком на фиг. 4b, вероятно, вследствие слабого парамагнитного притяжения между содержащими ROS эритроцитами. Для исследования указанной гипотезы использовали выброс внеклеточного ATP для диссоциации 2-3 DPG (2,3-дифосфоглицерата) от гемоглобина, процесса, который также переводит эритроциты из диамагнитных в слабые парамагнитные клетки. Выделенные эритроциты отмывали и ресуспендировали в $HBSS^{++}$, содержащем 40 мМ Gd^{3+} и 10 мМ содержащегося в клетке ATP (Life Technologies). Эритроциты загружали в капилляр, помещенный между магнитами, и обеспечивали возможность фокусировки. Далее область, составляющую 60×900 мкм, расположенную приблизительно на 70 мкм выше левитации эритроцитов, выбирали и облучали с помощью 488 нм лазерного луча в течение 1 с при 100% интенсивности. Свободный ATP, высвобожденный в суспензию, увеличивал внеклеточную концентрацию ATP от 0 до приблизительно 10 мМ. Клетки регистрировали с использованием Slidebook 5.5.

После фотоллиза свободный ATP становился ATP, эффективно увеличивая концентрацию биологи-

чески активного, внеклеточного АТР от 0 до почти 10 мМ. Высокая концентрация внеклеточного АТР (10 мМ) по сравнению с внутриклеточным (приблизительно 1-1,3 мМ) стимулировала скачкообразное увеличение внутриклеточного АТР с последующей диссоциацией 2,3 DPG от гемоглобина, и изменениями в магнитных свойствах эритроцитов, которые привели к парамагнитно опосредованной кластеризации клеток, представленной кружками на фиг. 4с, и потере левитации. По мере того как эритроциты подходили к нижнему магниту, как представлено на фиг. 4с стрелками, взаимодействие между парамагнитными эритроцитами и магнитом прогрессивно увеличивалось, в итоге преодолевая слабые парамагнитные взаимодействия между образующими кластер эритроцитами и приводя к постепенному рассеиванию кластеров эритроцитов.

Пример 5. Эксплуатационная адаптируемость основанного на магнитной левитации подхода для клинической диагностики РОС.

Чтобы продемонстрировать широкую применимость настоящего основанного на магнитной левитации подхода для различных типов клеток, использовали циркулирующие злокачественные клетки и серповидные эритроциты. Метастазирование представляет собой процесс, ответственный за распространение злокачественных клеток из первичного очага в другую, не смежную область. Если злокачественные клетки отрываются от опухоли, они мигрируют в другие области организма через кровоток или лимфатическую систему, становясь циркулирующими опухолевыми клетками (СТС).

Используемую клеточную линию злокачественной опухоли молочной железы MDA-MB-231 приобретали в Американской коллекции типовых культур и культивировали в DMEM, дополненной 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и хранили при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Получали гетерогенную группу клеток путем введения в нормальную кровь клеток злокачественной опухоли молочной железы (СТС), предварительно окрашенных с помощью проникающего в клетки, специфического в отношении ДНК красителя Hoechst 33342. Клеточную смесь затем подвергали магнитной фокусировке в течение 15 мин в 20 мМ растворе Gd⁺, что обеспечило левитацию только ПМЛ и лимфоцитов, но не эритроцитов. СТС легко идентифицировали, на фиг. 5а они показаны в верхнем ряду как клетки с синими ядрами, из многоклеточной суспензии, удерживаемой вблизи центра микрокапилляра, на расстоянии от десятка до сотен мкм от лимфоцитов и ПМЛ соответственно.

Кроме того, показано, что эритроциты, выделенные от здорового донора и пациента, гомозиготного (SS) в отношении серповидно-клеточной анемии, можно разделить быстро и специфически на основании их индивидуальных ответов на индуцированную 10 мМ метабисульфитом натрия дегидратацию, как можно увидеть на фиг. 5с.

Эритроциты, выделенные от здоровых пациентов и пациентов с серповидно-клеточной анемией, отмывали три раза и инкубировали с 10 мкМ метабисульфита натрия в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки подвергали левитации, как описано выше, и изображения регистрировали через 10 мин. Для увеличения контраста клеток по сравнению с фоном изображения фильтровали с использованием алгоритма обнаружения контуров (Roberts). Указанная обработка делает субпопуляцию серповидных эритроцитов, вероятно, более молодых эритроцитов, значительно плотнее, чем здоровые эритроциты.

Пример 6. Обнаружение без использования метки циркулирующих опухолевых клеток (СТС) и циркулирующих опухолевых микроэмбол (СТМ).

Со ссылкой на фиг. 8-11 проиллюстрировано обнаружение без использования метки циркулирующих опухолевых клеток (СТС) и циркулирующих опухолевых микроэмбол (СТМ).

Со ссылкой на фиг. 8 СТС и СТМ немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) идентифицировали с использованием системы магнитной левитации, где указанные злокачественные клетки левитировали выше, чем популяция клеток крови, как проиллюстрировано в левой панели. В правой панели проиллюстрирован соответствующий профиль, который идентифицирует нормированное количество клеток на конкретных расстояниях (т.е. высотах левитации). По отмеченным пикам можно увидеть, что злокачественные клетки и микроэмболы разделяются выше лейкоцитов, которые остаются на сравнительно более низкой высоте.

Возвращаясь к фиг. 9, СТС также подвергали мониторингу в образце крови пациента с NSCLC с помощью системы магнитной левитации. Заштрихованные белые кружки указывают на СТС в образце крови пациента.

На фиг. 10 проиллюстрирована эффективность разделения клеток злокачественной опухоли молочной железы. Продемонстрировано, что злокачественные клетки, введенные в образцы крови, можно отделить с высокой эффективностью от клеток крови. На фиг. 10а представлена микрофотография, на которой флуоресцентно меченные клетки злокачественной опухоли молочной железы (MDA) вводят в кровь и разделяют с использованием системы левитации. На панели-вкладке на фиг. 10а показаны три больших точки, которые представляют собой меченые MDA. На фиг. 10b проиллюстрирована эффективность разделения клеток злокачественной опухоли молочной железы, введенной в клетки крови при различных концентрациях. Представленные данные указывают на то, что систему левитации можно легко применять для количественного определения СТС и СТМ для диагностики злокачественных опухолей и прогностических применений.

Устройство также способно идентифицировать другие злокачественные клетки от клеток крови.

Например, как проиллюстрировано на фиг. 11, мононуклеары периферической крови (PBMC) здоровых и страдающих лейкозом пациентов проявляют различные клеточные профили при разделении (т.е. высота лейкозных клеток выше, чем высота PBMC).

Пример 7. Мониторинг в режиме реального времени ответа клеток на факторы окружающей среды на уровне отдельной клетки.

Как проиллюстрировано на фиг. 12, мониторинг в режиме реального времени ответа клетки на факторы окружающей среды можно провести на уровне отдельной клетки. В частности, на фиг. 12 проиллюстрированы изменения плотности в режиме реального времени отдельных клеток после нанесения на соляную кислоту (HCl).

На фиг. 12a показаны микрофотографии контрольных (необработанных) и обработанных HCl клеток злокачественной опухоли молочной железы MDA, на которых контрольные клетки сохраняют свою высоту левитации (т.е. плотность), но на которых нанесенные на HCl клетки опускаются на дно канала (т.е. $z \approx -500$ мкм) в течение 40 мин воздействия на них 100 мМ HCl.

На фиг. 12b подробно показано наблюдение в режиме реального времени за нанесенной на HCl отдельной клеткой, при котором также проводили анализ жизнеспособности с использованием кальцеина (зеленый флуоресцентный краситель) для живой клетки и пропидий йодида (красный флуоресцентный краситель) для мертвой клетки. Флуоресцентные изображения и светопольные изображения накладывали друг на друга для составления микрофотографий в различные моменты времени. В то время как клетка опускается на дно канала и наращивает свою плотность, флуоресцентный профиль на клетке изменяется от зеленого до красного, указывая на умирание клетки. Это показывает в режиме реального времени, в течение 700 с, смерть клетки и корреляцию этой клеточной смерти с изменением плотности и изменением высоты левитации.

На фиг. 12c показано измерение плотности в режиме реального времени обработанных кислотой отдельных клеток, причем проиллюстрировано, что, даже если кислоту применяют к клеткам в одно и то же время, каждая из клеток ведет себя по-разному вследствие клеточной гетерогенности.

С помощью этого примера проиллюстрировано, как эффект факторов окружающей среды (например, pH, температура, химические средства и т.д.) на клетки можно подвергать мониторингу в виде изменений клеточной плотности. Это можно использовать для анализа клеточной гетерогенности, которая полезна для понимания злокачественной опухоли, иммунного ответа, инфекционных заболеваний, устойчивости к действию лекарственных средств и эволюции.

Пример 8. Мониторинг в режиме реального времени для применений в отношении скрининга лекарственных средств.

Система левитации также обеспечивает оценку в режиме реального времени клеточных профилей после обработки лекарственными средствами для применений в отношении скрининга лекарственных средств (т.е. антибиотиков, химиотерапии), как проиллюстрировано в общих чертах на фиг. 13-15. Изменения клеточного профиля во время инфекций, а также в течение обработки лекарственными средствами (т.е. антибиотиками, противогрибковыми лекарственными средствами, противораковыми средствами) можно быстро наблюдать с использованием системы магнитной левитации.

Как проиллюстрировано на фиг. 13 (и, в частности, на нижней правой панели фиг. 13), платформу на основе магнитной левитации использовали для обнаружения значительных различий между необработанными и обработанными ампициллином бактериальными (т.е. *E. coli*) клетками в терминах высоты магнитной левитации. Поскольку бактерии отвечают на стимулы и антибиотики, их плотность изменяется. Это напрямую отражается на их значениях высоты левитации.

Аналогичные техники можно использовать в режиме реального времени для мониторинга возникновения устойчивости к антибиотикам у бактерий. Устойчивость к антибиотикам можно оценить с помощью мониторинга живых/мертвых бактерий как функции их значений высоты левитации, которые изменяются в наблюдаемой клеточной плотности, которые динамически изменяются после воздействия антибиотиков.

На фиг. 14 проиллюстрирована магнитная левитация и характеристики дрожжевых клеток, которые не были подвергнуты или были подвергнуты различным обработкам лекарственными средствами в течение некоторого времени. На фиг. 14a показаны графики жизнеспособности дрожжевых клеток после различных обработок лекарственными средствами (т.е. отсутствие обработки лекарственным средством/контроль, 100 мкМ кантаридина или 100 мкМ флуконазола) в течение 24 ч. Наблюдали различные жизнеспособности и указывали оптические плотности для различных обработок лекарственными средствами. На фиг. 14b представлены микрофотографии, иллюстрирующие, как через 15 мин магнитной левитации значения высоты левитации, магнитные свойства и характеристики собственного магнитного поля дрожжевых клеток изменяются после обработки лекарственным средством с помощью 100 мкМ кантаридина и 100 мкМ флуконазола в течение 24 ч.

Возвращаясь теперь к фиг. 15, на указанной фигуре представлены данные, относящиеся к наблюдаемым ответам на лекарственное средство и наблюдаемым изменениям в профиле магнитного поля клеток. На фиг. 15a показаны профили оптической плотности (ОП) после различных типов воздействия лекарственным средством (т.е. контроль, 25 мкМ флуконазола, 50 мкМ флуконазола или 100 мкМ флуко-

назола). На фиг. 15b показано клеточное распределение внутри канала и на фиг. 15c показаны расчетные плотности отдельных клеток. На фиг. 15d представлен различные микрофотографии клеток, обработанных различными концентрациями лекарственного средства (флуконазола), при этом концентрация обработки представлена вверху каждой микрофотографии. Получили наблюдения о клеточных профилях магнитного поля и изменении плотностей после обработки с помощью различных концентраций лекарственных средств (как в высоте, так и распространении, которые являются показателями здоровья и отклонения в здоровом состоянии клеток соответственно). Следует также отметить, что указанные изменения можно подвергнуть мониторингу с помощью системы магнитной левитации на уровне отдельной клетки.

С помощью прямой ссылки на фиг. 21 проиллюстрированы различия в наблюдаемых профилях магнитной левитации клеток *E. coli* после различных типов обработки антибиотиками. Клетки *E. coli* обрабатывали в течение 2 ч с помощью различных классов антибиотиков, включая в себя 1 мг/мл ампициллина (бета-лактамы антибиотик), ципрофлоксацина (фторхинолоновый антибиотик) и гентамицина (аминогликозидный антибиотик). Профиль магнитной левитации каждого из указанных антибиотиков сравнивают с контролем (т.е. необработанными клетками *E. coli*) на фиг. 21a, b и с соответственно. Указанные проиллюстрировали, что различные обработки антибиотиками изменяют значения высоты левитации и клеточные профили магнитного поля различным образом.

С дополнительной прямой ссылкой на фиг. 22 проиллюстрированы различия в наблюдаемых профилях магнитной левитации клеток *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью после различных типов обработки антибиотиками. В указанных экспериментах эффекты различных антибиотиков (ампициллина, ципрофлоксацина и гентамицина соответственно) на *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью исследовали с использованием системы магнитной левитации. Указанный клинический изолят является устойчивым к ампициллину и ципрофлоксацину, но чувствительным к гентамицину. Соответственно отсутствовало значительное изменение в значениях высоты левитации и профилях магнитной левитации через 2 ч обработки с помощью 1 мг/мл ампициллина и ципрофлоксацина, как проиллюстрировано на фиг. 22a и b соответственно. С другой стороны, отсутствовало заметное изменение в значениях высоты левитации и профилях магнитной левитации после обработки с помощью 1 мг/мл гентамицина в течение 2 ч, как проиллюстрировано на фиг. 22c.

Таким образом, система магнитной левитации характеризуется потенциалом в отношении исследования эффективности антибактериальных видов лечения, и систему магнитной левитации можно использовать для применений в исследовании подверженности действию антибактериальных средств.

Пример 9. Мониторинг в режиме реального времени возникновения устойчивости к лекарственному средству у злокачественных клеток.

Указанный тот же тип техник можно использовать для мониторинга в режиме реального времени возникновения устойчивости к действию лекарственного средства у злокачественных клеток. Устойчивость к действию лекарственного средства у злокачественных клеток можно оценить путем мониторинга значений высоты левитации, которые изменяются в их клеточных профилях, наблюдаемых в течение магнитной левитации, которые динамически изменяются после воздействия противораковых средств. Предусмотрено, что эффективность лечения лекарственным средством также можно исследовать с использованием указанных способов в режиме реального времени.

Пример 10. Обнаружение в режиме реального времени клеточной гетерогенности на уровне отдельной клетки.

Следует отметить, что указанная технология обеспечивает обнаружение в режиме реального времени клеточной гетерогенности на уровне отдельной клетки, как проиллюстрировано на фиг. 12, и устанавливает, что различные клетки могут отвечать по-разному как результат многих клеточных факторов.

Аналогично это означает, что гетерогенность ответов на лекарственные средства различных клеток можно подвергнуть мониторингу в режиме реального времени с разрешением на уровне отдельной клетки. Например, измерение плотности в режиме реального времени обработанных кислотой отдельных клеток проводили и наблюдали изменчивость в ответе клеток, обеспечивая разрешение на уровне отдельной клетки. Даже если кислоту наносили на клетки в одно и то же время, каждая из клеток вела себя по-разному вследствие клеточной гетерогенности, что четко проиллюстрировано на фиг. 12c.

Соответственно с использованием этой системы левитации в режиме реального времени предусмотрено, что определенные группы клеток можно вначале охарактеризовать, а затем обработать. Эта изменчивость в поведении клеток в пределах популяции клеток может являться неотъемлемой, но способность осуществлять мониторинг клеток с разрешением на уровне отдельных клеток в ответ на изменчивость факторов окружающей среды или в ответ на изменяющиеся условия обработки обеспечивает многокомпонентный и сложный способ изучения пути, как отвечает популяция клеток, что может быть неоценимым для лучшего понимания лежащих в основе этого механизмов, поведения и ответов в указанных системах и обеспечивает мощный аналитический инструмент.

Пример 11. Обнаружение и разделение живых и мертвых клеток.

В дополнение к экспериментальным результатам, наблюдаемым на фиг. 12 и 13, живые и мертвые клетки можно разделить с использованием указанной платформы. Она потенциально обеспечивает воз-

возможность как для обнаружения, так и определения характеристик клеточных популяций или потенциального разделения живых и мертвых клеточных популяций друг от друга. Такое обнаружение и сортировку можно включить в протоколы исследования или для селективного получения определенных разновидностей образцов клеток.

Пример 12. Профиль клеточного цикла и клеточного созревания и старения.

Систему или платформу также можно использовать в качестве инструмента для наблюдения за клеточными циклами и также можно использовать для определения характеристик определенных типов клеток на основании их наблюдаемого поведения.

Как проиллюстрировано на фиг. 16, почкующиеся дрожжевые клетки характеризуются различными плотностями в течение различных фаз клеточного цикла. Кроме того, указанная платформа продемонстрировала, что наблюдаемые профили клеток (т.е. дрожжевых клеток) изменяются в течение клеточного цикла. Например, как проиллюстрировано на фиг. 16, дрожжевые клетки в фазе М характеризуются большей высотой левитации, чем клетки в фазе S.

Дополнительные наблюдаемые профили представлены на фиг. 17, иллюстрирующие клеточное созревание и старение у дрожжей. В процессе созревания дрожжевых клеток происходят многие физические и биологические изменения. Например, увеличивается размер клетки, замедляется клеточный цикл, изменяется форма клетки, клеточное ядро становится большим и/или более фрагментированным и клетки становятся стерильными. На представленных микрофотографиях старых дрожжей и молодых дрожжей (левая и центральная панели соответственно) проиллюстрировано, что более молодые и более старые дрожжевые популяции представляют собой различные профили. Указанные профили можно дополнительно охарактеризовать, как на крайней правой панели, на которой нормированное количество клеток представлено на различных высотах левитации (т.е. расстояниях). Таким образом, два очень отличающихся профиля можно создать и сравнить, как показано в крайней правой панели, чтобы проиллюстрировать здоровое состояние конкретной группы клеток, и, более того, вследствие природы сбора данных в режиме реального времени, можно использовать для создания упорядоченных профилей, характеризующих старение наблюдаемой клеточной популяции.

Пример 13. Идентификация микроорганизма и патогена.

Как проиллюстрировано на фиг. 18, указанную платформу и систему также можно использовать для идентификации микроорганизмов и патогенов. Отдельные микроорганизмы (т.е. бактерии, дрожжи, грибы, вирусы) можно идентифицировать и отделить от смешанной культуры при низких концентрациях в соответствии с их характеристиками магнитного поля с использованием платформы на основе магнитной левитации. Например, дрожжевые и бактериальные клетки обладают различными характерными магнитными распределениями или профилями. Как проиллюстрировано на фиг. 18, при использовании системы середина канала содержит главным образом бактериальные клетки, тогда как дно канала содержит главным образом дрожжевые клетки.

Пример 14. Различение грамположительных и грамотрицательных видов бактерий с использованием профилей магнитного поля.

Дополнительно предусмотрено, что грамположительные и грамотрицательные виды бактерий можно различить с использованием профилей магнитного поля и клеточных распределений. Грамположительные и грамотрицательные бактерии характеризуются различными поверхностными свойствами. Например, клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из толстого слоя пептидогликана (20-80 нм) и тейхоевых кислот. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий намного сложнее, она состоит из наружной мембраны (7-8 нм) и тонкого слоя пептидогликана (1-3 нм). Кроме того, грамотрицательные бактерии характеризуются более высоким содержанием липидов и липопротеинов вследствие присутствия наружной мембраны, а также липополисахаридов (LPS). Таким образом, грамотрицательные и грамположительные бактерии характеризуются различными плотностями вследствие различных составов клеточных стенок, и указанные различия можно обнаружить и подвергнуть мониторингу в режиме реального времени с использованием принципов магнитной левитации.

Пример 15. Обнаружение вирусной инфекции клеток.

Со ссылкой на фиг. 19 представлены микрофотографии и соответствующие профили магнитного поля здоровых и инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) гепатоцитов. Инфицированные клетки отчетливо отличаются от здоровых клеток по плотности и профилям магнитного поля. Указанные данные ясно показывают, что профиль магнитного разделения гепатоцитов значительно изменяется при их инфицировании вирусом гепатита С (ВГС), как проиллюстрировано на самой нижней панели.

Пример 16. Раннее обнаружение сахарного диабета.

В конце концов, другие типы клеточных изменений также можно наблюдать с использованием платформы. На фиг. 20 показаны профили магнитного поля эритроцитов не страдающих сахарным диабетом и страдающих сахарным диабетом мышей (сахарным диабетом I типа). Клетки крови страдающих сахарным диабетом I типа мышей демонстрируют отличающиеся различные профили клеточной плотности по сравнению с клетками крови от здоровых мышей. Соответственно настоящее устройство обеспечивает новый путь для ранней диагностики сахарного диабета путем мониторинга изменений в значениях высоты левитации.

В представленных выше примерах использовали следующие антитела и реагенты: Hoechst 33342 (H1399, Molecular Probes, Юджин, Орегон); Hank's Balanced Salt Solution (14025-092), краситель для плазматической мембраны Cell Mask Deep Red (C10046), Cell Tracker Green, CMFDA (C-7025), NPE-содержащийся в клетке ATP (A-1048, Life Technologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк); Ficoll® (17-5442-03), Percoll® (17-0891-01, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания); цитрат 4% мас./об. (S5770), декстран T500 (31392), восстановленный глутатион этиловый сложный эфир (GSH-ME, G1404), метабисульфит натрия (S9000), хлорид натрия (S5886, Sigma, Сент-Луис, Миссури); форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA, 1201, Tocris, Бристоль, Великобритания); VitroTubes™ Square Capillary Microcells, Borosilicate Glass (8100, Vitrocom, Mountain Glass, Нью-Джерси); парамагнитная среда на основе гадолиния (Gd+) Prohance® (Bracco Diagnostics, Принстон, Нью-Джерси); Critoseal™ (Fisher Scientific, Питтсбург, Пенсильвания).

В представленных выше примерах для загрузки образцов в микрокапилляр микрокапилляры просто погружали во флаконы с образцом, и образец заполнял капилляр благодаря капиллярным силам. Для каждого эксперимента использовали новый микрокапилляр. Кроме того, если не указано иное, клетки ресуспендировали в 200 мкл 40 мМ раствора гадолиния и загружали в 1,0×1,0 мм квадратные микрокапилляры (толщина стенки составляет 0,2 мм) под действием поверхностного натяжения. Critoseal™ вставляли в любой конец микрокапилляра для предотвращения смыва клеток в течение анализа. Капилляр затем загружали в паз между магнитами и получали изображения клеток с использованием либо фотоаппарата QImaging Emc² EMCCD на микроскопе Olympus BX62, либо фотоаппарата Qimaging EXi CCD на микроскопе Zeiss AxioScope. Для получения изображений с высоким разрешением флуоресцентный микроскоп, выровненный по своей стороне, устанавливали точно горизонтально и использовали установку для магнитной левитации без применения зеркал. Изображения анализировали с использованием Slidebook 5.5 (3i, Денвер, Колорадо), ImageProPlus 7 (Media Cybernetics, Роквилл, Мэриленд) и iVison 4.7 (Biovision, Экстон, Филадельфия).

Посредством представленных примеров продемонстрировали эксплуатационную адаптируемость микроструйной платформы для магнитной левитации, которая обеспечивает разделение и активацию клеток, а также мониторинг и количественное определение различных морфологических признаков, специфических клеточных активностей и агонистических ответов в режиме реального времени. Стратегия, представленная в настоящем документе, обеспечивает исследование временных ответов клеток на биоактивные медиаторы, введенные с помощью заключенных в клетке соединений (таких как, например, ATP). Преимущества системы включают в себя без ограничения (i) простой рабочий процесс, (ii) отсутствие сложных микро/нанотехнологических компонентов, (iii) одноразовые устройства с возможностью автоматически отсоединяемых многократных моделей и (iv) многомерное квазифизиологическое исследование в режиме реального времени динамических взаимодействий клетка-клетка, таких как взаимодействия антигенпрезентирующая клетка:Т-клетка и тромбоцит:моноцит.

Устройство для магнитной левитации обеспечивает возможность многочисленных биотехнологических применений, а также платформу для исследования и мониторинга некоторых фундаментальных характеристик поведения клеток. Оно обеспечивает уникальные возможности для исследования в области клеточной биологии, в котором имеют значение плотности клеток, и может отражать различные процессы, такие как клеточный цикл, фагоцитоз, апоптоз и дифференцировка. Указанная система также чувствительна к магнитным восприимчивостям клеток, и, таким образом, ее можно использовать для анализа расщепления гемоглобина внутри эритроцитов (например, в находящейся на хранении крови и серповидных клетках). Возможность мониторинга некоторых клеточных активностей также может являться значимой для разработки лекарственных средств, исследования токсичности и исследования отдельных клеток. Мониторинг в режиме реального времени левитации клеток с последующим анализом белков и нуклеиновых кислот потенциально будет открывать пути для исследования уникальных сигнальных механизмов, присутствующих только в условиях пониженной гравитации.

Указанная платформа обеспечивает возможность измерений клеточных плотностей (например, эритроцитов, лейкоцитов) и разделения клеток на основании равновесия между скорректированной силой тяжести и противодействующей силой действия магнитного поля. Простота, компактность и трансформируемость разработки делает систему также совместимой с мобильными устройствами для дистанционной медицины и применением в условиях недостаточного обеспечения ресурсами для скрининга и диагностики инфицированных малярией эритроцитов и серповидных клеток. Указанная стратегия не требует применения антител, прогрессивных инструментов для проведения микроскопических исследований или техник для надежной диагностики, а также присутствия специалистов по микроскопическим исследованиям. Настоящая стратегия открывает большие перспективы для идентификации, выделения и анализов данных всесторонних омик субпопуляции клеток в различных нормальных и патологических состояниях.

Настоящее изобретение было описано в отношении одного или нескольких предпочтительных вариантов осуществления, и следует понимать, что многие эквиваленты, альтернативы, варианты и модификации, помимо явно представленных, являются возможными и находятся в пределах объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ разделения гетерогенной популяции клеток, причем способ включает следующие стадии: помещение образца гетерогенной популяции клеток в магнитночувствительной среде в систему левитации, в которой указанный образец и магнитночувствительная среда расположены в микрокапиллярном канале, причем система содержит

набор из двух магнитов, производящих магнитное поле, причем расстояние между двумя магнитами подбирают по размеру так, чтобы оно вмещало микрокапиллярный канал; и

столик между набором из двух магнитов, на который помещают микрокапиллярный канал, который совместим с устройством для микроскопического исследования; и

обеспечение левитации индивидуальных клеток до равновесной высоты внутри микрокапиллярного канала, которая отличается от других клеток внутри гетерогенной популяции клеток в магнитночувствительной среде путем уравнивания силы действия магнитного поля, приложенной к каждой из клеток магнитным полем магнитов, со скорректированной силой тяжести клеток в магнитночувствительной среде путем учета сравнительных плотностей клеток в ней,

характеризующийся тем, что указанный образец представляет собой образец крови и левитация включает отделение индивидуальных клеток указанного образца крови от гетерогенной популяции клеток.

2. Способ по п.1, в котором индивидуальные клетки отличают от других в гетерогенной популяции, по меньшей мере, на основании одного из следующего: их магнитная восприимчивость и клеточная плотность, где клеточный вариант клеток, включенных в гетерогенную популяцию, создает указанное различие, причем

клеточный вариант выбирают из группы, состоящей из клеточного типа, стадии клеточного цикла, злокачественности, стадии заболевания, состояния активации, возраста клетки, состояния инфицирования, клеточной дифференцировки, апоптоза клетки и фагоцитоза клетки.

3. Способ по п.1, в котором система левитации содержит

первое зеркало на первой открытой стороне микрокапиллярного канала и второе зеркало на второй открытой стороне микрокапиллярного канала, причем зеркала располагают под непрямыми углами относительно пути между зеркалами, и при этом

способ дополнительно предусматривает стадию отражения света от источника света в устройстве для микроскопического исследования первым зеркалом через образец клеток и по направлению ко второму зеркалу.

4. Способ по п.1, причем способ проводят на месте оказания медицинской помощи, и при этом магнитное поле не создает помехи для мобильных устройств.

5. Способ по п.1, дополнительно включающий стадии изменения физического окружения гетерогенной популяции клеток и наблюдения ответа гетерогенной популяции клеток как результата физического окружения.

6. Способ по п.1, дополнительно включающий стадии введения лечебного средства в гетерогенную популяцию клеток и наблюдения ответа гетерогенной популяции клеток как результата введения лечебного средства.

7. Способ по п.1, в котором гетерогенная популяция клеток включает в себя некоторые клетки, которые являются инфицированными вирусом.

8. Способ по п.1, дополнительно включающий изменение магнитных свойств магнитночувствительной среды.

9. Способ по п.1 или 8, дополнительно включающий стадию разделения отдельных клеток до равновесного состояния, проявляющего равновесие между силами тяжести и силами действия магнитного поля на отдельной клетке.

10. Способ по п.1 или 8, в котором гетерогенную популяцию клеток выбирают из группы, состоящей из эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, фагоцитов, тромбоцитов и злокачественных клеток.

11. Способ по п.1 или 8, в котором характеристику, по меньшей мере, некоторых из гетерогенной популяции клеток определяют по измеренной высоте расположения клеток в микрокапиллярном канале.

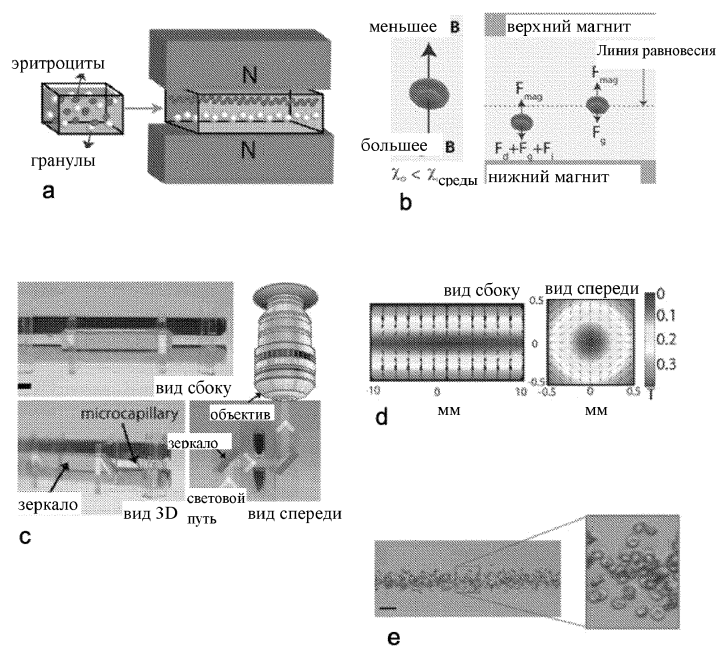
12. Способ по п.1, дополнительно включающий наблюдение за отдельной клеткой в режиме реального времени с помощью устройства для микроскопического исследования, причем устройство для микроскопического исследования обеспечивает различные изображения отдельной клетки в течение периода времени.

13. Способ по п.1, в котором индивидуальные клетки достигают своей равновесной высоты левитации внутри микрокапиллярного канала в течение 10 мин или в котором индивидуальные клетки достигают своей равновесной высоты левитации внутри микрокапиллярного канала в течение 15 мин.

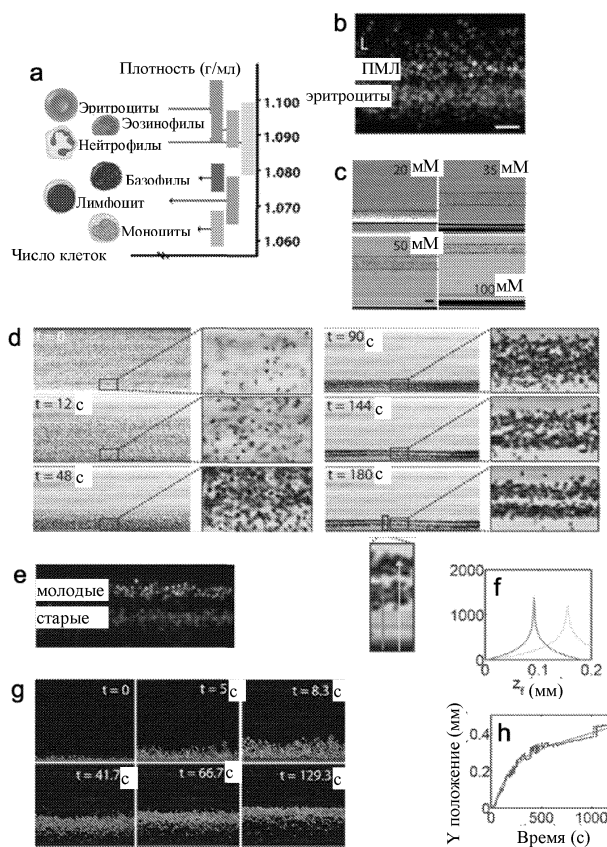
14. Способ по п.1, в котором магнитночувствительная среда содержит среду на основе гадолиния, причем гадолиний присутствует в концентрации от 20 до 100 мМ, или в котором магнитночувствительная среда содержит среду на основе гадолиния, причем гадолиний присутствует в концентрации 20, 35, 40, 50 или 100 мМ.

15. Способ по п.1, в котором два магнита размещают относительно микрокапиллярного канала та-

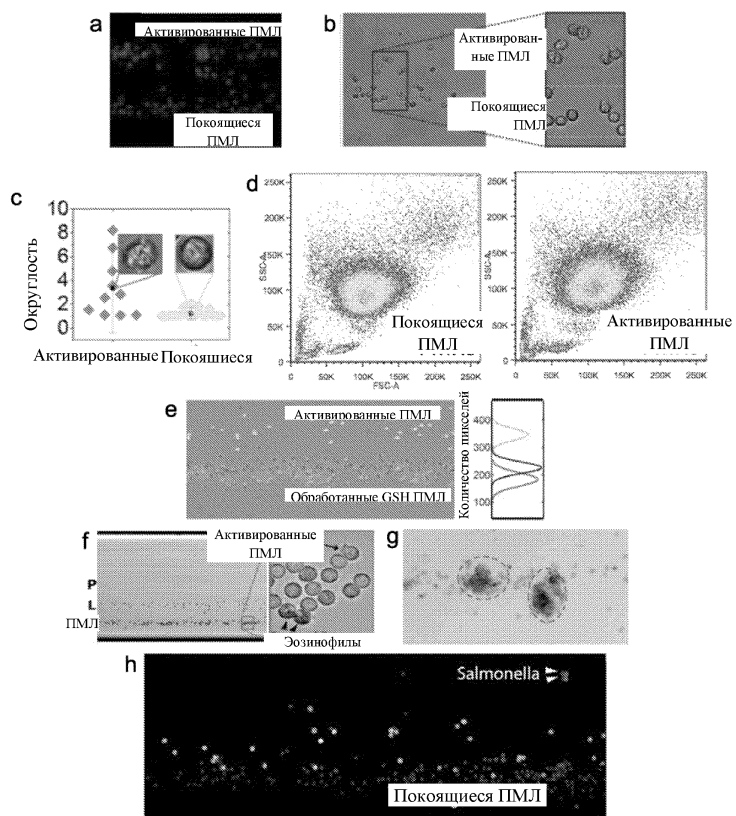
ким образом, что магнитное поле содержит распределение силы магнитного поля, которое симметрично относительно каждой оси микрокапиллярного канала.



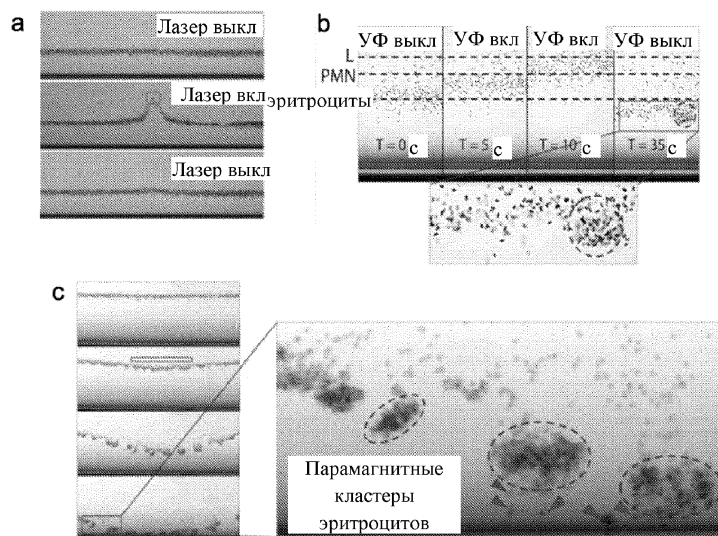
Фиг. 1



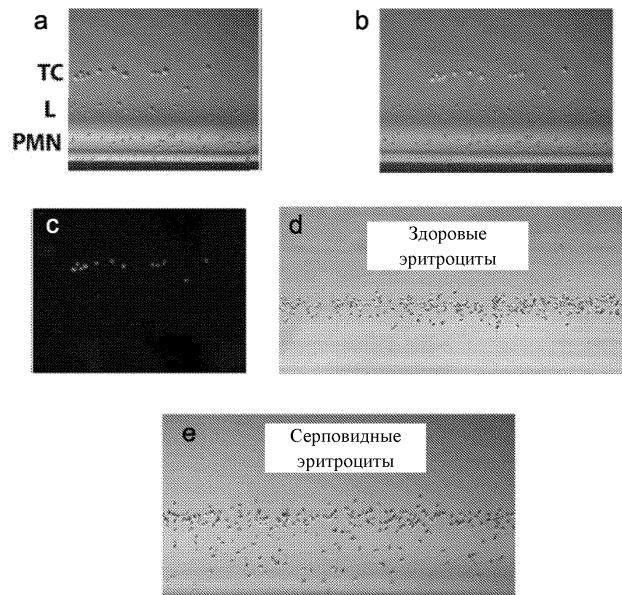
Фиг. 2



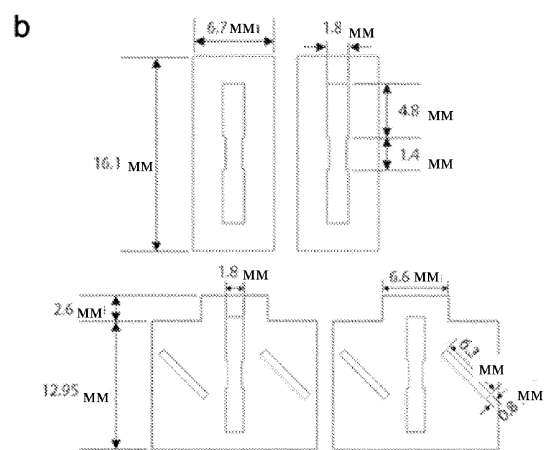
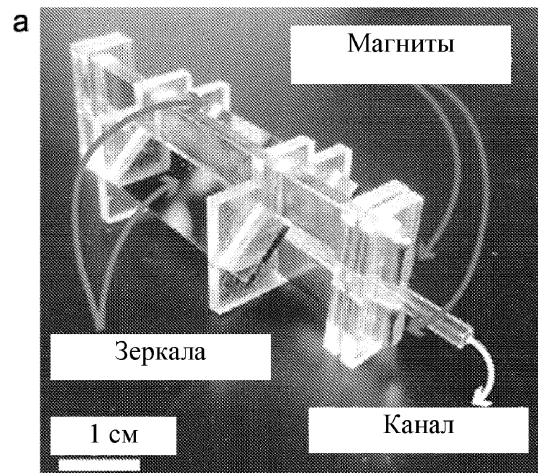
Фиг. 3



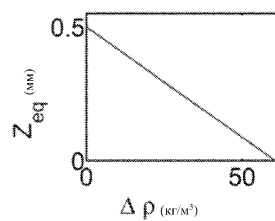
Фиг. 4



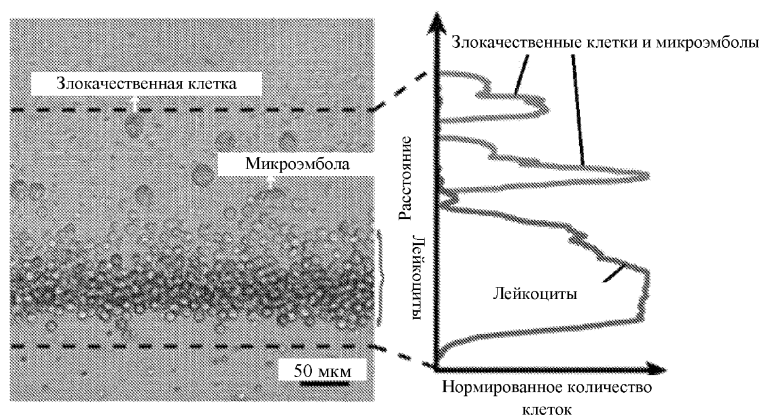
Фиг. 5



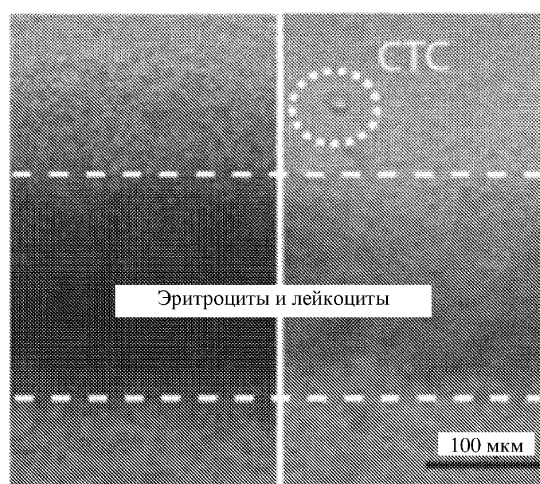
Фиг. 6



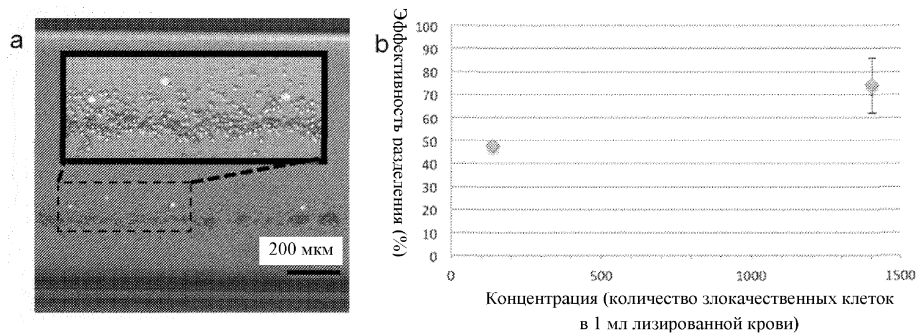
Фиг. 7



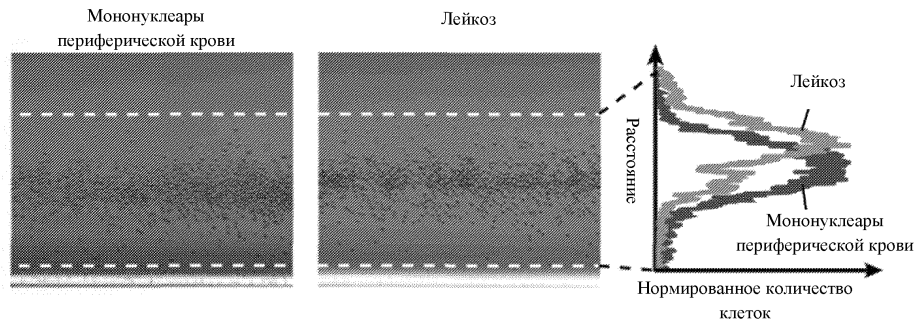
Фиг. 8



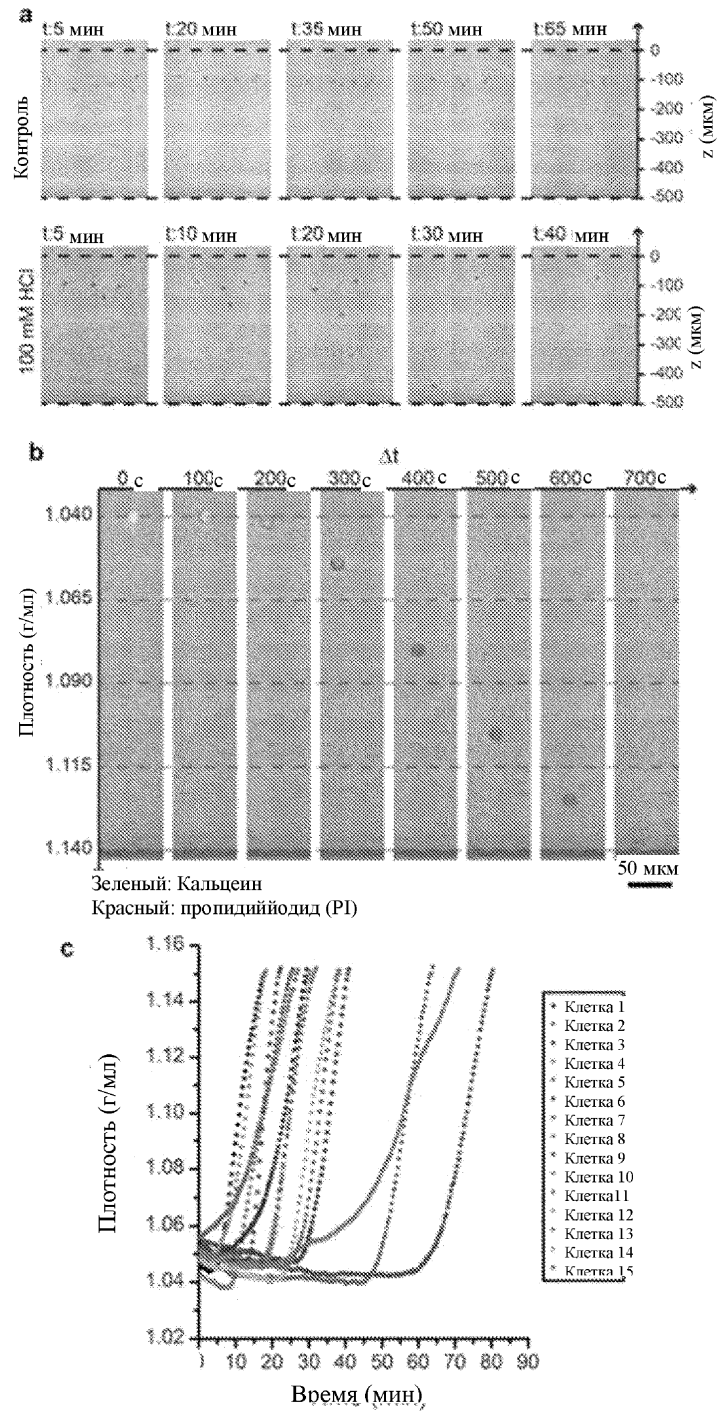
Фиг. 9



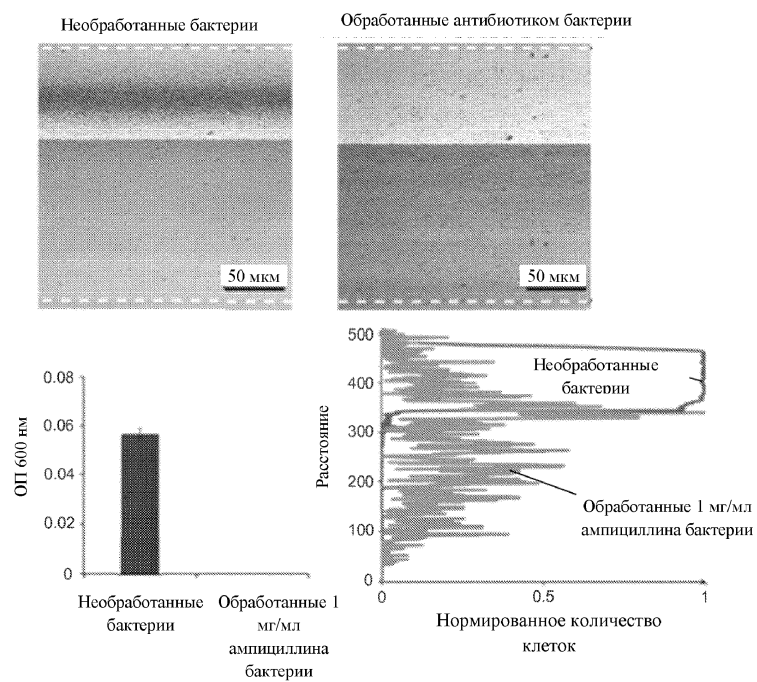
Фиг. 10



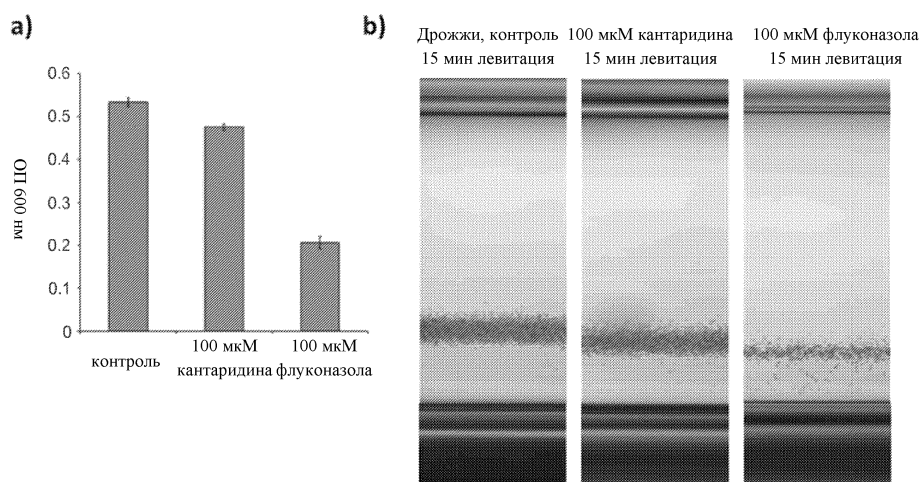
Фиг. 11



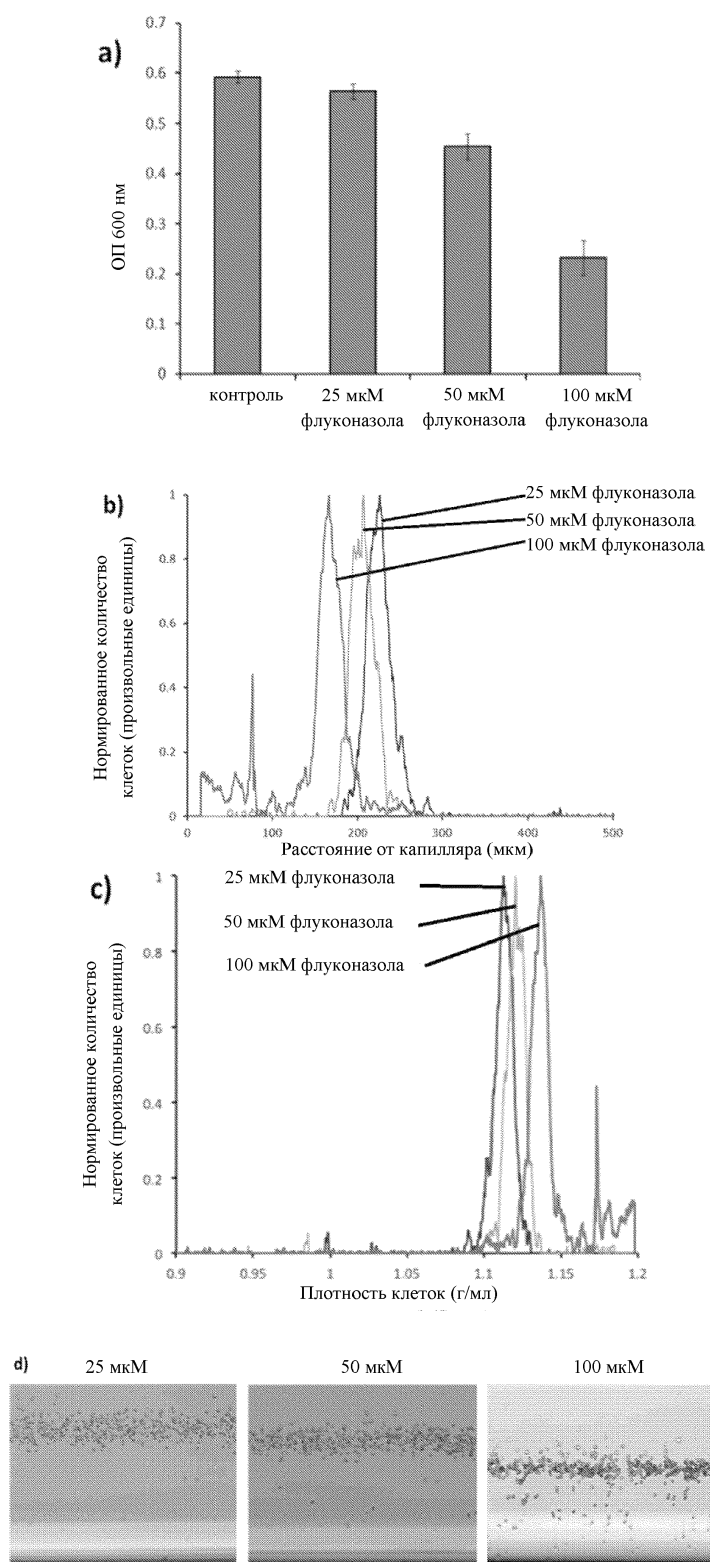
Фиг. 12



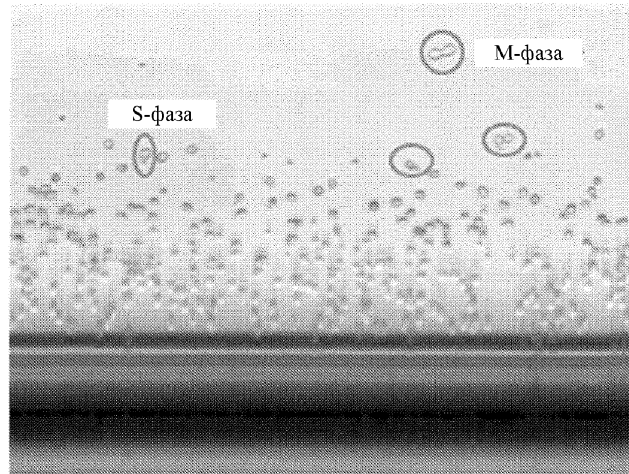
Фиг. 13



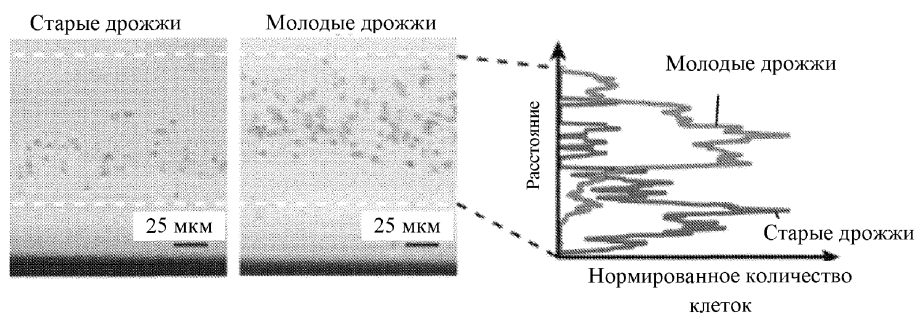
Фиг. 14



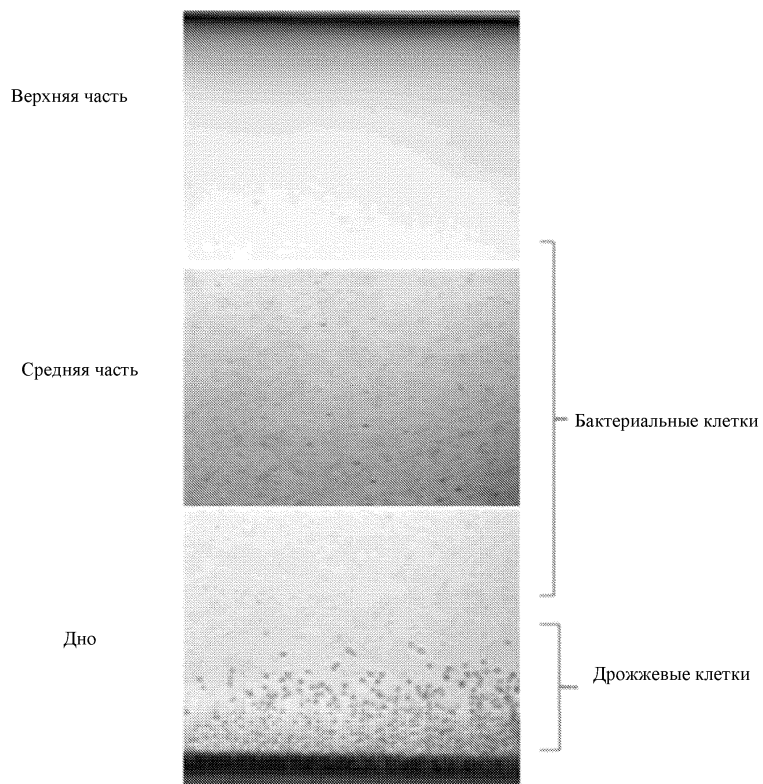
Фиг. 15



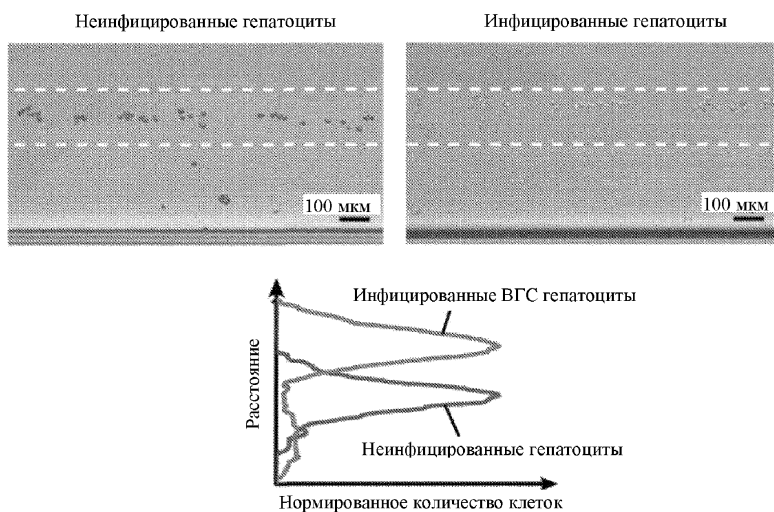
Фиг. 16



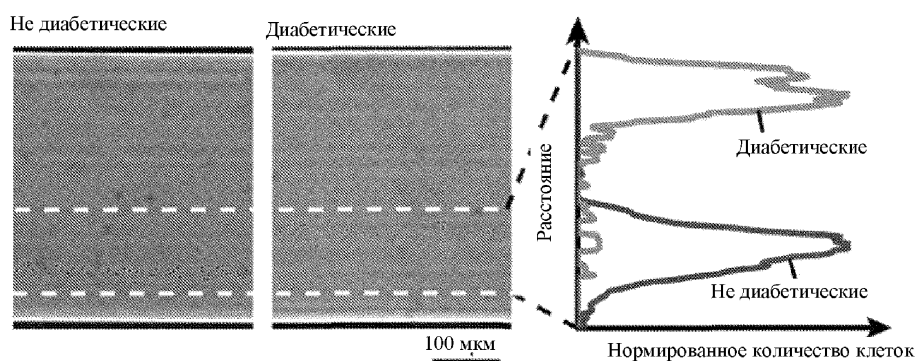
Фиг. 17



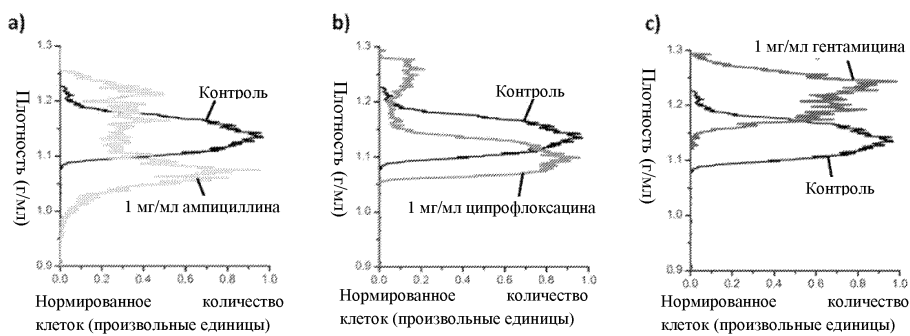
Фиг. 18



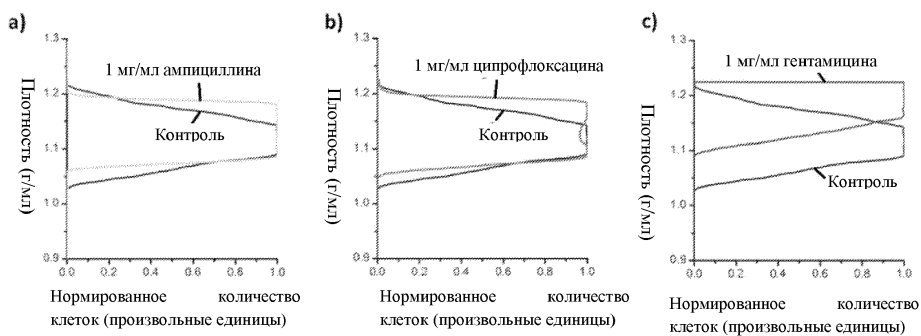
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2