

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038893**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.03

(51) Int. Cl. **G01N 33/487** (2006.01)

(21) Номер заявки
202000269

(22) Дата подачи заявки
2020.09.02

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

(43) **2021.11.02**

(96) **2020000090 (RU) 2020.09.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ПЕРМСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ПФИЦ УРО РАН) (RU)**

(56) NEBOGATIKOV V. et al. Study of morphological changes in breast cancer cells MCF-7 under the action of pro-apoptotic agents with laser modulation interference microscope MIM-340 AIP Conference Proceedings 1882, 020053 (2017); Published Online: 28 September 2017; <https://doi.org/10.1063/1.5001632>

RU-C2-2543340
WO-A1-2013093507

BRAZHE A.R., et al. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study // J. of Biomedical Optics, 13(3), 034004 (2008). <https://doi.org/10.1117/1.2937213>

(72) Изобретатель:
**Белоглазова Юлия Александровна,
Никитюк Александр Сергеевич,
Воронина Анна Олеговна, Гагарских
Ольга Николаевна, Баяндин
Юрий Витальевич, Наймарк Олег
Борисович, Гришко Виктория
Викторовна (RU)**

(57) Изобретение относится к области клеточной биологии и цитологии, в частности, касается оценки жизнеспособности клеток эукариот неинвазивным методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). Способ предусматривает регистрацию флуктуаций оптической толщины клетки в виде трек-диаграммы при помощи прибора, реализующего основные принципы ЛИМ, с последующей фильтрацией сигналов трек-диаграммы методом одномерного непрерывного вейвлет-преобразования и последующей оценкой наклона спектра мощности Фурье отфильтрованного сигнала, имеющего наибольшую дисперсию. Использование способа позволяет сократить продолжительность процесса анализа жизнеспособности клеток эукариот и повысить уровень достоверности результатов в режиме "реального времени", исключая этапы длительной пробоподготовки и процедуры окрашивания специфическими красителями.

B1

038893

038893

B1

Изобретение относится к области клеточной биологии и цитологии, в частности касается оценки жизнеспособности клеток эукариот с помощью метода лазерной интерференционной микроскопии.

Жизнеспособность клетки - это физиологическое состояние, при котором в клетках происходят важные прижизненные процессы, обеспечивающие выполнение ими специфических функций и реализацию клеточного деления [Stoddart M.J. (ed.). *Mammalian cell viability: methods and protocols* // New York (NY): Humana Press. - 2011. - 240 p.].

В настоящее время известно множество методов регистрации жизнеспособности иммортализованных или выделенных из тканей клеток эукариот в условиях воздействия различных факторов, например условий культивирования и криоконсервации, при исследовании процессов апоптоза или клеточной смерти под действием цитотоксичных агентов и так далее. Большинство существующих методов определения клеточной жизнеспособности основаны на оценке морфологической целостности клеток, их пролиферативной или метаболической активности.

Оценка жизнеспособности возможна при использовании следующих методов детекции и визуализации клеток: светлопольная микроскопия [Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability // *Current protocols In immunology*. - 2015. - Vol. 111. - №. 1. - P. A3.B.1-A3.B.3], флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия [Atale N., Gupta S., Yadav U. C.S., Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques // *Journal of microscopy*. - 2014. - Vol. 255. - №. 1. - P. 7-19; Clemons P.A., Tolliday N.J., Wagner B.K. Cell-based assays for high-throughput screening // Humana Press. - 2014. - 218 p.; Johnson S., Nguyen V., Coder D. Assessment of cell viability // *Current protocols in cytometry*. - 2013. - Vol. 64. - №. 1. - P. 9.2.1-9.2.26], а также спектрофотометрия [Riss T. L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. Cell viability assays // *Assay Guidance Manual* [Internet]: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. - 2016; Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay // *Cancer cell culture*. - 2011. - P. 237-245].

На сегодняшний день эталонным способом оценки жизнеспособности клеток является спектрофотометрический (колориметрический) метод, направленный на изучение пролиферативной или метаболической активности клеток с использованием тетразолиевых красителей (например, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Следует отметить, что окрашивание тетразолиевыми красителями осуществляется в течение продолжительного времени (более 3 ч), а также зависит от условий проведения эксперимента, которые могут влиять на метаболическую активность клеток. В свою очередь, процесс окрашивания при определении жизнеспособности клеток методами светлопольной микроскопии (например, трипановый синий), флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии (пропидий йодид, 7-аминоактиномицин D, этидиум бромид, 4'-6-диамидино-2-фенил-индол и другие) занимает от 2 до 30 мин. Однако при этом регистрируется морфологическая целостность клеток, что не всегда отражает истинный показатель жизнеспособности; а в ряде случаев при увеличении продолжительности инкубации с красителем (например, трипановым синим) возможна неспецифическая окраска живых клеток [Прилепский А.Ю., Дроздов А.С., Богатырев В.А., Староверов С.А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов // СПб: Университет ИТМО. - 2019. - 43 с]. Кроме того, при окрашивании клеточных компонентов различными красителями могут происходить необратимые изменения структур клеток, которые негативно воздействуют на их жизнеспособность [Ihmels H., Otto D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA-general principles and recent developments // *Supramolecular dye chemistry*. - 2005. - P. 161-204].

Таким образом, существенным недостатком перечисленных методов является инвазивность, которая оказывает негативное влияние на жизнеспособность объекта исследования.

Существует потребность в разработке неинвазивных методов оценки жизнеспособности клеток в режиме "реального времени", которые позволяют, минуя этапы трудоемкой и длительной пробоподготовки, исключить возникновение артефактов (например, неспецифическое окрашивание препарата), и, как следствие, избежать или уменьшить погрешности измерений в процессе анализа клеточной жизнеспособности.

Неинвазивный метод лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) позволяет получить изображение клетки со сверхвысоким пространственным разрешением и провести детальный анализ оптических свойств объекта. ЛИМ является уникальным физическим методом исследования динамики и морфологии клеточных структур нативных неокрашенных биологических препаратов в режиме "реального времени" и позволяет получить достоверные данные о жизнеспособности клеток, исключив процедуру окрашивания. Среди перспективных технологий ЛИМ выделяют неинвазивные методы исследования морфологии и динамики клеток [Игнатьев, П.С. Лазерная интерференционная микроскопия морфологии и динамики биологических объектов в реальном времени: дис. канд. физ.-мат. наук: 01.04.21 / Игнатьев Павел Сергеевич - Москва, - 2011. - 158 с.], такие как когерентная фазовая микроскопия [Tychinskii V.P. Coherentphase microscopy of intracellular processes // *Physics-Uspekhi*. - 2001. - Vol. 44. - №. 6. - P. 617-629], динамическая фазовая микроскопия [Tychinskii V.P. Dynamic phase microscopy: is a 'dialogue' with the cell possible? // *Physics-Uspekhi*. - 2007. - Vol. 50. - №. 5. - P. 513-528], оптическая когерентная томография [Vishnyakov G.N., Levin G.G., Minaev V.L., Pickalov V.V., Likhachev A.V. Tomographic interference micros-

copy of living cells // *Microscopy and Analysis*. - 2004. - P. 15-18] и модуляционная интерференционная лазерная микроскопия [Andreev V.A., Indukaev K.V. The problem of sub-Rayleigh resolution in interference microscopy // *Journal of Russian Laser Research*. - 2003. - Vol. 24. - №. 3. - P. 220-236; Игнатьев П.С., Индукаев К.В., Осипов П.А., Сергеев И.К. Лазерная интерференционная микроскопия для нанобиотехнологий // *Медицинская техника*. -2013. - Т. 1. - С. 27-30].

В настоящее время метод ЛИМ получил распространение в исследованиях, направленных на изучение морфофункциональных и динамических состояний биологических объектов, таких как клетки крови - эритроциты [Majeed H., Sridharan S., Mir M., Ma L., Min E., Jung W., Popescu G. Quantitative phase imaging for medical diagnosis // *Journal of biophotonics*. - 2017. - Vol. 10. - №. 2. - P. 177-205; Popescu G., Ikeda T., Best C., Badizadegan K., Dasari R.R., Feld M.S. Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy // *Journal of biomedical optics*. 2005. - Vol. 10. - №. 6. - doi:10.1117/1.2149847; Popescu G., Ikeda T., Goda K., Best-Popescu C.A., Laposata M., Manley S., Feld M.S. Optical measurement of cell membrane tension // *Physical review letters*. - 2006. - Vol. 97. - №. 21: 218101; Popescu G., Park Y., Dasari R.R., Badizadegan K., Feld M.S. Coherence properties of red blood cell membrane motions // *Physical Review E*. - 2007. Vol. - 76. - №. 3: 031902], культуры нейронов [Wang R., Wang Z., Leigh J., Sobh N., Millet L., Gillette M.U., Popescu G. One-dimensional deterministic transport in neurons measured by dispersion-relation phase spectroscopy // *Journal of Physics: Condensed Matter*. - 2011. - Vol. 23. - №. 37. - P. 1-9; Wang Z., Millet L., Mir M., Ding H., Unarunotai S., Rogers J., Popescu G. Spatial light interference microscopy (SLIM) // *Optics express*. - 2011. - Vol. 19. - №. 2. - P. 1016-1026], клеточные линии эпителиального происхождения [Lue N., Choi W., Popescu G., Ikeda T., Dasari R.R., Badizadegan K., Feld M.S. Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy // *Applied Optics*. - 2007. - Vol. 46. - №. 10. -P. 1836-1842; Nikitiuk A.S., Voronina A.O., Beloglazova Y.A., Ozernykh O.S., Grishko V.V., Naimark O.B. Study of cancer and normal cells dynamics based on laser interference microscopy // *AIP Conference Proceedings: AIP Publishing LLC*. - 2020. - Vol. 2216. - №. 1: 060005; Popescu G., Park Y., Lue N., Best-Popescu C., Deflores L., Dasari R.R., Badizadegan K. Optical imaging of cell mass and growth dynamics // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. - 2008. - Vol. 295. - №. 2. - P. 538-544], изолированные митохондрии [Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaja T. Mitochondria optical parameters are dependent on their energy state: an electrooptical effect? // *European Biophysics Journal*. - 2004. - Vol. 33. - №. 8. - P. 700-705] и хлоропласты [Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T.V., Tikhonov A.N. A dynamic phase microscopic study of optical characteristics of individual chloroplasts // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. - 2004. - Vol. 1665. -№. 1-2. - P. 57-64]. Недавно предложен метод, позволяющий на основании данных о динамических характеристиках опухолевых и нормальных клеток человека дифференцировать патологически измененные клетки с помощью метода ЛИМ без добавления специфических красителей [Nebogatikov V., Nikitiuk A., Konysheva A., Ignatyev P., Grishko V., Naimark O. Study of morphological changes in breast cancer cells MCF-7 under the action of pro-apoptotic agents with laser modulation interference microscope MIM-340 // *AIP Conference Proceedings: AIP Publishing LLC*. - 2017. - Vol. 1882. - №. 1: 020053; Nikitiuk A.S., Voronina A.O., Beloglazova Y.A., Ozernykh O.S., Grishko V.V., Naimark O.B. Study of cancer and normal cells dynamics based on laser interference microscopy // *AIP Conference Proceedings: AIP Publishing LLC*. - 2020. - Vol. 2216. - №. 1: 060005].

Данные о возможности исследования жизнеспособности клеток с использованием метода ЛИМ в источниках информации не обнаружены.

Задача настоящего изобретения - разработка неинвазивного способа оценки жизнеспособности эукариотических клеток, исключающего этап длительной пробоподготовки, в том числе обработку клеток красителем.

Технический результат - сокращение продолжительности процесса оценки жизнеспособности и повышение уровня достоверности результатов в условиях режима "реального времени".

Для решения поставленной задачи разработан способ определения жизнеспособности клеток эукариот методом лазерной интерференционной микроскопии, когда жизнеспособность исследуемых клеток определяют неинвазивным методом в режиме "реального времени", исключая этап окрашивания специфическими красителями, с последующей оценкой наклона спектра мощности Фурье флуктуаций оптической толщины клеток и сопоставлением с обоснованными критериями.

На фиг. 1-16 представлены типовые результаты измерений флуктуаций оптической толщины клеток MCF-7. На фиг. 17-18 представлено сравнение наклона спектра мощности Фурье флуктуаций оптической толщины живых и мертвых раковых клеток MCF-7.

Методика исследования жизнеспособности клеток по предлагаемому способу

Для осуществления способа используют эукариотические клетки, полученные из различных органов или тканей, например клетки линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) или другие клетки. Клетки MCF-7 культивируют в питательной среде DMEM с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и смеси 1% пенициллина/стрептомицина (1000 ЕД/мл; 10 мг/мл) (ПанЭко, Россия) в CO₂-инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) во влажной атмосфере 5,0±0,5% CO₂ при +37,0±1,0°C. Исследование других клеток осуществляют в соответствии с условиями их культивиро-

вания. Работы с клетками проводят в асептических условиях с использованием стерильных реактивов и расходных материалов.

Непосредственно перед определением жизнеспособности клеток с помощью метода ЛИМ готовят препараты клеток для микроскопии несколькими способами: путем нанесения суспензии (свободных) клеток на диэлектрическое предметное стекло с зеркальным напылением в область, ограниченную тонким слоем густой силиконовой смазки (спейсер), или при перемещении на предметное стекло с зеркальным напылением носителя (подложки) с закрепленными (иммобилизованными) клетками. При этом исследуемые клетки должны находиться в буферной зоне (полная питательная среда, фосфатно-солевой буфер или другое) и сохранять свою жизнеспособность.

Жизнеспособность исследуемой клетки определяется по результатам анализа флуктуаций ее оптической толщины. Флуктуации оптической толщины клетки регистрируются при помощи лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 (Швабе, Россия). Допустимо использование других приборов, реализующих основные принципы метода ЛИМ. При этом аналогичный прибор должен иметь возможность проводить измерение оптической толщины клетки и получать фазовое изображение клетки, а также регистрировать флуктуации оптической толщины клетки в виде трек-диаграммы.

Измерения флуктуаций оптической толщины клеток выполняют с помощью ЛИМ согласно следующему алгоритму:

- 1) съемка фазового изображения исследуемой клетки (кадр № 1);
- 2) повторная съемка фазового изображения клетки (кадр № 2) через 60 с;
- 3) получение разностного кадра путем вычитания кадра № 1 из кадра №2;
- 4) определение положения скан-линии, вдоль которой в дальнейшем осуществляется регистрация флуктуаций оптической толщины клетки;
- 5) измерение флуктуаций оптической толщины клетки вдоль установленной скан-линии в течение 247 с (8192 скан-линии), которые сохраняются в виде трек-диаграммы.

Принцип определения жизнеспособности клетки по результатам измерений флуктуаций оптической толщины заключается в следующем. По разностному кадру, полученному на основе фазовых изображений клетки, измеренных с 60-секундной задержкой, определяется профиль клетки, в котором произошли наиболее сильные изменения оптической толщины клетки. Далее в виде трек-диаграммы фиксируются изменения данного профиля во времени с частотой записи не менее 33 Гц и временем записи не менее 247 с. Для каждого временного сигнала выполняется низкочастотная фильтрация с помощью одномерного непрерывного вейвлет-преобразования. Из отфильтрованной трек-диаграммы выделяется одномерный сигнал, имеющий максимальное значение дисперсии. Выполняется оценка наклона спектра мощности данного сигнала, рассчитанного на основе одномерного Фурье-преобразования, согласно следующим соотношениям:

$$f(k) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-ik} \Delta\phi(t) dt,$$

$$S(k) = |f(k)|^2,$$

$$S(k) : \frac{1}{k^\beta},$$

где $\Delta\phi(t)$ - флуктуации оптической толщины клетки,

$f(k)$ - образ Фурье функции $\Delta\phi(t)$,

k - частота, $S(k)$ - спектр мощности,

β - наклон спектра мощности.

Наклоны спектров мощности Фурье флуктуаций оптической толщины, соответствующие живым или мертвым клеткам, определяют для представительных выборок клеток методами статистической обработки данных измерений.

Сущность предлагаемого решения и возможность его осуществления подтверждается примерами 1-5.

Пример 1. Получение и исследование суспензии свободных жизнеспособных клеток.

Клетки MCF-7 выращивали в течение 48 ч в соответствии с условиями культивирования по вышеописанной методике и получали клеточную суспензию жизнеспособных клеток. Клетки открепляли с поверхности культурального флакона при помощи смеси растворов (1:4) 0,25% Трипсина (MP Biomedicals, США)/Версена (0,2% ЭДТА в фосфатном буфере; ПанЭко, Россия). Полученную суспензию жизнеспособных клеток (концентрация 5×10^4 клеток/мл) осаждали путем центрифугирования на микроцентрифуге Z 216 МК (Hermle, Германия) при следующих условиях: 150 g, 5 мин, $+37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Из полученной суспензии клеток удалили супернатант и осадок ресуспендировали в 300 мкл 0,01 М фосфатно-солевого буфера (PBS, ПанЭко, Россия).

Препараты свободных жизнеспособных клеток, полученных в виде клеточных суспензий, подготавливали непосредственно перед исследованием с помощью метода ЛИМ следующим образом. По периметру диэлектрического предметного стекла с зеркальным напылением наносили тонкий слой силико-

новой смазки (спейсер). На ограниченную спейсером поверхность наносили 30 мкл исследуемой клеточной суспензии и накрывали стерильным покровным стеклом размером 24×50 мм, плотно прижимая к предметному стеклу таким образом, чтобы клетки находились между предметным и покровным стеклом и при этом не подвергались механическому воздействию, оставаясь жизнеспособными.

Для оценки жизнеспособности клеток MCF-7 проводили измерения флуктуаций оптической толщины клеток с помощью лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 (Швабе, Россия) по вышеописанной методике. В работе использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 655 нм в качестве источника когерентного излучения и объектив с увеличением ×10.

Типовые результаты исследования жизнеспособных свободных клеток представлены на фиг. 1-4.

Пример 2. Получение и исследование суспензии свободных нежизнеспособных клеток.

Суспензию клеток готовили как в примере 1. Для получения нежизнеспособных клеток полученную суспензию подвергали ультразвуковому воздействию (частота 37 кГц) при +45,0±1,0°C в течение 60 мин на Elmasonic S130H (Elma, Германия).

Препараты нежизнеспособных клеток, полученных в виде клеточных суспензий, подготавливали как в примере 1.

Измерения флуктуаций оптической толщины клеток MCF-7 проводили аналогично примеру 1.

Типовые результаты исследования суспензий нежизнеспособных клеток представлены на фиг. 5-8.

Пример 3. Получение и исследование жизнеспособных клеток, закрепленных на носителе.

Клеточную культуру MCF-7 концентрацией 2×10^4 клеток/мл рассеивали в чашки Петри диаметром 60 мм (Ningbo Greetmed Medical Instruments, Китай), на дно которых в качестве носителя помещали покровное стекло размером 24×50 мм². Клетки выращивали в соответствии с условиями культивирования исследуемой клеточной линии в течение 48 ч для получения жизнеспособных клеток, закрепленных на носителе.

Препараты жизнеспособных закрепленных на носителе клеток подготавливали непосредственно перед исследованием методом ЛИМ следующим образом. По периметру предметного стекла наносили тонкий слой силиконовой смазки, выступающей в качестве спейсера. Далее из чашки Петри пинцетом извлекали покровное стекло, удерживая его за самый край, и помещали на спейсер таким образом, чтобы клетки располагались между покровным и предметным стеклом в буферной зоне. Избыточное количество среды смывали с поверхности плотно прижатого покровного стекла смоченной в воде марлей с последующим удалением излишка воды сухой марлей.

Измерения флуктуаций оптической толщины клеток MCF-7 проводили аналогично примеру 1.

Типовые результаты исследования жизнеспособных клеток, закрепленных на носителе, представлены на фиг. 9-12.

Пример 4. Получение и исследование нежизнеспособных клеток, закрепленных на носителе.

Клетки выращивали и затем подготавливали препараты закрепленных на носителе клеток как в примере 3. Для получения закрепленных на носителе нежизнеспособных клеток дополнительно проводили этап фиксации, погружая носитель с закрепленными клетками в фиксирующий 4% раствор параформальдегида в течение 20 мин при +4°C и затем трижды отмывая препарат 0,01 М раствором PBS (ПанЭко, Россия).

Измерения флуктуаций оптической толщины клеток MCF-7 проводили аналогично примеру 1.

Типовые результаты исследования нежизнеспособных клеток, закрепленных на носителе, представлены на фиг. 13-16.

Пример 5. Сравнительный анализ данных измерения флуктуаций оптической толщины клеток и расчет порогового значения, определяющего жизнеспособность исследуемых клеток.

В результате статистической обработки данных, полученных в соответствии с примерами 1-4 для 162 жизнеспособных клеток MCF-7 (86 закрепленных на носителе клеток и 76 свободных клеток) и 147 нежизнеспособных клеток MCF-7 (86 закрепленных на носителе клеток и 61 свободных клеток), устанавливали пороговое значение, определяющее жизнеспособность клеток линии MCF-7.

Для этого на первом этапе проводили сравнительный анализ 4 выборок наклона спектра мощности Фурье отфильтрованного сигнала, имеющего наибольшую дисперсию флуктуаций оптической толщины, жизнеспособных и нежизнеспособных клеток, закрепленных на носителе или полученных в виде суспензии. Согласно критерию Уилкоксона-Манна-Уитни определяли, что зона пересекающихся значений между этими образцами достаточно мала и соответствовала значению параметра p , равному 0,0002 ($p < 0,001$) или $2,5726 \times 10^{-29}$ ($p < 0,001$) для свободных или закрепленных клеток, соответственно. Чтобы определить критическое значение наклона спектра мощности β_c флуктуаций оптической толщины, относительно которых можно судить о жизнеспособности клетки по данным ЛИМ, оценивали значения выборок, соответствующие 25-й и 75-й квантили. На основании данных оценок сделан вывод о том, что для закрепленных на носителе клеток MCF-7 значение β_c соответствовало ≈ 1 , для свободных клеток данное значение составило 0,75.

На втором этапе исследования проводили сравнительный анализ выборок наклона спектра мощности Фурье отфильтрованных сигналов, имеющих наибольшую дисперсию флуктуаций оптической тол-

щины закрепленных и свободных жизнеспособных клеток, а также закрепленных и свободных нежизнеспособных клеток. С помощью теста Уилкоксона-Манна-Уитни установлена значимая разница между первыми двумя выборками ($p < 0,001$) и значимая разница между последними ($p < 0,01$).

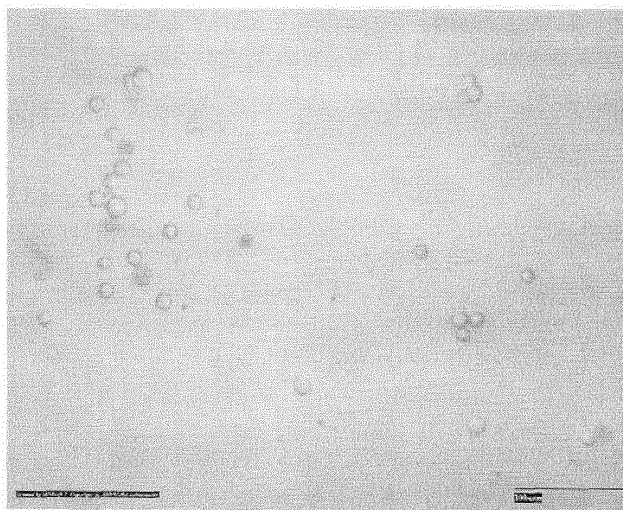
Сравнительный анализ наклона спектра мощности Фурье флуктуаций оптической толщины живых и мертвых раковых клеток MCF-7 с помощью теста Уилкоксона-Манна-Уитни представлен на фиг. 17-18.

Таким образом, если наклон спектра мощности Фурье флуктуаций оптической толщины клеток линии MCF-7 больше, чем пороговое значение β_c , то данную клетку считали живой, в противном случае - мертвой.

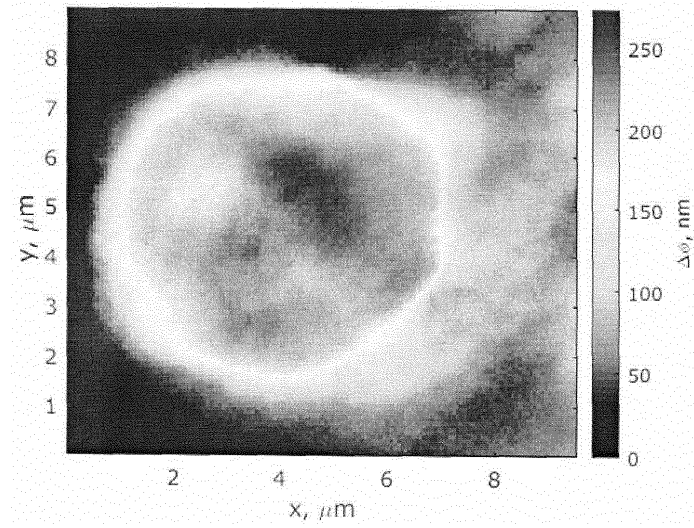
Использование предлагаемого способа позволяет сократить продолжительность процесса анализа жизнеспособности клеток эукариот и повысить уровень достоверности результатов в режиме "реального времени", исключая этапы длительной пробоподготовки и процедуры окрашивания специфическими красителями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

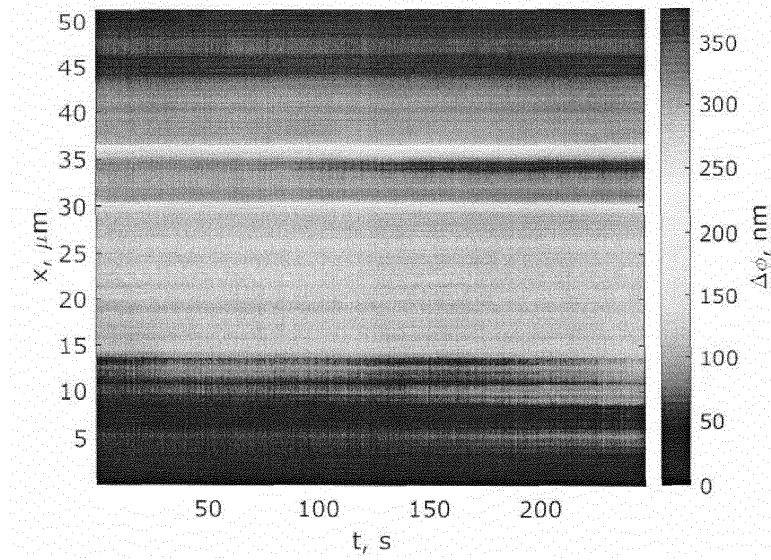
Способ определения жизнеспособности клеток эукариот методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), включающий измерение флуктуаций оптической толщины исследуемых клеток и нежизнеспособных клеток того же типа, при этом измерения флуктуаций оптической толщины клеток выполняют с помощью ЛИМ, по разностному кадру, полученному на основе фазовых изображений клетки, измеренных с 60-секундной задержкой, определяют профиль клетки, в котором произошли наиболее сильные изменения оптической толщины клетки, далее в виде трек-диаграммы фиксируют изменения данного профиля во времени с частотой записи не менее 33 Гц и временем записи не менее 247 с, для каждого временного сигнала выполняют низкочастотную фильтрацию с помощью одномерного непрерывного вейвлет-преобразования, из отфильтрованной трек-диаграммы выделяют одномерный сигнал, имеющий максимальное значение дисперсии, для которого на основе одномерного Фурье-преобразования оценивают наклон спектра мощности данного сигнала для исследуемых клеток (β) и для нежизнеспособных клеток того же типа (β_c), и, если β превышает β_c , делают вывод о жизнеспособности исследуемых клеток, в противном случае клетки считают мертвыми.



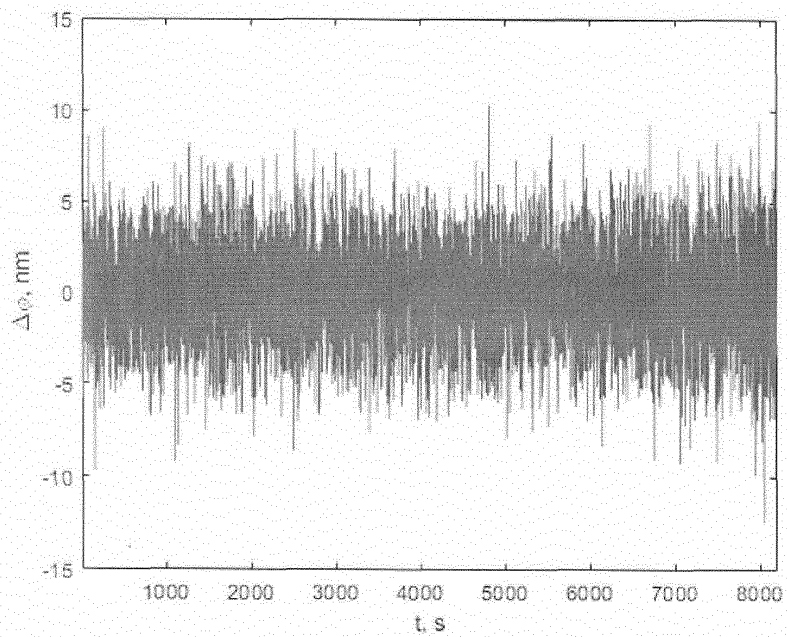
Фиг. 1



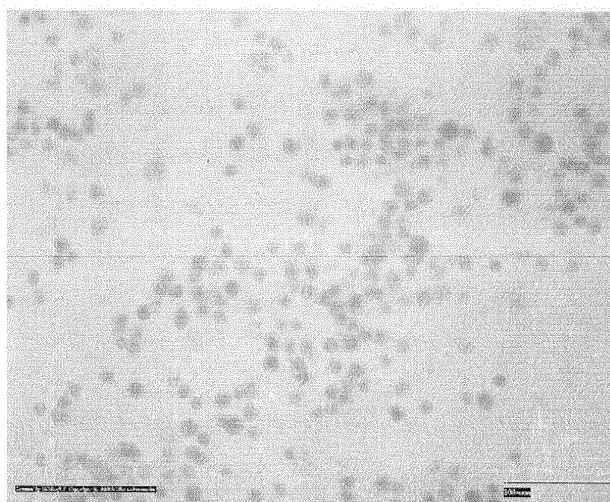
Фиг. 2



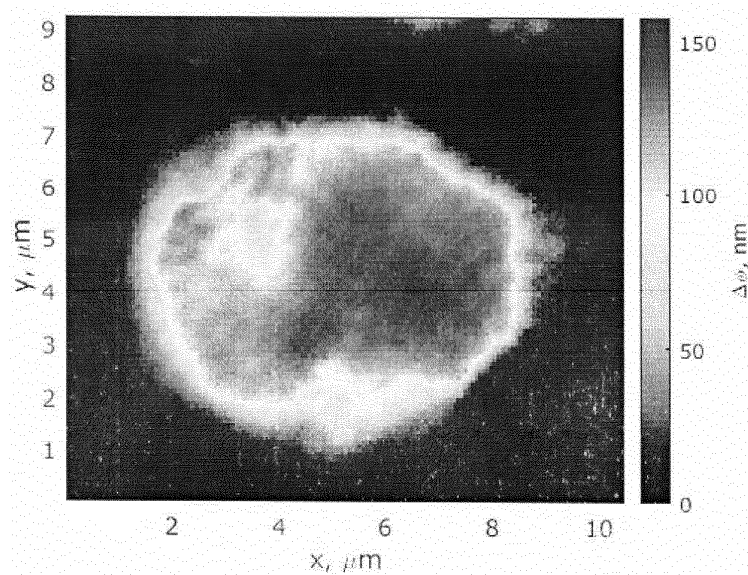
Фиг. 3



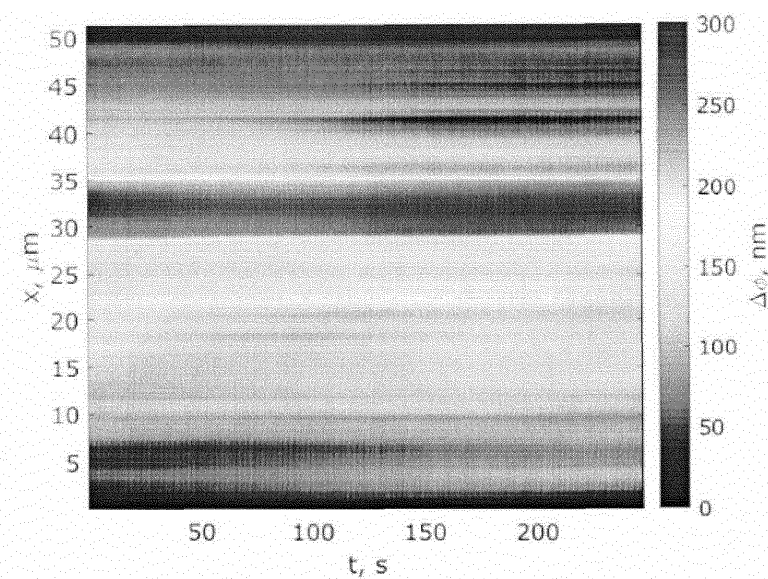
Фиг. 4



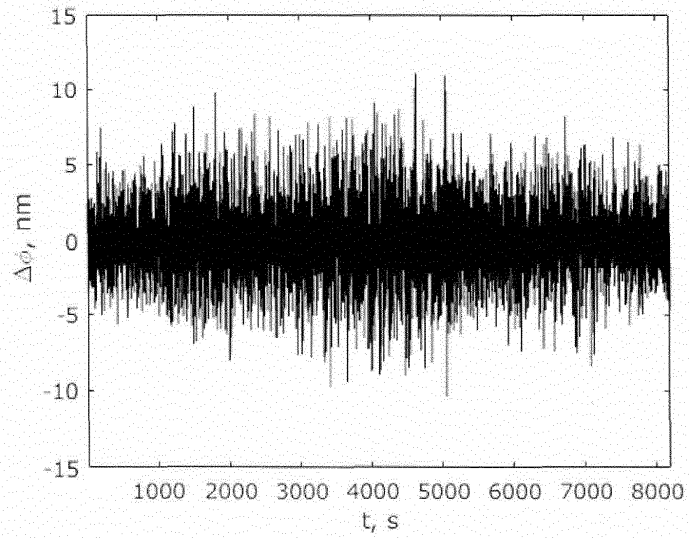
Фиг. 5



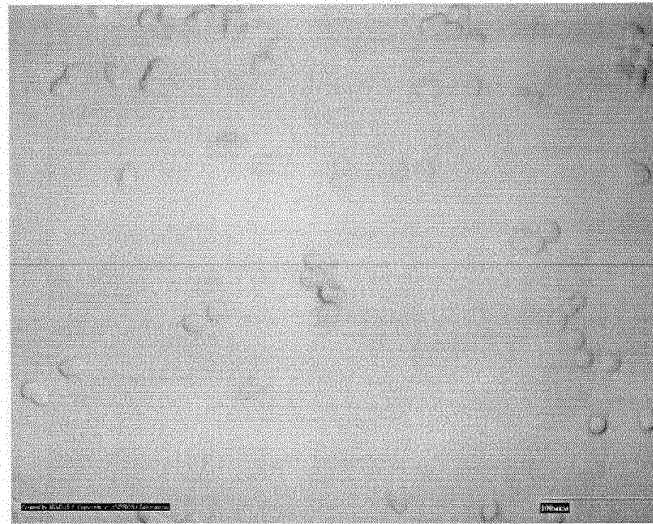
Фиг. 6



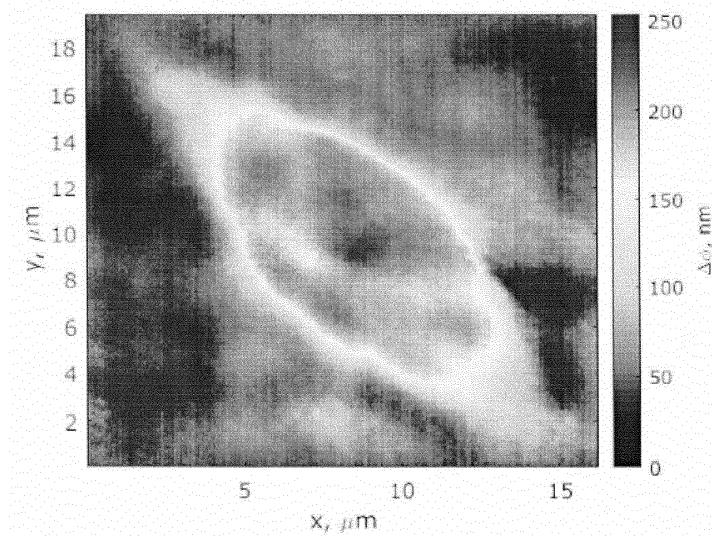
Фиг. 7



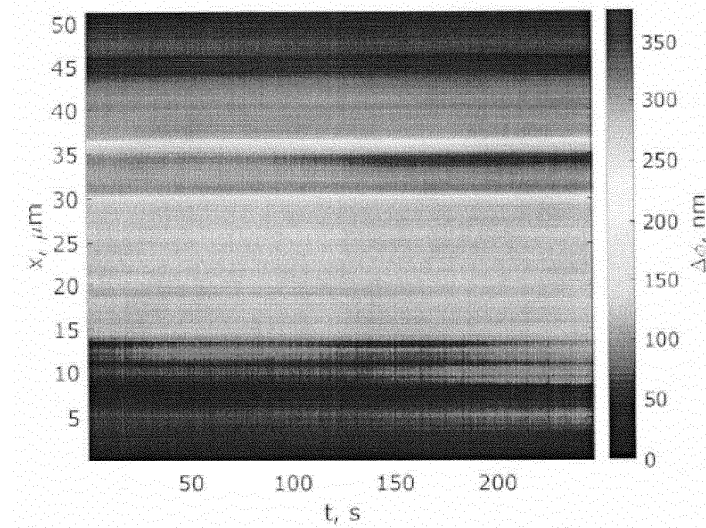
Фиг. 8



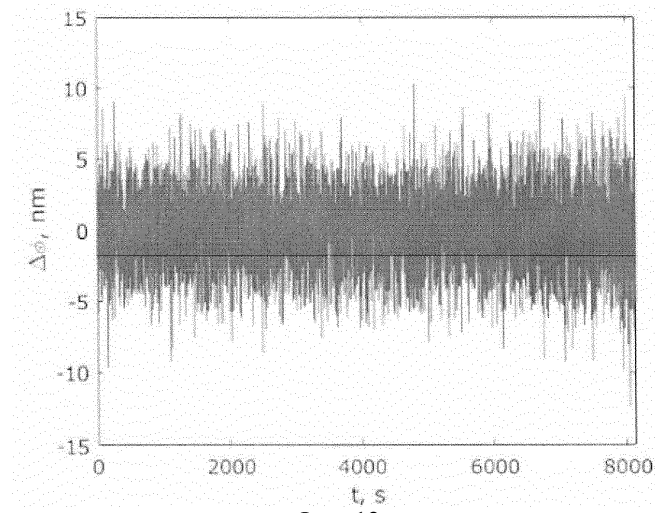
Фиг. 9



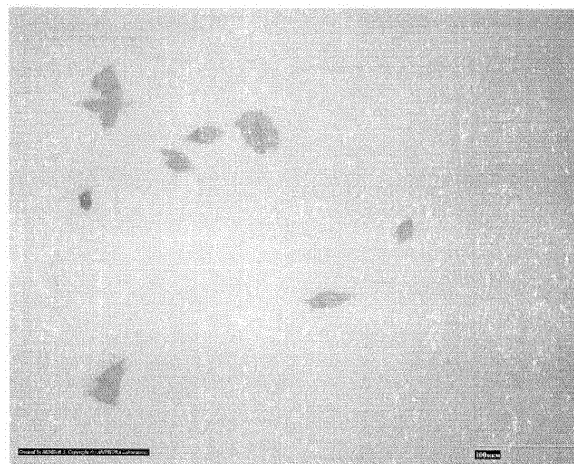
Фиг. 10



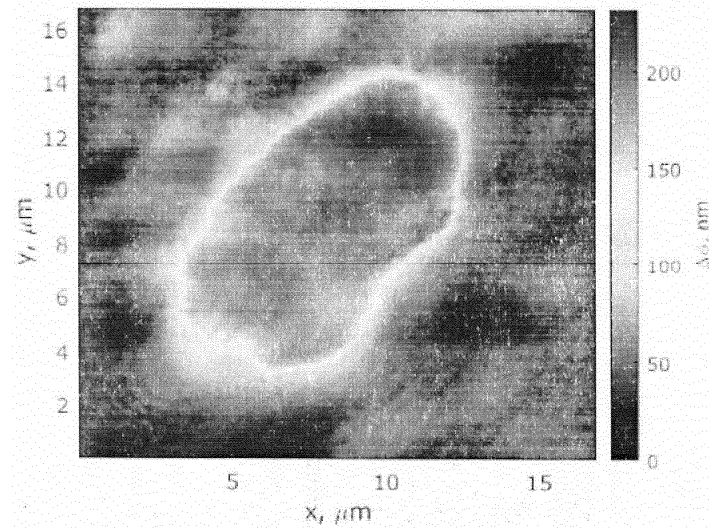
Фиг. 11



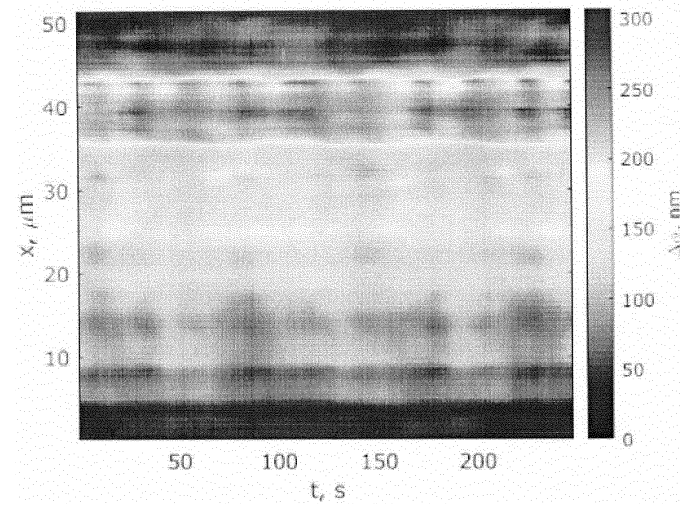
Фиг. 12



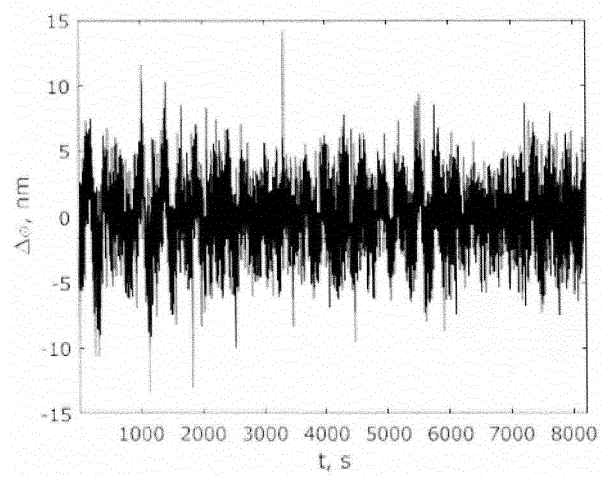
Фиг. 13



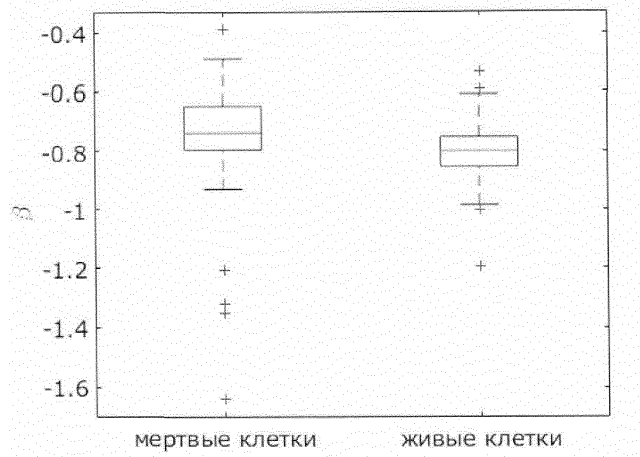
Фиг. 14



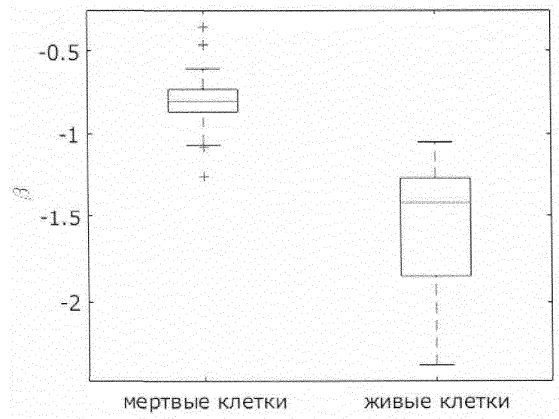
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

